



HAL
open science

**Caractérisation constitutive et en condition d'infection
bactérienne des populations hémocytaires par une
approche intégrative cytologiques, transcriptomiques et
fonctionnelles chez l'huitre creuse *Crassostrea*
(*Magallana*) *gigas***

Sébastien De La Forest Divonne

► **To cite this version:**

Sébastien De La Forest Divonne. Caractérisation constitutive et en condition d'infection bactérienne des populations hémocytaires par une approche intégrative cytologiques, transcriptomiques et fonctionnelles chez l'huitre creuse *Crassostrea* (*Magallana*) *gigas*. Biologie animale. Université de Perpignan, 2024. Français. NNT : 2024PERP0025 . tel-04901435

HAL Id: tel-04901435

<https://theses.hal.science/tel-04901435v1>

Submitted on 20 Jan 2025

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
ED305 Energie et Environnement

Et de l'unité de recherche
**UMR 5244 : Interactions Hôtes Pathogènes Environnements
(IHPE)**

Spécialité : **Biologie**

Présentée par
Sébastien DE LA FOREST DIVONNE

**Caractérisation constitutive et en condition d'infection
bactérienne des populations hémocytaires par une
approche intégrative cytologique, transcriptomique et
fonctionnelle chez l'huître creuse *Crassostrea
(Magallana) gigas*.**

Soutenue le **13 Décembre 2024**, devant le jury composé de

Mme. Aurélie TASIEMSKI, PR, Université de Lille

Rapporteur

M. Arthur TALMAN, CR, IRD

Rapporteur

Mme. Michèle CROZATIER-BORDE, DR, CNRS

Examineur

Mme. Céline COSSEAU, PR, UPVD

Examineur

M. Benjamin GOURBAL, PR, UPVD

Directeur de thèse

M. Emmanuel VIGNAL, MCU, UM

Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Aurélie Tasiemski et Arthur Talman d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. Merci également à Céline Cosseau et Michèle Crozatier-Borde d'avoir accepté d'être examinatrices de mes travaux.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers les membres de mon comité de suivi de thèse, Sarah Merklings, Christine Braquart-Varnier et Marie Mirouze. Vos conseils ont été d'une aide précieuse tout au long de ce parcours. Merci à vous.

Je tiens également à remercier la région Occitanie, l'école doctorale Énergie Environnement de l'Université de Perpignan Via-Domitia (ED305) et l'IFREMER (Projet Hemofight) pour leur soutien financier à mon projet de thèse.

Un immense merci et toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, Emmanuel Vignal et Benjamin Gourbal, pour m'avoir accepté en thèse et m'avoir guidé ces trois années.

Manu, un énorme merci à toi. Merci de m'avoir guidé et soutenu tout au long de ces trois années pendant lesquelles j'ai pris un immense plaisir à travailler à tes côtés. Sortant d'un master très orienté microbiologie, on ne peut pas dire que mon profil était celui qui collait le plus à l'annonce. Mais si la thèse s'est si bien passée, c'est grâce à toi, grâce à ta patience, à ta didactique, à ton aide autant thématique que technique, à ton écoute, à la manière que tu as de rendre mes présentations sexy, et à la capacité que tu as eue à régler tous mes problèmes administratifs à l'aide de tes connaissances des rouages administratifs. C'est vraiment un art. Je pense que je t'en ai fait baver de temps en temps, et que ton « stressomètre » a dû grimper plus d'une fois, désolé pour ça. Ça a été un grand plaisir pour moi d'être ton zèbre et ton jeune lémurien pendant ces 3 années. En période de gros rush, tu me disais souvent « vis ma vie de chercheur ». Aujourd'hui, c'est cette vie que tu m'as montrée qui m'inspire et à laquelle j'aspire. Merci encore à toi.

Merci à toi, Benjamin, d'avoir été mon deuxième père scientifique. Malgré les 160 km qui nous ont séparés pendant ma thèse, et ton emploi du temps plus que chargé, tu as toujours su trouver le temps pour m'aider, que ce soit pour la conception et le suivi de mon projet de thèse, la

rédaction du manuscrit de thèse, et tout l'administratif qui va avec. Tu y es pour beaucoup si j'ai pu mener cette thèse à bien pendant ces 3 ans. Merci à toi.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Guillaume Charrière et Marie-Agnès Travers, qui ont été d'une grande aide pendant la réalisation de mes travaux de thèse.

Merci, Guillaume, de m'avoir pris en stage de master 2 avec Delphine. C'est grâce à ce premier contact dans l'UMR que j'ai pris goût aux huîtres (sur la paillasse seulement). Merci beaucoup pour toute ton aide pendant ma thèse et pour toutes tes idées de manips. Tu as un vrai talent pour ce qui est de transformer des discussions d'idées en des projets captivants. Ça a été un plaisir de travailler avec toi. Merci encore.

Merci à toi, Agnès, de m'avoir tant aidé, depuis mon stage de master 2 jusqu'en thèse. Merci pour ta douceur et ta bonne humeur quotidienne. J'ai pris un grand plaisir à travailler à tes côtés, que ce soit dans la journée ou à 2h du mat' avec Manu quand il fallait prélever des huîtres infectées. Ton aide a été précieuse pendant ma thèse, merci beaucoup.

Un grand merci à l'IHPE pour m'avoir accueilli avec autant de bienveillance pendant ces 3 années et demie, de mon stage de master 2 aux derniers jours de ma thèse. Vos conseils et encouragements ont été un soutien essentiel tout au long de ce parcours. Merci à l'équipe 2MAP pour vos conseils avisés sur mes manips. C'était un plaisir de vous retrouver toutes les deux semaines en réu, ainsi que lors de mes enseignements à Perpignan et des réunions inter-équipes. Merci, Viviane, pour toute l'énergie que tu envoies à longueur de journée. Merci, Erika, pour ta bonne humeur et ton rire qu'on entend même la porte fermée, merci d'avoir toujours été au rendez-vous pour regarder les trucs bizarres que je voyais au microscope. Un grand merci à l'équipe technique du laboratoire à Montpellier. Océane, Juliette et Gaëlle, vous avez été d'un grand soutien pendant ma thèse, merci à vous. Merci, Marco, pour tes conseils, expertise, et anecdotes sur le labo, datant d'une époque où je n'étais pas encore né. Merci également à Camille, Anne, Diane et Eric de m'avoir tant aidé sur le plan administratif. Désolé pour les plombs que j'ai dû vous faire péter à cause de mes OM et retards de réponses aux mails.

Un immense merci aux doctorant(e)s avec qui j'ai partagé mon bureau et dont le soutien a été essentiel à la réussite de cette thèse. Merci, Maurine, pour ta bonne humeur et ton énergie pétillante au quotidien. Aurélie, merci pour ta douceur et ton calme, ça a été un plaisir d'être

ton voisin de bureau. Merci, Janan, pour ton humour. Merci, Noémie, pour les barres de rire qu'on a pu avoir et pour les nombreuses pauses qu'on a pu prendre au début de ma thèse. Merci, Elyna, pour ton expertise en termes de code qui m'a sauvé plus d'une fois et nos discussions autour des galères liées à *V. aestuarianus*. Merci, Pauline, pour tes questions indiscretes et merci, Bérénice, pour toutes les conversations hors de ma zone de confort qu'on a pu avoir. Je tiens à vous encourager de tout mon cœur pour ces prochaines années, ainsi qu'à encourager les thésardes qui se lancent dans cette aventure : Anaïs, Agathe et Samira. Merci aussi aux doctorant(e)s de Perpignan, avec une mention spéciale pour toi, Léo, qui m'a toujours accueilli les bras ouverts quand j'allais à Perpignan. Ça a toujours été un plaisir d'aller grimper avec toi des 5a à côté de tes 7a. Merci tout particulièrement à Laura, avec qui j'ai eu la chance de partager chaque étape de cette thèse. Ta bonne humeur et les éclats de rire que nous avons eus ensemble ont rendu cette aventure bien plus agréable. Ça va me manquer. Je suis heureux d'avoir pu vivre cette expérience à tes côtés, et d'avoir passé bien des moments à douter sur des dilutions qu'on a pu réaliser au début de nos thèses. Je te souhaite le plus grand des courages pour cette fin de thèse, je sais qu'elle sera grandiose et que ta soutenance sera un grand moment.

Merci aux post-docs avec lesquels j'ai eu le plaisir de discuter et d'échanger pendant ma thèse. Merci tout particulièrement à Alejandro pour tes interventions dans le bureau des thésards pile aux moments où on ne bossait pas et pour ta bonne humeur et ton humour.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont apporté de la joie et de l'énergie au labo. En particulier, Mathilde Ollagnier, merci pour ton aide précieuse. Merci d'avoir été ma stagiaire, ma tac, avec laquelle j'ai beaucoup ri. Courage pour la suite de tes aventures !

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier l'ensemble de la famille anisée, un gros groupe d'amis que j'ai la chance d'avoir depuis maintenant presque 10 ans. Merci à Jérém, Antoine, Guiguiche, Toni, Laure, Aurèl, Margot, Ed, Gengen, Chatou, Soso, Sodeb', Vivi, Yoyo, Romane, Paco, Serrou et Raph. Vous m'avez permis de m'évader du quotidien parfois épuisant de la thèse. Vous avez été un soutien indispensable. Je vous aime très fort. Petit big up à toi, Margot, qui as dû me supporter pendant nos deux années de coloc.

Cette 3e année de thèse ne se serait pas passée de la même manière sans une personne particulièrement chère à mon cœur. Merci à toi, Noémie, d'être ce rayon de soleil et d'avoir su me remotiver en toutes circonstances. Les moments passés avec toi étaient comme des bulles

apaisantes hors du stress lié à la thèse. Tes conseils et tes mots rassurants m'ont permis d'avancer. Si j'en suis arrivé là, c'est en grande partie grâce à toi.

Je tiens à remercier mes parents, Philippe et Valérie de la Forest Divonne, ainsi que mon petit frère Antoine de la Forest Divonne. Merci pour vos petits plats réconfortants les week-ends où je rentrais à la maison. Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnel. Merci pour tout, depuis toujours, je vous aime de tout mon cœur.

Enfin, je tiens également à m'excuser auprès des huîtres que j'ai ponctionnées, disséquées, infectées et congelées. Désolé pour tout ce que je vous ai fait subir, mais sachez que votre sacrifice n'aura pas été vain et qu'il contribuera à en sauver bien d'autres.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	10
PARTIE 1 : ETAT DE L'ART	16
A) L'HUÎTRE DU PACIFIQUE <i>CRASSOSTREA (MAGALLANA) GIGAS</i>	16
1. Histoire de l'ostréiculture en France et intérêt économique	16
2. Production et pratiques culturelles.....	18
3. Maladies des huîtres et épisodes de mortalité	18
B) BIOLOGIE ET IMMUNITÉ DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	19
1. Phylogénie de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	19
2. Anatomie, physiologie et développement.....	23
3. Le système immunitaire de l'huître.....	25
a) Les cellules immunitaires : les hémocytes	25
b) Le système immunitaire inné de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	30
Reconnaissance du non-soi	31
i) Toll like receptor	32
ii) Retinoic acid-Inducible Gene 1 like receptors.....	33
iii) Nucleotides Oligomerisation Domain like receptors	34
iv) PeptidoGlycan Recognition Protein	35
v) Lectines.....	37
Voies de signalisation de la réponse immunitaire	41
i) La voie des TLR/NF-κB	42
ii) La voie des Mitogen Activated Protein Kinases	44
iii) La réponse antivirale via la voie JAK/STAT	47
iv) La voie du complément	49
v) La cascade de la pro-phénoloxydase	52
c) L'immunité cellulaire chez l'huître	53
La phagocytose.....	53
Les morts cellulaires programmées.....	59
L'encapsulation et la mélanisation.....	62
d) L'immunité humorale	64
Peptides et protéines antimicrobiennes.....	65
Les Lysozymes.....	68
Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	69
f) Plasticité du système immunitaire de <i>Crassostrea gigas</i> lors de son développement.....	72
g) Renouvellement cellulaire lors de l'hématopoïèse.....	75
C) PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE IMMUNITAIRE ET IMPACT SUR LA SANTÉ DES HUÎTRES	78
1. L'anthropocène et ses conséquences sur l'ostréiculture.....	78
a) Les métaux lourds et l'effet particulier du Cuivre	78
b) Les perturbateurs organiques (pesticides, hydrocarbures, micro-plastiques, etc.)	80
2. Effet de stress abiotiques environnementaux sur l'immunité de <i>Crassostrea gigas</i>	81
a) Impact de l'acidification des océans sur la réponse immunitaire de <i>Crassostrea gigas</i>	81
b) Effets des variations de salinité sur la physiologie de l'huître	83
c) Influence de la température sur les interactions huître - micro-organismes pathogènes	84
3. Impact des agents pathogènes sur l'immunité de l'huître.....	86
a) Les protistes comme micro-organismes pathogènes majeurs chez <i>O. edulis</i> , <i>C. angulata</i> , et <i>C. virginica</i>	88
b) Le virus OsHV1 μ var et Le Pacific Oyster Mortality Syndrom	89
c) Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	91
Clade <i>Splendidus</i> : Les souches cytotoxiques de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 et <i>V. Crassostreae</i> J2-9.	92
Clade <i>Harveyi</i> : les espèces colonisatrices <i>V. harveyi</i> et <i>V. rotiferianus</i>	93
Clade <i>Anguillarum</i> : <i>V. aestuarianus</i> comme micro-organisme pathogène primaire de <i>C. gigas</i>	94
i) Niche écologique et cycle infectieux.	94
ii) Tropisme de <i>V. aestuarianus</i> et réponse de l'hôte.	95
PROBLEMATIQUE DE THESE.....	99

PARTIE 2 : RESULTATS.....	104
CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA DIVERSITÉ CYTOLOGIQUE, FONCTIONNELLE ET TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES IMMUNITAIRES DE <i>C. GIGAS</i>	104
<i>Contexte et objectifs</i> :	104
<i>Publication 1</i>	111
CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'IMPACT D'UNE INFECTION PAR <i>V. AESTUARIANUS</i> SUR LA COMPOSITION ET LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES DE <i>C. GIGAS</i>	175
<i>Contexte et objectifs</i> :	175
<i>Publication 2</i>	181
PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	220
DISCUSSION	220
NOS TRAVAUX ONT PERMIS DE DÉFINIR LES POPULATIONS HÉMOCYTAIRES CHEZ L'HUÎTRE ET D'ÉTABLIR UN ATLAS DE RÉFÉRENCE	220
L'UTILISATION DES DONNÉES DE SCRNA-SEQ NOUS A PERMIS DE PROPOSER UNE ONTOLOGIE HÉMOCYTAIRE CHEZ <i>C. GIGAS</i>	225
L'IDENTIFICATION DE SEPT TYPES HÉMOCYTAIRES PERMET DE CLARIFIER LEURS RÔLES LORS DE CERTAINES PATHOLOGIES OSTRÉICOLES	226
L'HOMÉOSTASIE HÉMOCYTAIRE EST MODIFIÉE LORS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE À <i>V. AESTUARIANUS</i>	228
<i>L'infection par <i>V. aestuarianus</i> entraîne une réponse hémostatique de <i>C. gigas</i></i>	229
<i>Nous avons caractérisé la réponse transcriptomique à <i>V. aestuarianus</i> dans des conditions réalistes d'infection</i>	231
<i><i>Vibrio aestuarianus</i> empêche l'induction d'une réponse immunitaire</i>	232
<i>Les voies de l'autophagie sont activées en réponse à une infection par <i>Vibrio aestuarianus</i></i>	234
PERSPECTIVES	235
UTILISER LE SCRNA-SEQ POUR CARACTÉRISER LE SITE HÉMATOPOÏÉTIQUE CHEZ <i>C. GIGAS</i>	235
UTILISATION DE L'ATLAS CYTOLOGIQUE ET DES MÉTHODES TRANSCRIPTOMIQUES POUR ÉTUDIER LES PATHOLOGIES OSTRÉICOLES.	236
L'ANALYSE HÉMOCYTAIRE COMME MÉTHODE POUR DÉTECTER DES STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES CHEZ <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	238
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	243

Liste des figures

Figure 1 : Historique de la production ostréicole de <i>Ostrea edulis</i>, <i>Crassostrea angulata</i> et <i>Crassostrea gigas</i> (en millier de tonnes) de 1900 à 2006 en France	17
Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les principales classes de mollusques à l'exception du taxon des Aculifera, dont les relations ne sont pour le moment pas connues.	20
Figure 3 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes familles de bivalves	22
Figure 4 : Anatomie de <i>C. gigas</i> après retrait de la valve (coquille) droite	24
Figure 5: Cycle de vie de l'huître creuse, <i>C. gigas</i>	25
Figure 6 : Voies de différenciations chez <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	26
Figure 7 : Diversité d'approches expérimentales qui ont conduit à la classification des hémocytes chez <i>C. gigas</i>	29
Figure 8 : Structure d'un Toll-like receptor (TLR)	33
Figure 9 : Structure des Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-1 like receptors (RLRs) chez l'homme	34
Figure 10 : Structure des Nucleotides Oligomerisation Domain (NOD)-like receptors (NLRs) chez l'homme	35
Figure 11 : Structure des PeptidoGlycan Recognition Protein (PGRPs).	37
Figure 12 : Structure des principales lectines caractérisées chez les bivalves	39
Figure 13 : Structure des FREPs	41
Figure 14 : Voie Toll/NF-κB chez l'homme	43
Figure 15 : Activation des MAPKs par la voie des TLRs et rôle dans l'immunité innée chez l'homme	45
Figure 16 : Voie de signalisation canonique JAK/STAT	48
Figure 17 : La voie du complément chez l'homme	51
Figure 18 : Cascade de la prophénoloxydase chez les crustacés	53
Figure 19 : Maturation du phagosome chez les vertébrés	56
Figure 20. Résumé schématique des événements clés de la formation et de la maturation du phagosome chez <i>C. gigas</i>	58
Figure 21 : Représentation des principales voies de signalisation et d'exécution de l'apoptose chez les mollusques	60
Figure 22 : Processus d'encapsulation et de mélanisation chez les insectes	63
Figure 23 : Structure du peptidoglycane et site de liaison des lysozymes	69
Figure 24 : Voies de signalisation impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène chez <i>C. gigas</i>	71
Figure 25 : Hématopoïèse chez <i>Drosophila melanogaster</i>	76
Figure 26 : Changements passés et projetés de la concentration atmosphérique en CO₂ et du pH océanique	82
Figure 27 : Effet des perturbateurs abiotiques sur la physiologie et le système immunitaire de <i>C. gigas</i> 86	
Figure 28: Historique de la production d'huître <i>Ostrea edulis</i> (bleu), <i>Crassostrea angulata</i> (rouge) et <i>Crassostrea gigas</i> (vert) en France	87
Figure 29 : Représentation schématique des étapes conduisant au POMS.	90
Figure 30 : Arbre phylogénétique des principaux représentants des différents clades de <i>Vibrio</i>	92
Figure 31 : Mécanismes de cytotoxicité hémocytaire de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 et <i>V. crassostreae</i> J2-9. 93	
Figure 32 : Etapes successives de la pathogénèse induite par <i>V. aestuarianus</i>.	96
Figure 33 : Principales pathologies bactériennes et virale affectant <i>C. gigas</i>	98
Figure 34 : Ontologie proposée chez <i>C. gigas</i> d'après l'analyse de scRNA-Seq, de cytologie, et l'analyse fonctionnelle	225

Liste des abréviations

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique (DNA : DeoxyriboNucleic Acid)
- AMP : AntiMicrobial Peptide (Peptide antimicrobien)
- ARN : Acide RiboNucléique (RNA : RiboNucleic Acid)
- BIR : Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat (Répétition inhibitrice de l'apoptose virale)
- CARD : CAspase Recruitment Domain (Domaine de recrutement de la caspase)
- CARDIF : Caspase Activation Recruitment Domain adaptor Inducing IFN- β (Adaptateur de recrutement et d'activation des caspases induisant l'IFN- β)
- CD : Cluster of Differentiation (Groupe de différenciation)
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC : Major Histocompatibility Complex)
- COI : Cytochrome c Oxydase subunit I (Sous-unité I de la cytochrome c oxydase)
- CRD : Cysteine-Rich Domain (Domaine riche en cystéine)
- C1q : Protéine du complément C1q
- C1qDC : C1q Domain Containing (Protéines contenant un domaine C1q)
- DEAD : Asp-Glu-Ala-Asp box (Famille de protéines hélicases à domaine DEAD)
- DIABLO : Direct IAP Binding protein with LOw pI (Protéine liant directement IAP avec un faible pI)
- DOPA : 3,4-DihydrOxyPhénylAlanine
- EcSOD : Extracellular SuperOxide Dismutase (Superoxyde dismutase extracellulaire)
- ECSIT : Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathway (Intermédiaire de signalisation conservé évolutivement dans la voie Toll)
- ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase (Kinase régulée par les signaux extracellulaires)
- FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting (Tri des cellules activé par la fluorescence)
- FADD : Fas-Associated Death Domain (Domaine de mort associé à Fas)
- FBG : FiBrinogen-related Domain (Domaine apparenté au fibrinogène)
- FREP : Fibrinogen-RElated Protein (Protéine apparentée au fibrinogène)
- GNBP : Gram-Negative Binding Protein (Protéine liant les bactéries à Gram négatif)
- GTP : Guanosine TriPhosphate
- IKK : I κ B Kinase (Kinase I κ B)
- I κ B : Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B (Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B)
- IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (Kinase associée au récepteur de l'interleukine-1)
- IRF : Interferon Regulatory Factor (Facteur régulateur de l'interféron)

ISG : Interferon-Stimulated Gene (Gène stimulé par l'interféron)

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espaceur transcrit interne)

JNK : c-Jun N-terminal Kinase (Kinase N-terminale de c-Jun)

KD : Knock-Down (Organisme dont l'expression d'un ou plusieurs gènes est réduite)

LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : Leucine-Rich Repeat (Répétitions riches en leucine)

MAVS : Mitochondrial AntiViral-Signaling protein (Protéine de signalisation antivirale mitochondriale)

MBL : Mannose-Binding Lectin (Lectine liant le mannose)

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 (Protéine associée à la différenciation du mélanome 5)

MEKK1 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1 (Kinase activée par les mitogènes 1)

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88 (Réponse primaire de différenciation myéloïde 88)

NACHT : Domain found in NAIP, CIITA, HET-E, and TP1 (Domaine NACHT)

NLR : NOD-Like Receptor (Récepteur de type NOD)

NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (Facteur nucléaire kappa B)

NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain (Domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides)

OsHV-1 μ Var : Ostreid Herpesvirus 1 Microvariant

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern (Motif moléculaire associé aux pathogènes)

PGRP : Peptidoglycan Recognition Protein (Protéine de reconnaissance des peptidoglycanes)

PI4K : Phosphatidylinositol 4-Kinase (Kinase de phosphatidylinositol 4)

PO : PhénolOxydase

POMS : Pacific Oyster Mortality Syndrom (Syndrome de mortalité de l'huître du Pacifique)

PPAF : ProPhenoloxidase-Activating Factor (Facteur d'activation de la pro-phénoloxydase)

PPD : Para-Phenylene Diamine

PRR : Pattern Recognition Receptor (Récepteur de reconnaissance de motifs)

ProPO : ProPhenolOxydase (Pro-phénoloxydase)

PYD : PYrin Domain (Domaine pyrine)

RAG : Recombination Activating Genes (Gènes d'activation de la recombinaison)

RD : Repressor Domain (Domaine Répresseur)

RHD : Rel Homology Domain (Domaine d'homologie Rel)

RIG : Retinoic acid-Inducible Gene (Gène induit par l'acide rétinoïque)

RIP kinase : Receptor-Interacting Protein kinase (Protéine kinase interagissant avec les récepteurs)

RLR : RIG-Like Receptor (Récepteur de type RIG)

RNAi : RNA interference (Interférence de l'ARN)

scRNA-Seq : Single-Cell RNA Sequencing (Séquençage de l'ARN sur cellule unique)

Smac : Second mitochondria-derived activator of caspases (Second activateur des caspases dérivé des mitochondries)

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription (Transducteur de signal et activateur de transcription)

TLR : Toll-Like Receptor (Récepteur de type Toll)

TNF : Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor (Récepteur du facteur de nécrose tumorale)

TRADD : TNF receptor-Associated Death Domain (Domaine de mort associé au récepteur TNF)

TRAF : TNF Receptor-Associated Factor (Facteur associé au récepteur TNF)

VISA : Virus-Induced Signaling Adaptor (Adaptateur de signalisation induite par les virus)

VLRs : Variable Lymphocyte Receptor (Récepteur lymphocytaire variable)

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

A) L'huître du pacifique *Crassostrea (Magallana) gigas*

Crassostrea gigas, également appelée huître du Pacifique ou huître creuse japonaise est un mollusque bivalve de la famille des Ostreidae. Le genre *Crassostrea* fait aujourd'hui débat depuis la publication d'une nouvelle classification des huîtres se basant pour la première fois sur la séquence de l'ARNr ITS2, divisant le genre *Crassostrea* en 3 genres : *Crassostrea*, *Talonostrea* et *Magallana* dans lequel se trouve *Magallana gigas* (précédemment *Crassostrea gigas*) (Salvi et Mariottini 2016). Malgré cette nouvelle classification, l'appellation *Magallana* ne fait aujourd'hui pas consensus (Backeljau 2018; Salvi et Mariottini 2021) et de nombreuses publications utilisent toujours *Crassostrea gigas* comme appellation du modèle d'étude utilisé dans ce travail de thèse. Ainsi, ce manuscrit conservera le nom de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793 – Taxonomy ID : 29159) pour dénommer l'huître du Pacifique (Backeljau 2018; Salvi et Mariottini 2021).

1. Histoire de l'ostréiculture en France et intérêt économique

Les premières traces de cultures ostréicoles remontent à deux millénaires. En effet, Aristote et Xénocrate (400 – 300 av. J.C.) reportaient déjà les différentes méthodes de production ostréicoles et les localisations où les huîtres poussaient plus vite. Les romains en 150 av. J.C. ont hérité de la culture de l'huître des grecs, et ont pu développer des méthodes de culture utilisées aujourd'hui comme la suspension des huîtres dans l'eau pour mieux contrôler leur croissance. Avec l'expansion de l'empire romain, les pratiques ostréicoles ont pu se répandre en Europe. En Chine, la culture de l'huître est mentionnée dès la dynastie Han (206 av. J.C. – 220 ap. J.C.) (Botta et al. 2020).

La culture de l'huître en France et en Europe, s'est historiquement appuyée sur l'élevage de plusieurs espèces (**Figure 1**). Jusqu'en 1925, *Ostrea edulis*, l'huître plate, était principalement produite. Au Moyen Age déjà, les lits naturels de cette huître étaient exploités, et des activités ostréicoles sont mentionnées dans le sud-ouest de la France, dans les baies de l'Aiguillon et de Bourgneuf au X^{ème} siècle (Gouletquer et Heral 1997). Au XVII^{ème} siècle, les huîtres juvéniles étaient pêchées sur des rochers dans leur milieu naturel et mises dans des bassins ostréicoles pour finir leur développement (Gouletquer et Heral 1997). *O. edulis* fut progressivement remplacée par *Crassostrea angulata*, espèce dominante en France jusqu'à la fin des années 1960. Originaires du Japon, *C. gigas* a été introduite en France en 1966 pour remplacer les stocks d'huîtres indigènes, dont notamment *O. edulis* et *C. angulata*, deux espèces épuisées par la

surexploitation ou les maladies. *C. gigas* représente aujourd’hui 98% de la production ostréicole mondiale (Segarra et al. 2010). *Crassostrea gigas* étant capable de s’adapter bien plus facilement à des conditions environnementales changeantes, elle représente un atout important pour l’ostréiculture (Tan et al. 2023). Cependant, cette capacité d’adaptation représente un risque pour les écosystèmes, car la dispersion de larves des installations ostréicoles a conduit *C. gigas* à se développer de manière invasive à travers toute l’Europe, d’où elle n’est pas indigène. *C. gigas* peut ainsi être classée comme une espèce invasive (Tan et al. 2023).

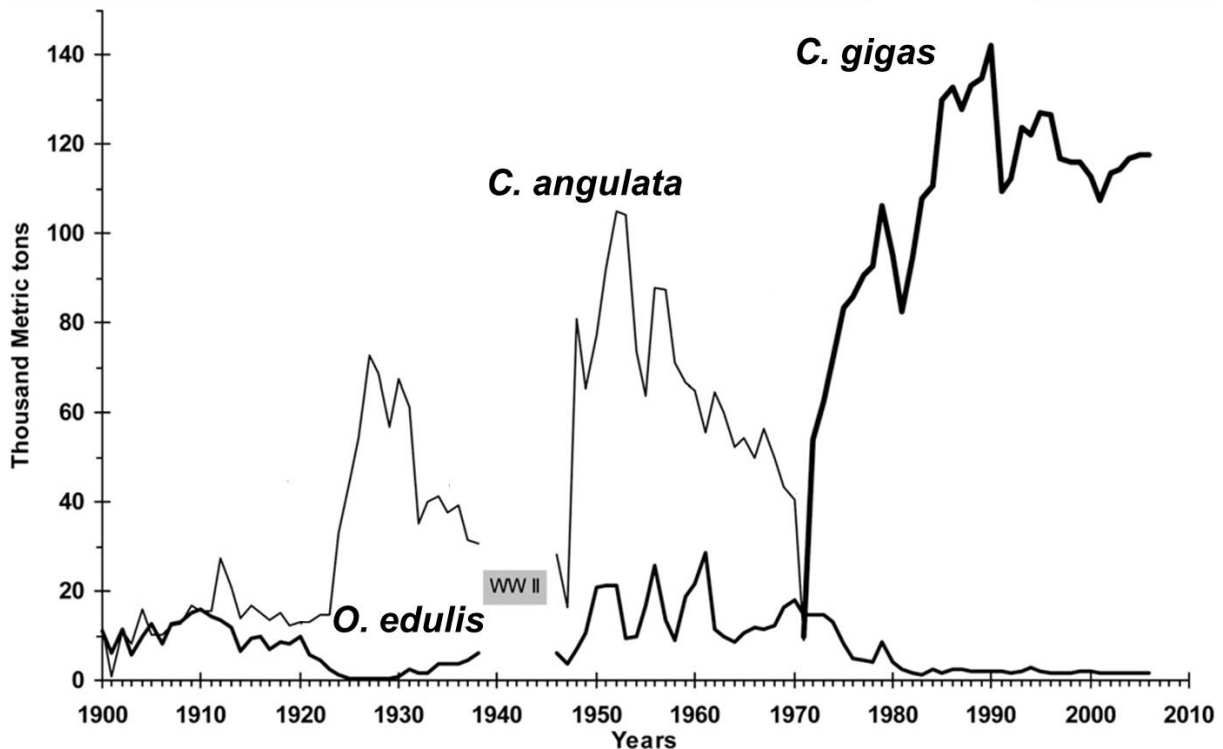


Figure 1 : Historique de la production ostréicole de *Ostrea edulis*, *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* (en millier de tonnes) de 1900 à 2006 en France. *O. edulis* et *C. angulata* furent les huîtres les plus cultivées en France jusque dans les années 1970. Due à l’émergence de nombreux agents pathogènes compliquant la culture de ces deux espèces, *C. gigas* fut ensuite introduite à partir des années 1970. Elle est aujourd’hui l’huître la plus cultivée en France (Adapté de Buestel et al. 2009).

La culture de *C. gigas* s’est étendue à l’échelle mondiale jusqu’en Amérique du Nord, en Europe, en Australie, en Chine et en Afrique du Sud, lui conférant aujourd’hui un intérêt socio-économique majeur (Mercer, Gennari, et Lovatelli 2024). Notamment, la production mondiale s’élève à 6 millions de tonnes par an pour une valeur économique équivalente à 7 milliards de dollars (Mercer, Gennari, et Lovatelli 2024). La production mondiale est dominée par la Chine qui produit 89 % des huîtres dans le monde. La France reste le pays leader dans la production de cette huître en Europe et la 4^{ème} dans le monde (Mercer, Gennari, et Lovatelli 2024).

2. Production et pratiques culturelles

La culture de l'huître en France s'étend à de nombreuses régions, principalement dans la lagune de Thau sur le pourtour méditerranéen, et tout le long de la côte Atlantique du sud-ouest au nord de la France (baie d'Arcachon, estuaire de Gironde, baie de Marennes-Oléron, baie de l'Aiguillon, baie de Bourgneuf, sud et nord de la Bretagne, golfe de Saint Malo et Cherbourg) (Gouillet et Heral 1997). Plusieurs techniques culturelles sont employées : la culture sur fond (culture des huîtres directement sur le fond marin), la culture hors fond (filets plastiques attachés à des tréteaux dans la zone intertidale) et la culture en suspension (fixation des huîtres sur des cordes ou dans des paniers dans la zone intertidale). L'utilisation de ces techniques dépend de la zone géographique, de l'espèce d'huître produite et de sa susceptibilité face aux micro-organismes pathogènes, ainsi que de la main d'œuvre disponible dans les entreprises ostréicoles (Buestel et al. 2009).

Les naissains sont produits en écloserie et la plupart des huîtres commercialisées sont triploïdes (3 jeux de chromosomes). Ces huîtres triploïdes sont produites par reproduction d'huîtres diploïdes (2 jeux de chromosomes) avec des huîtres tétraploïdes (4 jeux de chromosomes). Ces animaux sont stériles en raison de la très forte diminution du nombre de gamètes produites) et présentent un intérêt en période de reproduction où les huîtres diploïdes ont une chair de moins bonne qualité (Chi, Xu, et Li 2024). Les huîtres triploïdes présentent également une croissance plus rapide ce qui les rend commercialisables plus tôt. Cependant, le taux de survie de ces animaux est plus faible aux stades adulte et larvaire (Chi, Xu, et Li 2024; Yongguo Li et Li 2022).

3. Maladies des huîtres et épisodes de mortalité

Malgré l'utilisation de différentes techniques afin d'optimiser la production ostréicole (techniques culturelles et utilisation d'huîtres de ploïdies variables), cette dernière est en déclin depuis les dernières décennies. Parmi les causes responsables de ce déclin : la pêche intensive, la pollution et l'acidification des océans dus aux changements climatiques conduisent à une augmentation d'épisodes de mortalité massive dus à des agents pathogènes (Rick et al. 2016; Rowley et al. 2024). De nombreux micro-organismes pathogènes affectent la production ostréicole. *O. edulis* est principalement impactée par des parasites du genre *Bonamia* et *Marteilia* (I. Arzul et al. 2014; Montes, Anadón, et Azevedo 1994). Un iridovirus affectant *C. angulata* a été responsable de la quasi-éradication de cette espèce et de sa disparition dans les parcs ostréicoles français dans les années 1970 (Comps et Duthoit 1979). Chez *C. gigas*, le virus OsHV-1 μ Var cause des mortalités massives chez les juvéniles en déclenchant le syndrome

de mortalité de l'huître du Pacifique (Pacific Oyster Mortality Syndrom, POMS), associé à des infections par des bactéries du genre *Vibrio* (*Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio rotiferianus*) (Rubio et al. 2019a; Martenot et al. 2011; Oyanedel et al. 2023). À l'âge adulte, *Vibrio aestuarianus* est responsable de nombreuses mortalités massives chez *C. gigas*, pouvant, dans certains cas, détruire la totalité d'une production ostréicole (Matthieu Garnier, Labreuche, et Nicolas 2008). Près de 70% de mortalité ont notamment été observées dans la lagune de Thau en période estivale en 2023.

B) Biologie et immunité de *Crassostrea gigas*

1. Phylogénie de l'huître *Crassostrea gigas*

L'huître *C. gigas* est principalement connue pour son intérêt culinaire. Au niveau phylogénétique cet invertébré fait partie du super-phylum des lophotrochozoaires appartenant au sous-royaume des eumétazoaires. Les animaux composant ce phylum, terrestres comme aquatiques, se distinguent par deux caractéristiques principales : la présence d'un lophophore, une structure ciliée présente autour de la bouche et facilitant la capture de particules, et la présence d'un stade trochophore pendant leur développement larvaire. La phylogénie de ce groupe est aujourd'hui source de débats, car elle dépend des méthodologies employées pour classifier les organismes de ce super-phylum. Toutefois, grâce à une combinaison d'approches incluant l'analyse des séquences codantes pour l'ARN 18S, des études morphologiques, ainsi que des analyses du gène *Hox* (gène très conservé parmi les taxons phylogénétiques distants de ce super-phylum), il est aujourd'hui admis que ce super-phylum est composé des phylums suivants : Gnathostomulida, Chaetognatha, Monogononta, Bdelloidea, Seison, Acanthocephala, Micrognathozoa, Dicyemida, Cycliophora, Entoprocta, Gastrotricha, Brachiopoda, Bryozoa, Phoronida, Annelida, Nemertea, Platyhelminthes et Mollusca (Bleidorn 2019).

Le phylum des mollusques est le 2^{ème} plus grand phylum des invertébrés et le plus diversifié en termes de morphologie. Cette diversité se traduit par une difficulté concernant la caractérisation de leur phylogénie. Les premières descriptions phylogénétiques, parues dès 1926, se basaient uniquement sur des ressemblances morphologiques de fossiles. Même avec l'avènement d'approches moléculaires au début des années 2000, la communauté scientifique n'a pas pu parvenir à un consensus concernant le lien de parenté des espèces composant ce phylum, et ce, malgré des méta-analyses visant à prendre en compte ces deux approches (Sigwart et Lindberg 2015). Malgré ce dissensus, les classes qui composent ce phylum font l'unanimité. Huit classes d'invertébrés composent le phylum des mollusques : Bivalvia, Caudofoveata, Cephalopoda, Gastropoda, Monoplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda et Solenogastres (**Figure 2**).

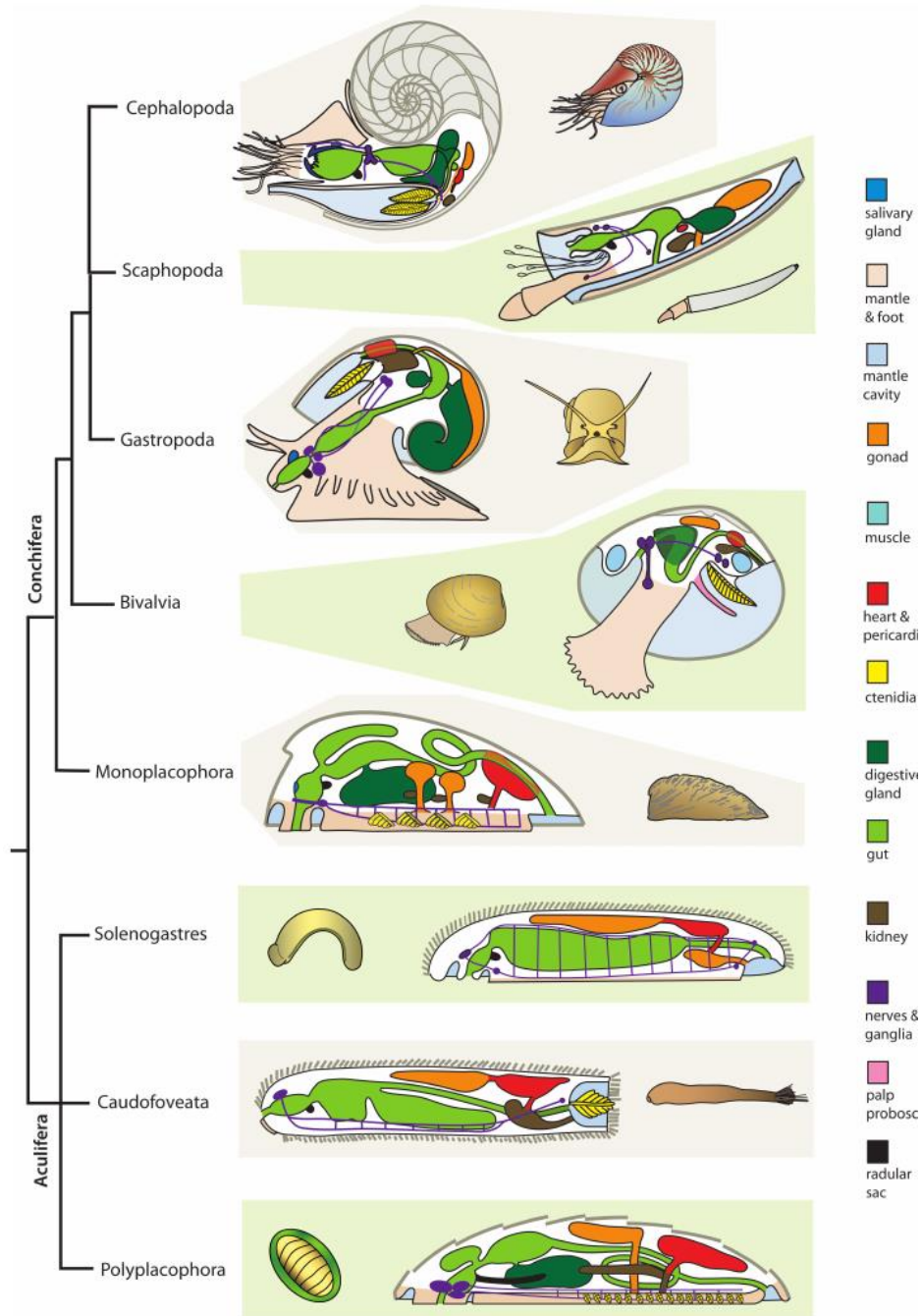


Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les principales classes de mollusques à l'exception du taxon des Aculifera, dont les relations ne sont pour le moment pas connues. Les schémas illustrent les différences morphologiques, représentent l'anatomie et les organes retrouvés chez ces différentes classes de mollusques (glande salivaire, manteau et pied, cavité du manteau, gonades, muscles, cœur et cavité péricardique, ctenidium ou branchie, glandes digestives, intestin, reins, ganglions nerveux et nerfs, les palpes labiales, et radula ou sac). (Adapté de Ponder, Lindberg, et Ponder 2020).

Les bivalves sont une classe de mollusques d'eau douce ou de mer vivant, dans la colonne d'eau, attachés à un substrat, ou dans le sédiment. Les caractéristiques physiologiques principales de ces animaux sont d'avoir un corps enveloppé de deux coquilles (valves), dont

l'ouverture et la fermeture dépendent de la contraction d'un ou de deux muscles adducteurs. Ces deux coquilles sont reliées au niveau du ligament de la charnière, une structure à partir de laquelle la coquille s'agrandit au cours du développement de l'animal. Les bivalves ne possèdent pas de tête ou de radula (organe buccal composé de dents permettant de détacher la nourriture d'un substrat) mais des branchies leur permettant de filtrer l'eau pour respirer et une bouche ou un siphon, leur permettant de se nourrir de particules respectivement en suspension dans la colonne d'eau ou dans le sédiment (Seilacher 1985). On retrouve chez les bivalves une grande diversité d'animaux (huîtres, moules, couteaux, coques, panopes, anomies, arcas, lucinidae, tarets, coquilles Saint-Jacques, pétoncles et palourdes) possédant des caractéristiques morphologiques distinctes, leur ayant permis une adaptation à différents milieux écologiques au cours de l'évolution. Tout comme pour la phylogénie des lophotrochozoaires et des mollusques, les classifications par critères morphologiques et moléculaires des mollusques divergent. Cependant, la dernière classification en date, se basant sur le séquençage de cinq gènes conservés parmi les représentants de cette classe (un gène codant pour une protéine nucléaire (histone H3), un gène codant pour une protéine mitochondriale (COI), deux gènes ribosomiques nucléaires (ARNr 18S complet et un fragment de 2,2 kb de l'ARNr 28S) et un gène ribosomique mitochondrial (ARNr 16S)), a permis de replacer dans un contexte phylogénétique l'ensemble des familles qui la composent (**Figure 3**) (Combosch et al. 2017).

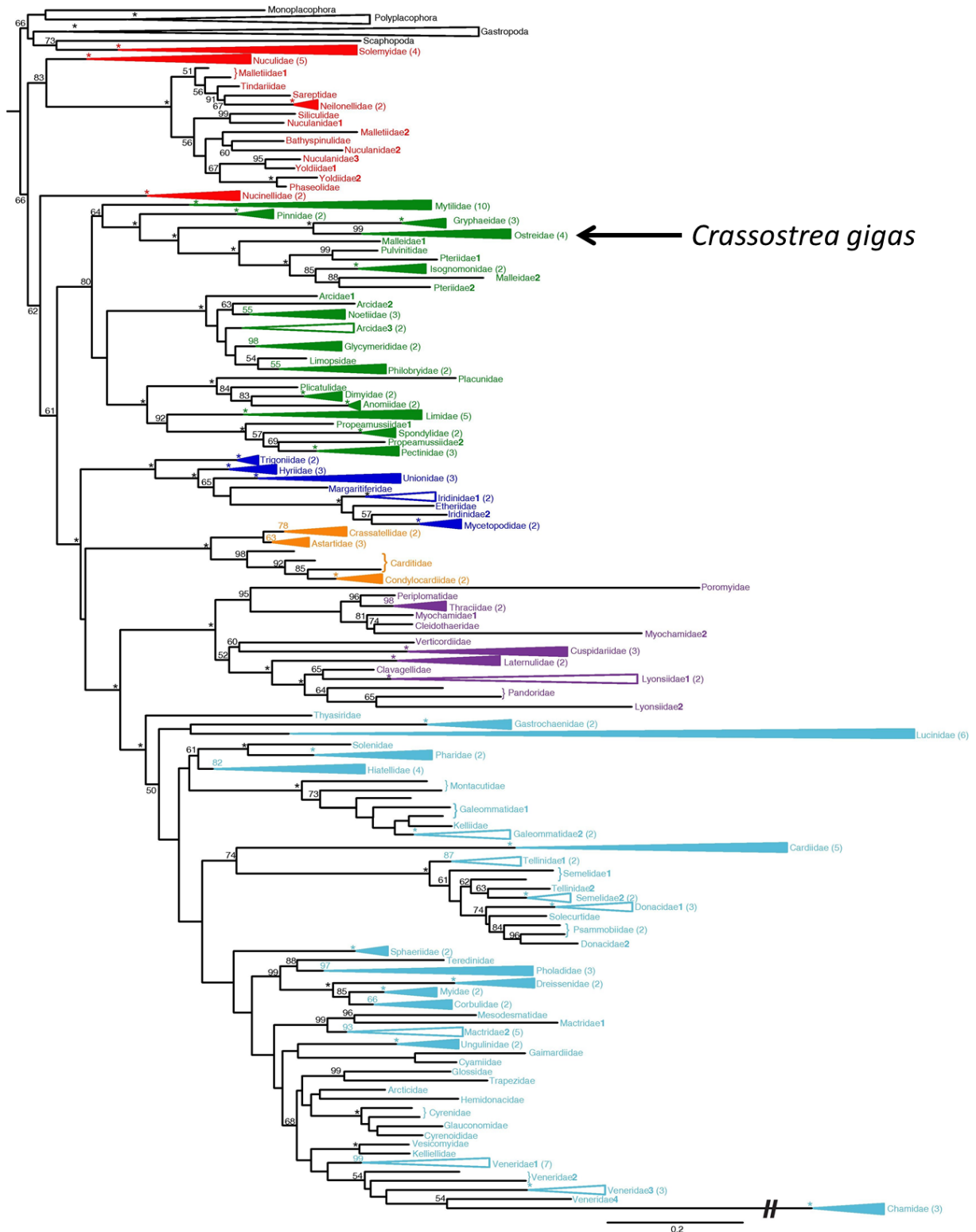


Figure 3 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes familles de bivalves. L'arbre représente différents clades de différentes couleurs: rouge : Protobranchia, vert : Pteriomorpha, bleu foncé : Palaeoheterodonta, orange : Archiheterodonta, violet : Anomalodesmata, bleu clair : Imparidentia. *Crassostrea gigas* fait partie de la famille des Ostreidae (clade Pteriomorpha) (Adapté de Combosch et al. 2017).

2. Anatomie, physiologie et développement

L'anatomie de *C. gigas* est similaire à celle d'autres bivalves de ce groupe et lui permet d'évoluer dans des environnements marins changeants. À l'âge adulte, *C. gigas* possède un corps mou enveloppé de deux valves reliées par un muscle adducteur. Ces valves lui permettent de se protéger face à des prédateurs, ou encore de faire face à des conditions environnementales défavorables à son développement (**Figure 4**). *C. gigas* possède un manteau qui recouvre sa chair et qui est impliqué dans la calcification de la coquille (Miossec, Le Deuff, et Gouletquer 2009). Les branchies situées à proximité du manteau permettent à l'huître de filtrer l'eau pour respirer et de guider, grâce à des cellules ciliées, les particules qu'elle consomme vers les palpes labiaux et la bouche. Le système digestif de l'huître est composé d'une bouche, d'un œsophage et d'un estomac relié à des glandes digestives qui permettent la sécrétion d'enzymes nécessaires à la digestion. Le bol alimentaire traverse ensuite l'intestin ascendant et descendant, qui entoure la glande digestive, pour rejoindre le rectum et l'anus, situés à proximité du muscle adducteur sur le côté dorsal de l'huître.

Le système circulatoire de l'huître assure la des nutriments issus de la digestion dans ses autres organes et la diffusion de l'oxygène. Ce système comprend le cœur, situé dans la cavité péricardique, ainsi qu'un système semi-ouvert de vaisseaux conducteurs d'hémolymphe dans lequel se trouvent les cellules immunitaires appelées hémocytes. Au niveau physiologique, ces cellules sont impliquées dans la défense de l'huître, l'acheminement des nutriments vers les organes (Schmitt et al. 2012), le recyclage et le renouvellement cellulaire (Mao et al. 2020), et sont aussi impliquées dans la bio-minéralisation de la coquille (Mount et al. 2004; Ivanina et al. 2017).

Enfin, les gonades sont situées entre la cavité péricardique et le système digestif et représentent jusqu'à 70 % de la masse sèche de l'animal lors de la reproduction en période estivale (Miossec, Le Deuff, et Gouletquer 2009).

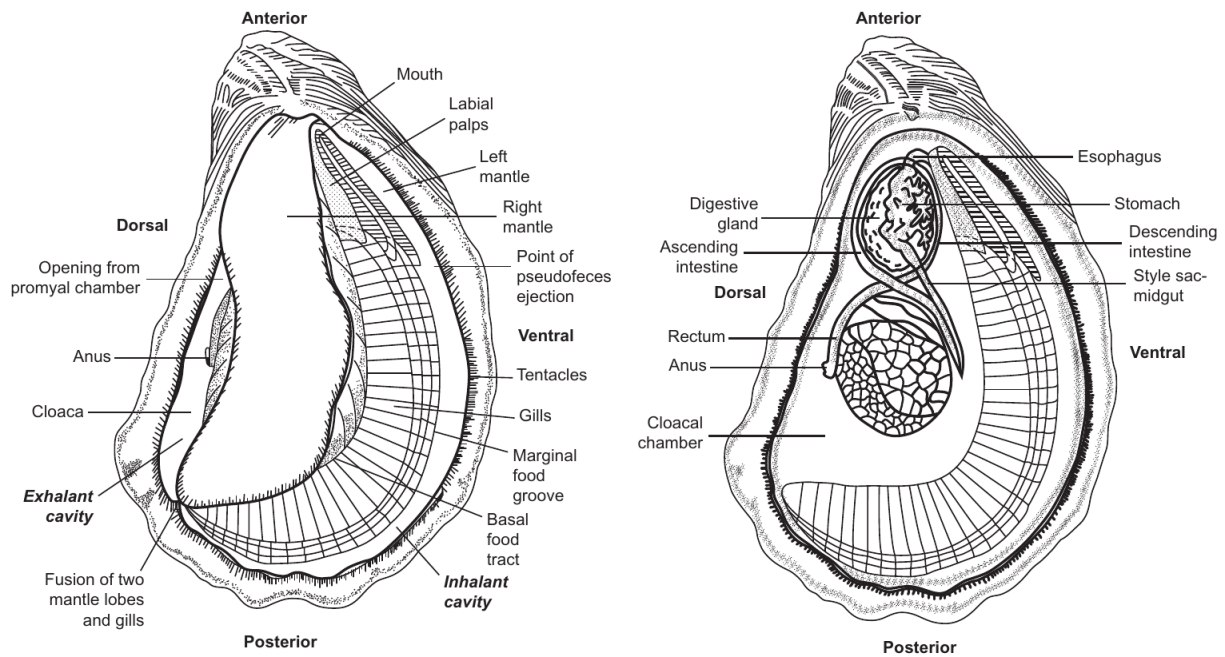


Figure 4 : Anatomie de *C. gigas* après retrait de la valve (coquille) droite. Sont mis en évidence ici les organes permettant la nutrition via la filtration de particules en suspension (schéma de gauche) et le système digestif (schéma de droite) (Adapté de Bayne 2017).

Crassostrea gigas se reproduit par la libération de gamètes dans l'environnement extérieur, conduisant après fécondation à deux modalités différentes de développement : l'une planctonique et l'autre sessile. Les huîtres ne possèdent pas de chromosomes sexuels, ce qui se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme dit séquentiel, correspondant à des maturations déphasées des lignées mâles et femelles, et donc à une sexualité alternative entraînant un possible changement de sexe au cours de la vie de l'huître (Broquard et al. 2020). Chez *C. gigas*, la gamétogenèse progresse à un rythme très lent pendant la période hivernale et s'accélère en période estivale (Gerard et al. 1995). La fécondation est externe chez ce bivalve, et pendant les six premières heures après fécondation, l'embryon suit un mode de vie planctonique, libre dans l'environnement. C'est dans ce mode de vie que l'embryon passe successivement par les stades cellulaires embryonnaires (1 heure post-fécondation - hpf) au stade morula (2 hpf), blastula (3 hpf) et enfin gastrula (6 hpf). Le passage du mode de vie planctonique au mode larvaire est caractérisé par le développement du stade gastrula au stade trochophore (12 hpf). C'est à ce stade de développement que le muscle adducteur se forme (Vogeler et al. 2016). Vingt-sept heures après fécondation, le stade trochophore se développe en larve « D », puis en larve véligère (7 jours post fécondation - jpf) pour enfin se développer en stade pédivéligère (15 jpf). Ce stade est caractérisé par la présence d'un pied qui permet à la larve de se fixer sur un substrat et d'entamer sa métamorphose en huître naissant (3 mois post

fécondation). À ce stade, l'huître adopte un mode de vie fixé et se développe pour devenir adulte (Tirape et al. 2007) (Figure 5).

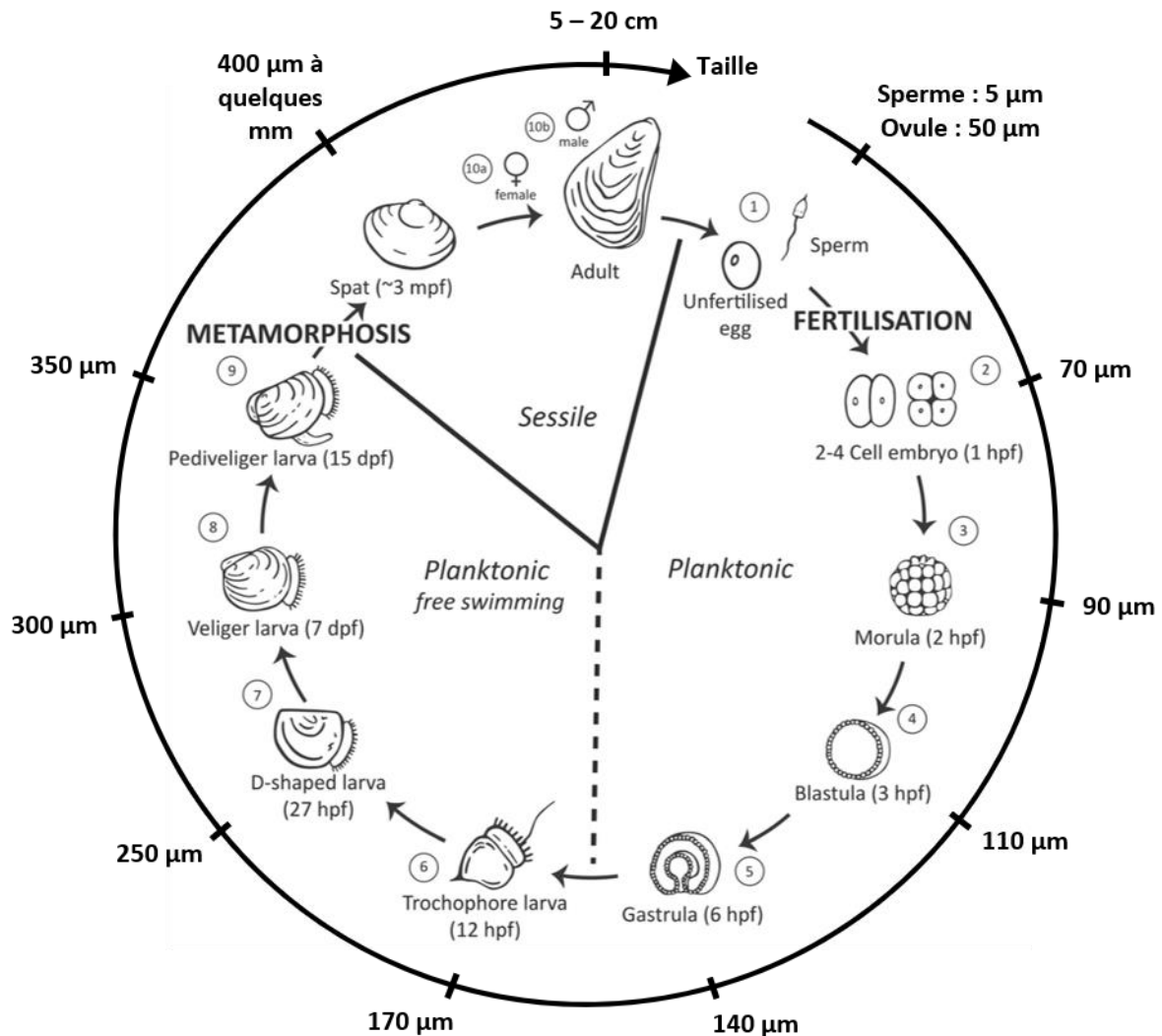


Figure 5: Cycle de vie de l'huître creuse, *C. gigas*. (1) Gamètes (Sperme : 5 µm, Ovule : 50 µm), (2) 2-4 cellules embryonnaires (70 µm), (3) Morula (90µm), (4) Blastula (110 µm), (5) Gastrula (140 µm), (6) Larve trochophore (170 µm), (7) Larve D (250 µm), (8) Larve véligère (300 µm), (9) Larve pédivéligère (350 µm), (10) Naissain (400 µm à quelques centimètres), et Adulte (5 à 20 cm) (10a) femelle ou (10b) mâle (Adapté de Vogeler et al. 2016).

3. Le système immunitaire de l'huître

a) Les cellules immunitaires : les hémocytes

Les hémocytes sont les cellules immunitaires circulant dans l'hémolymphe des invertébrés. Composées de différents types, ces cellules jouent un rôle principalement dans les réactions de défense de l'hôte face aux micro-organismes. Chez les invertébrés modèles comme la drosophile, les crevettes ou encore le moustique, les types hémocytaires sont bien décrits. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), on distingue trois types hémocytaires

immunocompétents (crystal cells, plasmatocytes, lamellocytes) ainsi que des hémocytes progéniteurs (prohémocytes) (Parsons et Foley 2016). Chez la crevette (*Penaeus sp.*), trois types hémocytaires ont été identifiés : les hyalinocytes, les granulocytes, et les semi-granulocytes (Tassanakajon et al. 2013). Enfin, chez le moustique (*Anopheles gambiae*), les prohémocytes sont des cellules progénitrices dont la différenciation conduit à deux autres types hémocytaires (les granulocytes et les oenocytoïdes) (Castillo, Robertson, et Strand 2006). Des études récentes, utilisant des approches transcriptomiques sur cellules uniques (sc-RNA-Seq pour séquençage d'ARN sur cellule unique), permettent aujourd'hui de décrire de nouvelles sous-populations transcriptomiques d'hémocytes et de prédire les relations ontogéniques des hémocytes décrits chez ces organismes modèles (**Figure 6**) (Tattikota et al. 2020; Kwon et al. 2021; Koiwai et al. 2021). L'essor des études basées sur ces approches de scRNA-Seq permet aujourd'hui de mieux comprendre comment sont conservées les fonctions de ces différents types hémocytaires entre des organismes phylogénétiquement distants.

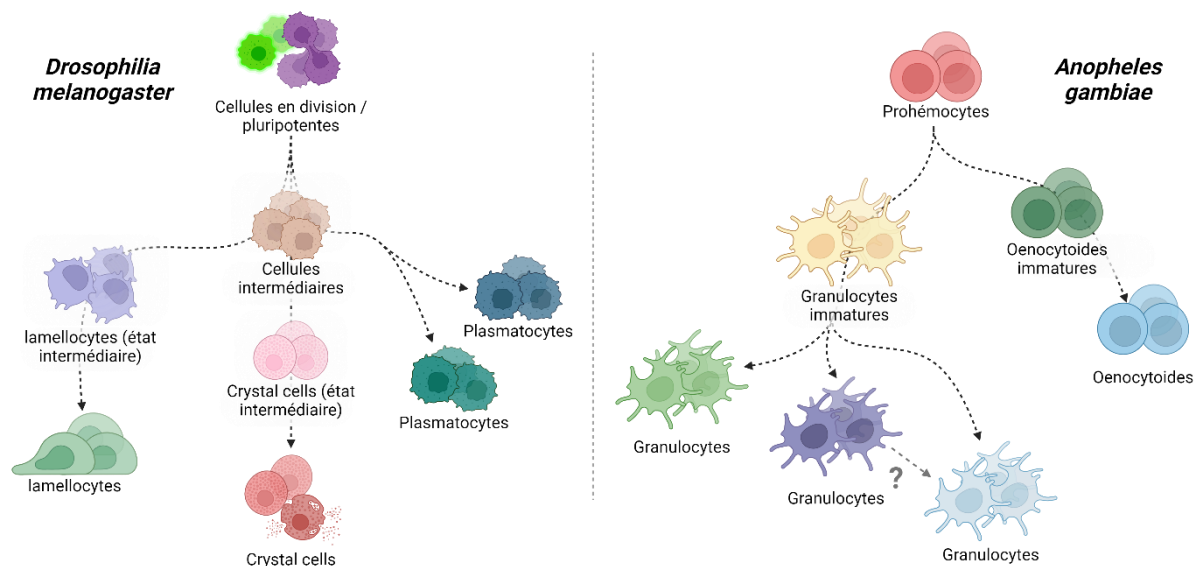


Figure 6 : Voies de différenciations chez *Drosophila melanogaster* et *Anopheles gambiae*. Chez *D. melanogaster* les cellules progénitrices pluripotentes se différencient en 2 types de plasmatocytes, des crystal cells et des lamellocytes en passant par des stades intermédiaires. Chez *A. gambiae*, les prohémocytes (cellules progénitrices) se différencient en Oenocytoïdes et en trois types de granulocytes en passant par des stades intermédiaires. D'après (Tattikota et al. 2020; Kwon et al. 2021).

Chez les bivalves, une revue concernant les populations hémocytaires (de la Ballina et al. 2022) montre que la diversité de ces cellules varie considérablement chez les espèces appartenant à cette classe, compliquant la généralisation des types cellulaires identifiés entre espèces phylogénétiquement proches. De manière générale, une majorité d'auteurs mettent en évidence, au minimum, la présence de granulocytes et de hyalinocytes suggérant que ceux-ci seraient

conservés chez tous les bivalves. D'autres types hémocytaires comme les petits granulocytes, petits hyalinocytes, « blast-like cells » et agranulocytes sont aussi caractérisés mais de façon variable chez les différentes espèces étudiées. Par exemple, chez la palourde, les auteurs mettent en évidence la présence de fibrocytes, cellules lymphoïdes, ou encore de monocytes et d'érythrocytes. D'autres travaux montrent que les thrombocytes et les astérocytes sont uniquement caractérisés chez les moules. Ces résultats soulignent une diversité hémocytaire importante chez les bivalves, qui peut être due à des critères de classification différents, ou des approches expérimentales différentes. De plus, le manque de marqueurs moléculaires identifiés chez les bivalves ne permet pas aujourd'hui de faire un lien entre les cellules immunitaires présentes chez les bivalves, et celles présentes chez des organismes phylogénétiquement plus distants (de la Ballina et al. 2022).

Chez *C. gigas*, les hémocytes sont les cellules circulantes du système immunitaire qui jouent un rôle clé dans le contrôle des processus infectieux. Ils sont, par exemple, la cible du virus OsHV-1 μ Var ou de bactéries du genre *Vibrio* responsables d'épisodes de mortalités massives en ostréiculture (de Lorgeril et al. 2018a; Rubio et al. 2019a). La caractérisation morpho-fonctionnelle de ces cellules a permis de mieux comprendre les dynamiques d'interactions entre *C. gigas* et les micro-organismes pathogènes qui l'infectent. Depuis leur découverte, différentes techniques ont été utilisées chez l'huître, pour décrire les hémocytes. Cela a conduit à des conclusions divergentes sur leur diversité. Les premières caractérisations des hémocytes de *C. gigas* étaient basées sur l'observation des hémocytes à l'état frais, colorés (Coloration de May-Grünwald-Giemsa) ou encore par microscopie électronique. La toute première description des hémocytes chez *C. gigas* a été réalisée par une approche cytologique (Tanaka, Takasugi, et Maoka 1961). Six types hémocytaires (I – VI) ont ainsi été observés et classés en sous types en fonction de leur taille et de leur granulosité. Ces deux critères morphologiques sont récurrents dans la classification des hémocytes chez *C. gigas*. Plus tard, cinq types hémocytaires ont été décrits par Ruddell et ses collaborateurs : trois types d'amoebocytes agranuleux (monocytes-types, fibroblast-type et myoblasts-type), et deux types amoebocytes granuleux (acidophiles et les basophiles) (Ruddell 1971). En 1977, par des approches de cytologie et de microscopie électronique, Feng et ses collaborateurs ont décrit 6 types d'amoebocytes (Feng, Feng, et Yamasu 1977).

À la fin des années 1980, l'utilisation de la cytométrie en flux et du FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) s'est démocratisée et a été utilisée pour caractériser les hémocytes chez les invertébrés. Ces approches de FACS combinées à des tris d'hémocytes par gradient de

densité (E. Bachère, Chagot, et Grizel 1988) ont conduit à de nouvelles définitions des populations hémocytaires chez *C. gigas*. Ainsi, E. Bachère et ses collaborateurs ont décrit trois groupes majeurs d'hémocytes : les granulocytes (à granules denses ou lucides aux électrons), les hyalinocytes de taille variable, et les cellules de type blastes sur la base d'une description morphologique en microscopie électronique à transmission suite à un tri cellulaire sur gradient de Percoll (E. Bachère, Chagot, et Grizel 1988). Les granulocytes et les hyalinocytes (parfois dénommés agranulocytes) sont récurrents dans les classifications hémocytaires parues dès les années 1990, mais d'autres types hémocytaires sont tout de même décrits en plus de ces deux premiers comme les petits granulocytes (Ashton-Alcox et Ford 1998b), les petits agranulocytes (Lambert et al. 2003a), les cellules vésiculaires, trois sous types de granulocytes (éosinophiles, basophiles et un mélange de ces deux types cellulaires) (SuJung, SuMin, et HsinYiu 2005), ainsi que des cellules de type blaste (Donaghy et al. 2010). En 2017, Wang et ses collaborateurs ont identifié les granulocytes, les semi-granulocytes et les agranulocytes par microscopie à lumière transmise après tri cellulaire sur gradient de Percoll et cytométrie en flux. La combinaison de ces approches avec la caractérisation des capacités fonctionnelles des granulocytes (phagocytose, production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, activité lysosomale et expression de gènes impliqués dans l'immunocompétence des phagocytes) a conduit cette dernière classification à être considérée comme référence pour la description morphologique des hémocytes chez *C. gigas* malgré l'absence d'une description des différents sous-types hémocytaires granuleux (W. Wang et al. 2017a).

L'histoire de la classification des hémocytes chez *C. gigas* converge vers la description de trois types hémocytaires distinct : les hyalinocytes, les granulocytes et les cellules de type blastes (**Figure 7**). Cependant, malgré les nombreuses études et approches utilisées, ni la nomenclature ni la description de ces cellules ne sont homogènes. La nature, le nombre et l'ontologie des différents types hémocytaires chez l'huître restent très mal décrits et dépendent en grande partie des approches employées. Ainsi, malgré la dernière classification des hémocytes datant de 2017 (W. Wang et al. 2017a) et la découverte d'un marqueur moléculaire exprimé spécifiquement chez les agranulocytes (CgCD9) (Dong et al. 2022), une définition consensuelle ainsi qu'une ontologie des types hémocytaires et de leurs fonctions chez l'huître *C. gigas* ne semblent pas encore clairement établies.

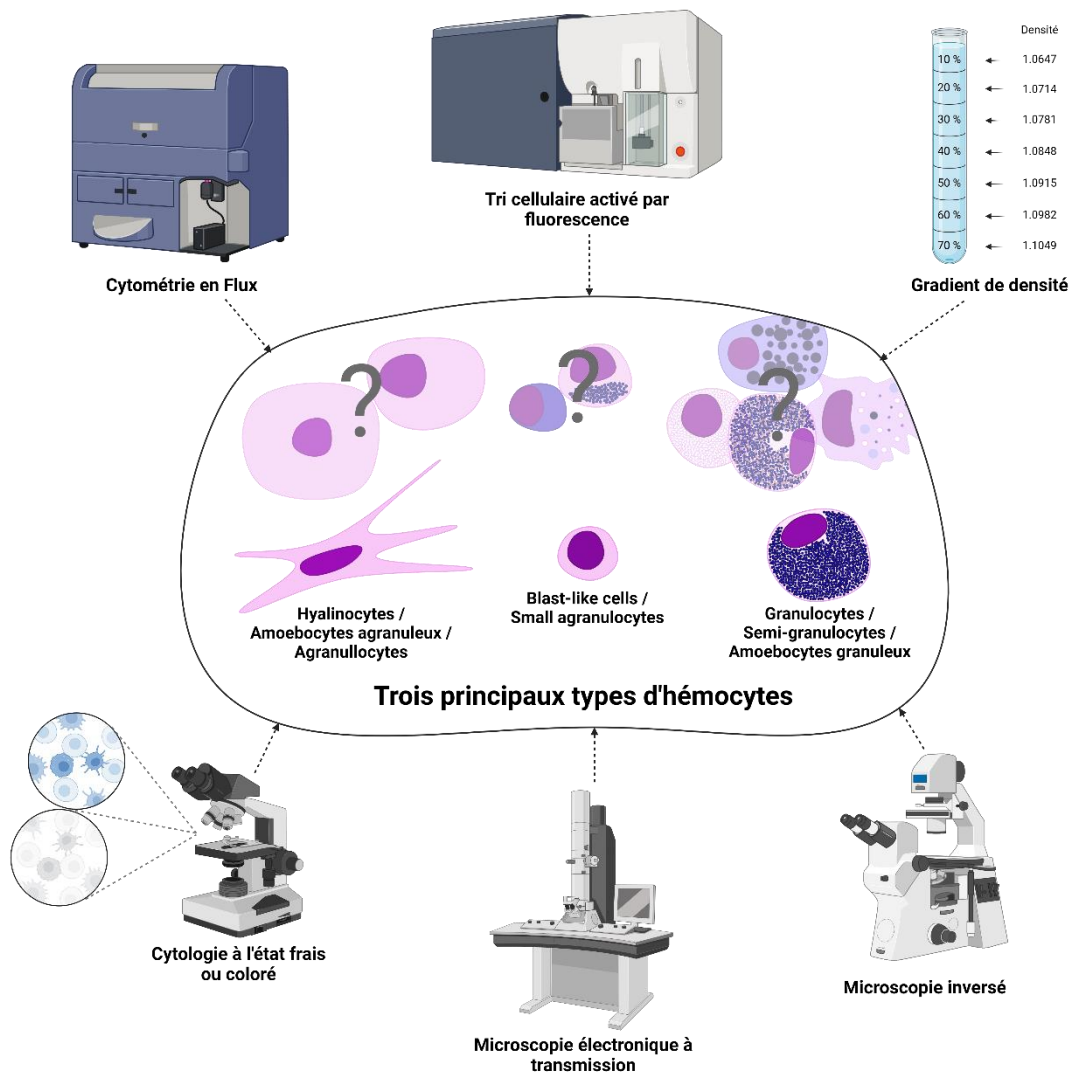


Figure 7 : Diversité d’approches expérimentales qui ont conduit à la classification des hémocytes chez *C. gigas*. Plusieurs méthodes ont été employées pour trier les hémocytes (cytométrie en flux, tri cellulaire assisté par fluorescence et gradient de densité) et pour les caractériser (microscopie à lumière transmise sur hémocytes à l’état frais ou colorés, microscopie électronique à transmission ou microscopie inversée). Ces approches ont conduit à des classifications et des nomenclatures divergentes. Aujourd’hui, il est admis l’existence de trois types hémocytaires principaux : hyalinocytes, cellules de type blast-like et granulocytes.

L’utilisation de nouvelles approches permettant une caractérisation plus exhaustive des hémocytes est aujourd’hui indispensable pour définir de manière plus précise la diversité des hémocytes chez *C. gigas*, tout comme le rôle que jouent ces hémocytes dans sa défense contre les infections.

b) Le système immunitaire inné de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Les bivalves marins évoluent dans des environnements riches en micro-organismes ; on estime en effet que l'eau de mer contient environ 5 millions de bactéries/mL, concentration que l'on retrouve également dans le liquide inter-valvaire et l'hémolymphe de l'huître (de Lorgeril et al. 2018a). L'huître, organisme filtreur, est ainsi exposée à un grand nombre de micro-organismes dont certains sont pathogènes et doit répondre de façon adaptée à toutes ces interactions. Pour contrôler les populations microbiennes avec lesquelles elle interagit en permanence, *C. gigas*, comme tous les non-vertébrés, mobilise un système immunitaire inné. Chez les vertébrés, le système immunitaire inné est la première ligne de défense face aux agents pathogènes, indispensable à l'activation de la réponse adaptative. Le système immunitaire inné comprend différents types cellulaires ; des cellules d'origine hématopoïétique ou non. Ainsi, chez l'homme, les épithélia (épithélium cutané, du système respiratoire, gastro-intestinal, et urogénital) ainsi que les cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules NK (*Natural Killer*) sont activement impliquées dans la défense de l'hôte (Riera Romo, Pérez-Martínez, et Castillo Ferrer 2016). Chez l'homme, les cellules immunitaires se déplacent via le système circulatoire, et reconnaissent le non-soi grâce à des récepteurs à large spectre. Suite à la reconnaissance du micro-organisme pathogène, une réponse inflammatoire rapide va être déclenchée en faisant intervenir des mécanismes humoraux (synthèse de peptides antimicrobiens, molécules du complément, protéine C réactive, pentraxines et collectines, chimiokines et cytokines) et cellulaires (phagocytose, encapsulation, NETs (*Neutrophile Extracellular Trap*)). Chez les vertébrés supérieurs, le système immunitaire inné joue un rôle indispensable dans l'activation du système immunitaire adaptatif via les cellules dendritiques présentant les antigènes activant les lymphocytes B et T (Turvey et Broide 2010). En effet, chez l'homme, les lymphocytes B et T sont les principales cellules impliquées dans l'immunité adaptative. Via des recombinaisons somatiques aléatoires des gènes codants pour les parties variables des anticorps et des TCR (T-Cell Receptor) chez les lymphocytes, dépendant des gènes RAG (*Recombination-Activating Genes*) (Schatz, Oettinger, et Schlissel 1992), une expansion clonale permet la sélection d'anticorps à très faible spectre, ne reconnaissant ainsi que l'antigène présenté par les cellules dendritiques. Ces recombinaisons ont lieu pendant les premières années de l'individu. Après élimination du micro-organisme pathogène, une faible proportion de lymphocytes B et T mémoires persiste, contribuant à assurer une mémoire spécifique à long terme du micro-organisme rencontré (Netea et al. 2019). Chez d'autres vertébrés comme les agnathes, la spécificité du système immunitaire adaptatif repose sur des

VLRs (*Variable Lymphocyte Receptor*) dont la recombinaison somatique est indépendante des gènes RAGs, mais repose sur les cytosines désaminases (Boehm et al. 2012). Chez ces vertébrés, les lymphocytes VLR-B produisent des VLRs solubles, semblables aux anticorps, et les lymphocytes VLR-A produisent des VLRs membranaires, rappelant les TCR (Boehm et al. 2012). Contrairement aux vertébrés, les non-vertébrés tels que l’huître ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif. Malgré tout, leur système immunitaire est complexe, impliquant la reconnaissance du non-soi, l’activation de voies de signalisation adaptées et la mobilisation de mécanismes contribuant à l’élimination de l’agent pathogène via l’intervention d’une composante cellulaire (phagocytose, encapsulation, mélanisation et morts cellulaires programmées) et d’une composante humorale (peptides antimicrobiens, cytokines, molécules du complément) de l’immunité (Rathinam et al. 2024; L. Wang, Song, et Song 2018). Malgré l’absence de système immunitaire adaptatif dépendant ou non des gènes RAG, une forme de mémoire spécifique à l’immunité innée contribue à sa complexité chez les invertébrés (Caroline Montagnani et al. 2024).

Reconnaissance du non-soi

La capacité que possèdent les cellules immunitaires de *C. gigas* à répondre de manière adaptée aux nombreux micro-organismes auxquels elles sont confrontées vient de la grande diversité de leurs récepteurs, appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR) (X. Guo et al. 2015). Les PRRs reconnaissent les *Pathogens Associated Molecular Patterns* (PAMPs), les *Microbial Associated Molecular Pattern* (MAMPs) et les *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMPs), des motifs moléculaires associés aux pathogènes. Ces récepteurs, à l’origine de différents types de réponses, permettent la reconnaissance du non-soi. Ils sont nombreux et possèdent des modes de fonctionnement différents. Ils peuvent être soit : i) circulants dans l’hémolymphe à l’extérieur des hémocytes, ii) présents, et associés à la membrane plasmique, iii) libres dans le cytoplasme ou encore iv) associés aux membranes de certains organites intracellulaires. Parmi les PRR présents chez *C. gigas*, on retrouve les *Toll-Like Receptors* (TLRs) (récepteurs riches en leucines qui sont exprimés préférentiellement à la surface des hémocytes et détectant les micro-organismes pathogènes extracellulaires), les *Retinoic acid-Inducible Gene* (RIG)-1 like receptors (RLRs) (récepteurs d’ARN viral plutôt intra-cellulaires et cytosoliques), les *Nucleotides Oligomerisation Domain* (NOD)-like Receptor (NLR) (récepteurs de lipides bactériens cytosoliques détectant les débris intracellulaires des agents pathogènes), les *Peptidoglycan Recognition Protein* (PGRPs) (récepteurs extracellulaires du peptido-glycane bactérien), les lectines (récepteurs principalement extracellulaires possédant un domaine CRD

(*carbohydrate recognition domain*) permettant la reconnaissance des carbohydrates portés par les micro-organismes pathogènes) dont les *Fibrinogen RElated Multidomain protein* (FREMs) (lectines possédant un domaine fibrinogène en C-terminal) et les *Gram-Negative Binding Protein* (GNBP) (récepteurs extracellulaires permettant la reconnaissance des bactéries à Gram négative) (Gerdol et al. 2018). L'efficacité du système immunitaire inné dans la reconnaissance de nombreux agents pathogènes est associée à l'expansion des gènes codant pour ces familles de PRR chez les mollusques, dont *C. gigas*. En effet, la diversité de ces gènes est plus élevée chez les mollusques que chez l'homme (par exemple, 222 TLR sont prédits chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, contre 10 chez l'Homme (Linlin Zhang et al. 2015)) et pourrait participer à l'adaptation très spécifique de l'huître aux micro-organismes pathogènes qu'elle rencontre (Linlin Zhang et al. 2015; X. Guo et al. 2015).

i) Toll like receptor

Les Toll-Like Receptors (TLRs) sont des récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs possèdent trois domaines : un domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*) extracellulaire, un domaine transmembranaire, et un domaine TIR (Toll/IL-1R) intracellulaire (**Figure 8**). Ils ont été découverts pour la première fois chez la drosophile en 1980 (sous le nom de Toll) et impliqués dans le développement embryonnaire (Nüsslein-Volhard et Wieschaus 1980). Ces récepteurs ont été associés à la réponse immunitaire innée antifongique en 1996 par Lemaitre et ses collaborateurs (Lemaitre et al. 1996). Ils sont présents chez tous les animaux et permettent la reconnaissance de nombreux MAMPs/PAMPs d'origine bactérienne, virale, fongique ou encore parasitaire. Les TLR possèdent un domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*) qui permet de reconnaître spécifiquement des PAMPs. Chez l'homme, 10 TLR ont été identifiés et sont présents à la surface de la membrane plasmique des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes B et T), des fibroblastes, des cellules endothéliales et épithéliales (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6), ou associés à des organites intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) (Akira et Takeda 2004). L'activation de ces TLRs peut conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'interférons de type 1 et de peptides antimicrobiens, participant à l'immunité antibactérienne et antivirale (Kawai et al. 2024). Chez *C. gigas*, 83 TLRs ont été prédits par annotation fonctionnelle, parmi lesquels 78 ont été montrés comme étant exprimés. Dix-neuf de ces TLRs présentent une expression différentielle suite à un challenge par le virus OsHV-1, des *Vibrios* ou d'autres bactéries non pathogènes de l'huître. Par exemple, les TLRs Cg05194-D20 et Cg13671 ne sont exprimés que dans le cas d'une infection par *V. anguillarum*. Le TLR Cg26493-D19 seulement

dans le cas d'une infection par *Micrococcus luteus* et le TLR 03466R seulement dans le cas d'une infection par le virus OsHV-1 (Linlin Zhang et al. 2015). La caractérisation de ces TLR et de leur implication dans la réponse immunitaire antivirale et antibactérienne suggère que la fonction de ces protéines est conservée chez des animaux phylogénétiquement distants. Cependant, la diversité de ces TLRs chez *C. gigas* suggère une spécificité de reconnaissance des ligands qui reste à être explorée.

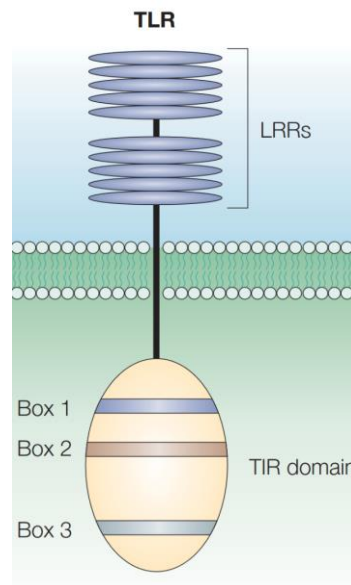


Figure 8 : Structure d'un Toll-like receptor (TLR). Les récepteurs de type Toll ont un domaine cytoplasmique Toll/IL-1R (TIR). Le domaine TIR intracellulaire se caractérise par la présence de trois régions homologues (appelées boîtes 1, 2 et 3). Le domaine extracellulaire LRR (*Leucine-Rich Repeat*) est composé de répétitions en tandem de régions riches en leucine. Adapté de (Akira et Takeda 2004).

ii) Retinoic acid-Inducible Gene 1 like receptors

Les *Retinoic acid-Inducible Gene* (RIG)-1 like receptors (RLRs), sont des hélicases à ARN servant de récepteurs cytoplasmiques à des ARN viraux. Découverts chez l'homme, cette famille de protéines est composée de trois hélicases (RIG-1, MDA5 et LGP2) possédant un domaine hélicase commun (DEAD : Asp-Glu-Ala-Asp box) reconnaissant et déstructurant les ARN viraux intracellulaires (Yoneyama et al. 2004). RIG-1 et MDA5 possèdent dans la région N-terminale un domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD : *Caspase Activation and Recruitment Domain*) et dans la région C-terminale un domaine répresseur (RD : *Repressor Domain*) impliqué dans leur autorégulation (**Figure 9**). Suite à l'activation des RLR et grâce à leur interaction avec un adaptateur (ITS-1), la production d'interférons est induite, conduisant notamment à l'inhibition de la synthèse protéique et à l'inactivation de l'ARN viral, participant à une immunité antivirale aspécifique (Loo et Gale 2011). Chez *C. gigas*, 12 RLRs ont été identifiés, dont sept qui possèdent un domaine CARD en N-terminal. La présence de

quatre *Interferon Regulatory Factor* (IRF), et de ces RLRs suggèrent la présence d'une immunité antivirale aspécifique chez *C. gigas* (Linlin Zhang et al. 2015). Cependant, l'association de l'expansion des gènes codant pour les RLRs et de la spécificité de reconnaissance des ligands n'est pour le moment pas étudiée.



Figure 9 : Structure des *Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-1 like receptors (RLRs)* chez l'homme. Les RLRs consistent en une région CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*), une ATPase contenant une boîte hélicase DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp box), et un domaine C-terminal (CTD) contenant un domaine represser (RD) pour RIG-1 et MDA5. Adapté de (Loo et Gale 2011).

iii) Nucleotides Oligomerisation Domain like receptors

Les *Nucleotides Oligomerisation Domain (NOD)-like receptors* (ou NLRs) sont des récepteurs cytosoliques impliqués dans la reconnaissance des bactéries à Gram positives via le peptidoglycane, ou des toxines provenant de bactéries à Gram positives ou négatives. Découverts en 1999 avec la mise en évidence de NOD1 chez l'Homme (Inohara et al. 1999), ces protéines contiennent un domaine LRR en C-terminal, un domaine NATCH (domaine nucléotides triphosphatase) et un domaine N-terminal variable (**Figure 10**). Chez l'homme, 23 NLRs ont été décrits en fonction du domaine présent en N-terminal, divisant cette famille de récepteurs en cinq sous-familles : NLRA (domaine de transactivation acide), NLRB (BIR : *Baculovirus Inhibitor Repeats*), NLRC (CARD), NLRP (PYD : *PYrin Domain*) et NLRX (possédant un domaine N-terminal sans homologie avec les autres NLRs). L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), de la voie des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein*) et de la Caspase 1, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules antimicrobiennes (Franchi et al. 2009). Chez les mollusques, seulement des NLRC4 ont été mis en évidence, avec des domaines NACHT et LRR conservés, mais avec un domaine N-terminal variable entre les espèces étudiées. Des incNLR (*incomplete NRL*) ne possédant pas de domaine NACHT mais possédant un domaine CARD et LRR conservés ont aussi été mis en évidence chez les mollusques (Zhu et al. 2022). Chez *C. gigas*, trois incNLR et un seul NLR (NLRC4) ont été mis en évidence. incNLR-1 est surexprimé après exposition à des virus et incNLR-2 après exposition à des bactéries à Gram

négatives pathogènes ou non. Ces deux incNLR sont aussi surexprimés suite à un stress hypoxique de l'huître. incNLR-3 et NLRC4 sont particulièrement exprimés lors de stades spécifiques du développement de *C. gigas* et notamment entre les stades trochophore et larve D. Au stade adulte, NLRC4 est majoritairement exprimé dans les palpes labiaux, les branchies et les gonades femelles. L'implication des NLR à domaine NACHT dans l'immunité ne semble pas conservée chez *C. gigas*. En effet, NLRC4 chez *C. gigas* pourrait avoir perdu son rôle immunitaire pour jouer un rôle potentiel dans le développement et la différenciation tissulaire (Zhu et al. 2022). L'annotation du génome de *C. gigas* reste tout de même source de variation dans la prédiction des gènes impliqués dans l'immunité. Ainsi, la diversité réelle des NLRs à domaine NACHT pourrait être sous-estimée.

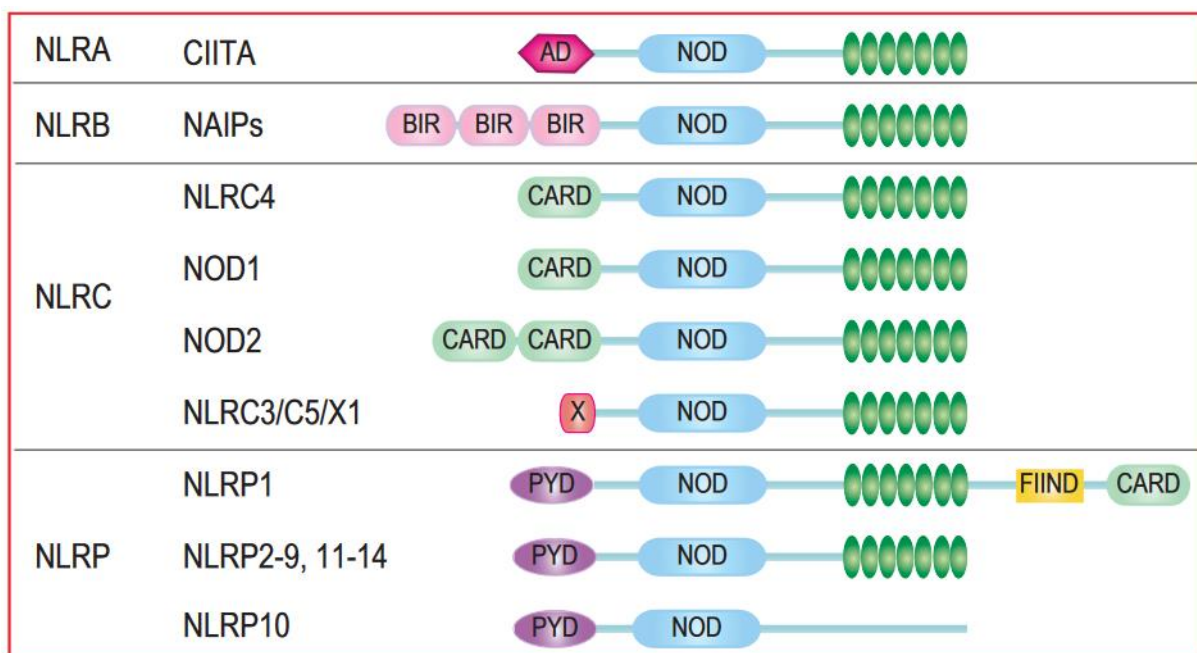


Figure 10 : Structure des Nucleotides Oligomerisation Domain (NOD)-like receptors (NLRs) chez l'homme. Les NLR possèdent un domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*) en C-terminal, un domaine NATCH (domaine trouvé chez NAIP, CIITA, HET-E, and TP1) et un domaine N-terminal variable : domaine de transactivation acide (NLRA), domaine BIR (NLRB), domaine CARD (NLRC), domaine PYD (NLRP) (Zhong, Kinio, et Saleh 2013).

iv) Peptidoglycan Recognition Protein

Les *Peptidoglycan Recognition Proteins* (PGRPs) sont des protéines découvertes pour la première fois chez le papillon de nuit en 1998 contenant un domaine peptidoglycan-binding type 2 amidase en C-terminal, se liant au peptidoglycane des bactéries et induisant son hydrolyse (Kang et al. 1998; Dziarski et Gupta 2006) (**Figure 11**). Chez *D. melanogaster*, deux types de PGRPs sont décrits : membranaires ou sécrétés dans l'espace extracellulaire. Après la reconnaissance du peptidoglycane, les PGRPs membranaires induisent une cascade de

signalisation conduisant à l'activation de NF- κ B et à la production d'effecteurs moléculaires comme des peptides antimicrobiens. Les PGRPs extracellulaires coopèrent quant à eux avec les *Gram-Negative Binding Proteins* (GNBPs). Caractérisées pour la première fois chez la larve de *Bombyx mori* en 1996 (Lee et al. 1996), les GNBPs sont des protéines sécrétées dans l'espace extracellulaire possédant un domaine β -1,3-glucanase leur permettant de se lier au β -1,3-glucane et au LPS, et hydrolysant elles aussi le peptidoglycane et mettant à disposition des glycanes se liant à différents PGRPs (Filipe, Tomasz, et Ligoxygakis 2005; Y. S. Kim et al. 2000). L'activation des PGRPs extracellulaires par les GNBPs induit l'activation de la voie phénoloxydase et la mélanisation, où l'activation de la voie de signalisation Toll chez les bivalves (Dziarski et Gupta 2006; Gerdol et al. 2018). Chez *C. gigas*, neuf PGRPs ont été mis en évidence (dont *Cg*-PGRP-S1S, *Cg*-PGRP-S1L, *Cg*-PGRP-S2, *Cg*-PGRP-S3, *Cg*-PGRP-S4, *Cg*-PGRP-L) reconnaissant le peptidoglycane des bactéries et induisant leur lyse (Itoh et Takahashi 2008). Parmi ces PGRP, seule *Cg*-PGRP-S1S a été montrée comme capable d'agglutiner les bactéries avec lesquelles elle se lie, conduisant à la dégranulation des granulocytes (Iizuka et al. 2014). Seuls deux β GBP (β -1, 3-Glucan binding proteins), des GNBPs, ont été caractérisés chez *C. gigas*, avec deux fonctions distinctes : une fonction de reconnaissance des intégrines (*Cg*- β GBP-1) et une fonction de stimulation de l'activité de la phénoloxydase, suite à une stimulation des hémocytes par la laminarine (Itoh et al. 2010). Cependant, chez les bivalves, l'absence de preuves de l'existence d'une cascade phénoloxydase extracellulaire, et de protéines similaires à *Spätzle* (une protéine se liant aux TLRs et dont l'activation dépend de la reconnaissance PGRPs-ligands) ne nous permettent pas d'associer les PGRPs avec l'activation de la voie Toll et la mélanisation (Gerdol et al. 2018), malgré l'implication de ces récepteurs dans l'immunité antibactérienne chez *C. gigas*.

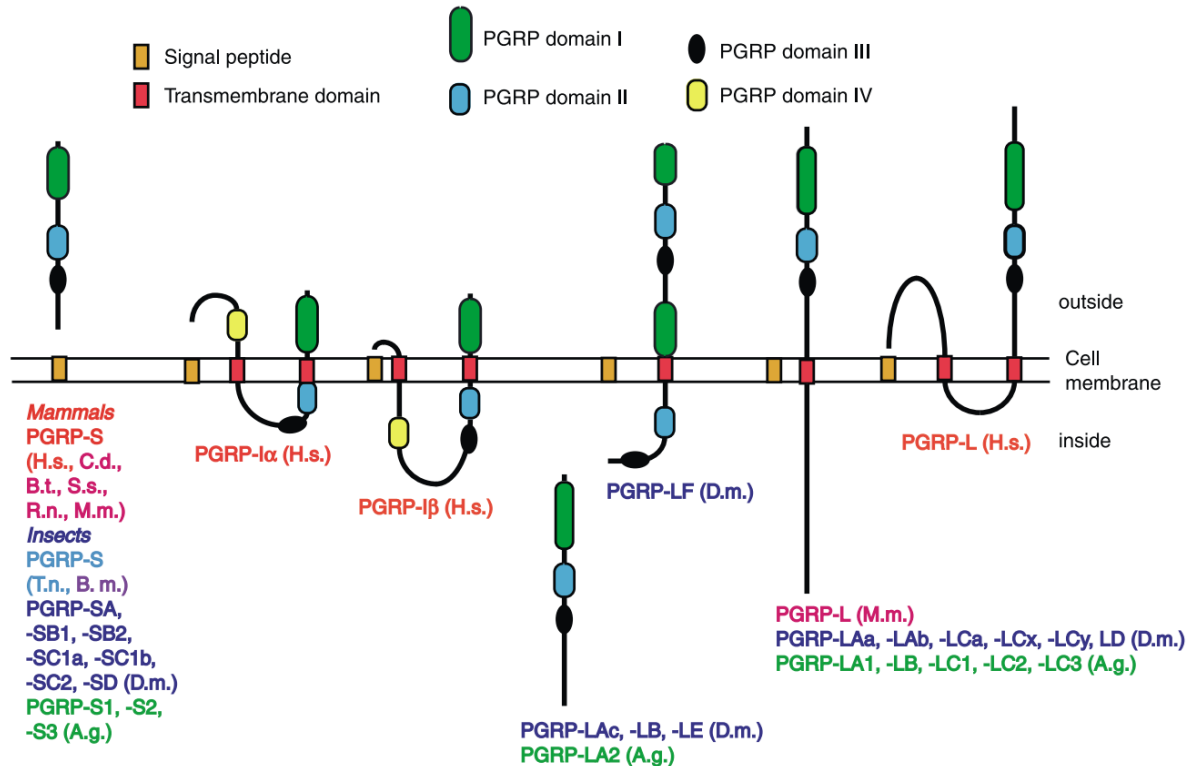


Figure 11 : Structure des *Peptidoglycan Recognition Protein* (PGRPs). Les PGRPs issus des mammifères (rouge) et des insectes (bleu et vert) sont représentés. Deux classes de PGRPs sont prédites : les petits (PGRP-S) et les grands (PGRP-L). Tous possèdent un domaine PGPR en C-terminal pouvant être composé de 4 sous domaines (PGPR domain I-IV). Certains possèdent un ou deux domaines transmembranaires (PGRP-Ia, -Ib, -LF, -L), d'autres ne possèdent pas de domaines transmembranaires et sont libres dans le cytosol (PGRP-LAc et -LA2) ou sécrétés (PGRP-S). Le peptide signal permet aux PGRPs leur translocation à la membrane plasmique ou hors de la cellule. B.t., *Bos taurus* (vache); C.d., *Camelus dromedarius* (chameau); H.s., *Homo sapiens* (Homme); M.m., *Mus musculus* (souris); R.n., *Rattus norvegicus* (rat); S.s. *Sus scrofa* (cochon). Insects: A.g., *Anopheles gambiae* (moustique); B.m., *Bombyx mori* (Bombyx du mûrier); D.m., *Drosophila melanogaster* (mouche); T.n., *Trichoplusia ni* (papillon de nuit) (Dziarski 2004).

v) Lectines

Les lectines sont des glycoprotéines reconnaissant les motifs carbohydrates présents à la surface des micro-organismes pathogènes grâce à un domaine commun : le domaine CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*). Depuis l'identification de la première lectine animale en 1974 (Ashwell et Morell 1974), plusieurs familles de lectines sont aujourd'hui caractérisées en fonction du domaine protéique attaché au domaine CRD comme les lectines de type C (CTLs), les FTLs, RTLs, HTLs, PTLs, XTLs, MTLs, LTLs lectines de type I, ou de type F-box, pentraxines, galectines, ficolines, calnexines, chilectines, collectines et les *fibrinogen related protein* (FREPs). Parmi ces membres, les CTLs, RTLs, FTLs, pentraxines, galectines, ficolines et les FREPs ont montré un rôle dans l'immunité. Ces lectines se lient aux glycanes des

glycoprotéines, glycolipides et polysaccharides et conduisent à la reconnaissance des agents pathogènes, leur opsonisation, l'endocytose et la phagocytose, ainsi que l'activation de la voie du complément (Vasta et al. 2007; Gerdol et al. 2018). Les principales familles de lectines mises en évidence chez les bivalves sont les lectines de type C, de type R, de type F et les galectines (**Figure 12**) (Gerdol et al. 2018). Chez *C. gigas*, les lectines de type C ont des activités antimicrobiennes face aux bactéries à Gram positives, ou servent d'opsonines favorisant l'activité phagocytaire des hémocytes. Une galectine a été caractérisée chez *C. gigas* mais son niveau d'expression n'est pas modifié suite à l'injection par *Vibrio tubiashii* (Yamaura, Takahashi, et Suzuki 2008). *Cg*-Siglec-1 est une lectine up-régulée dans le cas d'une infection par des bactéries du genre *Vibrio* et partage une similarité de séquence avec des homologues de CD22 chez les vertébrés. Cette lectine est capable de se lier au LPS et au peptidoglycane et participe à l'inhibition de l'apoptose, ainsi qu'à la phagocytose de *Vibrio splendidus* (Liu et al. 2016). Une lectine de type F (PmF-lectin) et deux protéines de type *chitinase-like* (*Cg*-Clp1 et 2), se liant respectivement au fucose et à la chitine, ont été identifiées chez *C. gigas* et leur niveau d'expression chez l'huître perlière *Pinctada martensii* est plus élevé suite à un challenge immunitaire (J. Chen, Xiao, et Yu 2011). Ces résultats montrent l'implication des lectines dans la reconnaissance des PAMPs et dans l'induction de réponses immunitaires innées chez *C. gigas*.

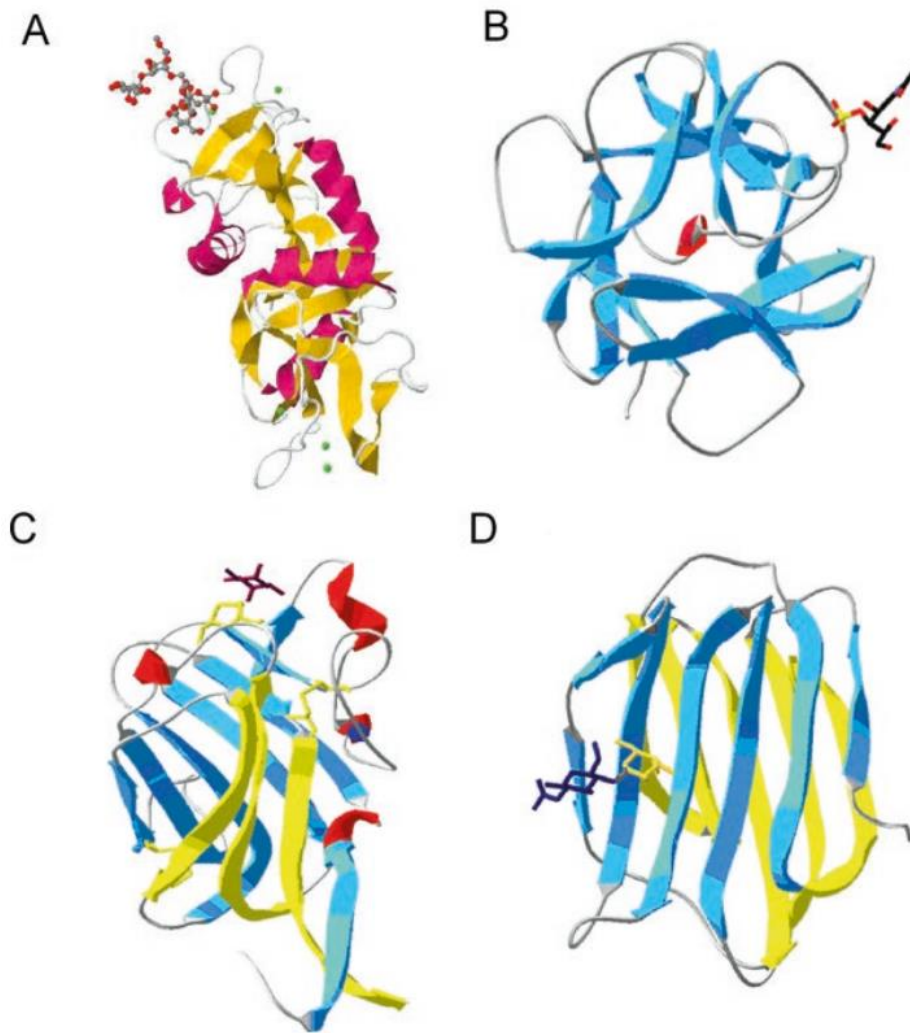


Figure 12 : Structure des principales lectines caractérisées chez les bivalves. (A) lectine de type C liée à un carohydrate, (B) lectine de type R liée à un GalNAc, (C) lectine de type F liée à un fucose, (D) galectine liée à un LacNAc (Gerdol et al. 2018).

Les *Fibrinogen Related Protein* (FREPs) sont une classe de lectines contenant un domaine FReD (*Fibrinogen Related Domain*) en C-terminal et un ou deux domaines *immunoglobulin-like* en N-terminal (Gerdol et al. 2018). Mis en évidence pour la première fois chez les vertébrés en 1992 (R. F. Doolittle 1992), ces protéines ont ensuite été décrites chez de nombreux organismes (ascidie, lamproie, poisson zèbre, grenouille, lézard, poulet et escargot). Le domaine situé en N-terminal est capable de se lier à divers sucres ou dérivés de sucres présents à la surface des micro-organismes (**Figure 13**) (Russell F Doolittle, McNamara, et Lin 2012). Chez les invertébrés, les FREPs ont été décrits pour la première fois chez *Biomphalaria glabrata* en 1997, ces récepteurs reconnaissent des PAMPs associés à des parasites du genre *Schistosoma* ou *Echinostoma* (C. M. Adema et al. 1997). Suite à la liaison entre les FREPs et les PAMPs, une précipitation des polypeptides parasites est observée, participant à la réponse

immunitaire antiparasitaire. La particularité des FREPs vient de la capacité de ces molécules à subir des variations somatiques, conduisant à leur grande diversification, participant à la spécificité de réponse de *B. glabrata* face aux parasites du genre *Schistosoma* (Moné et al. 2010). La diversification somatique de ces récepteurs remet en question l'idée selon laquelle les invertébrés s'appuient seulement sur un nombre limité de récepteurs codés dans la lignée germinale (Coen M. Adema 2015). Plusieurs papiers décrivant les FREPs chez les invertébrés mentionnent des molécules ne possédant pas de domaine immunoglobuline en N-terminal. Les FREM (*Fibrinogen Related Multidomain proteins*) sont des protéines contenant le domaine FReD en C-terminal mais ne possédant pas le domaine immunoglobuline en N-terminal. Des FREM ont été mis en évidence chez la crevette *Marsupenaeus japonicus*. Ces protéines se lient aux bactéries et facilitent la phagocytose par les hémocytes (J.-J. Sun et al. 2014). Dans le génome de *C. gigas*, 190 FREMs sont prédites avec une variabilité de séquence importante et majoritairement exprimées dans les branchies (LinLin Zhang, Li, et Zhang 2012; X. Guo et al. 2015), indiquant l'importance du système respiratoire de *C. gigas* comme un des tissus clés impliqué dans les premières lignes de défense face aux micro-organismes pathogènes. Cependant, la mauvaise classification de ces FREMs comme FREPs souligne l'importance de la réalisation d'une méta-analyse des protéines contenant un domaine FReD chez les invertébrés.

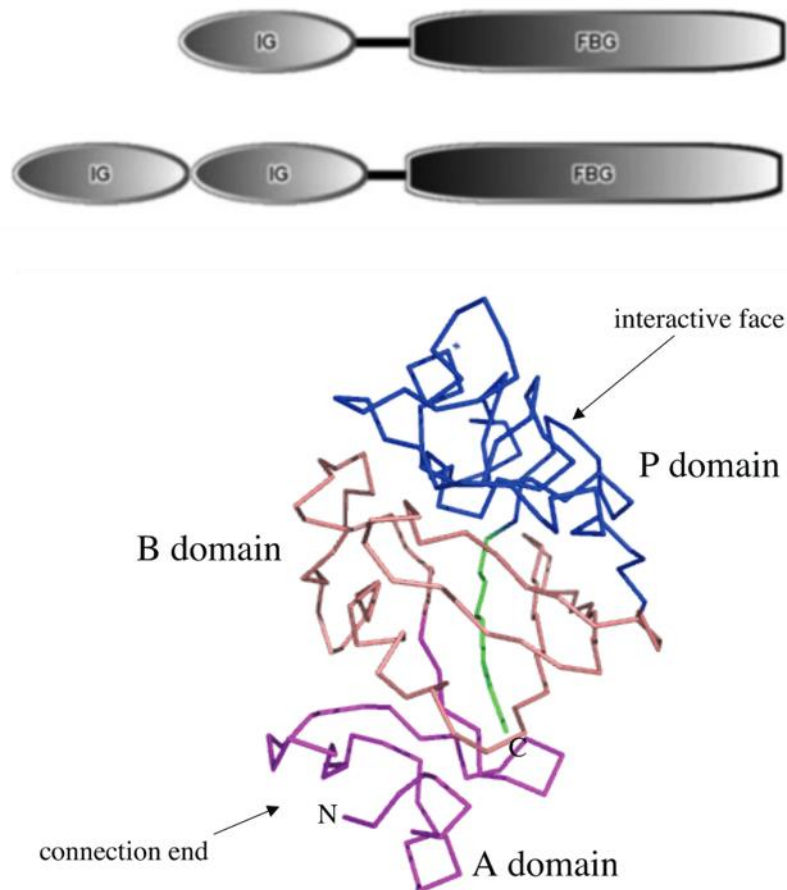


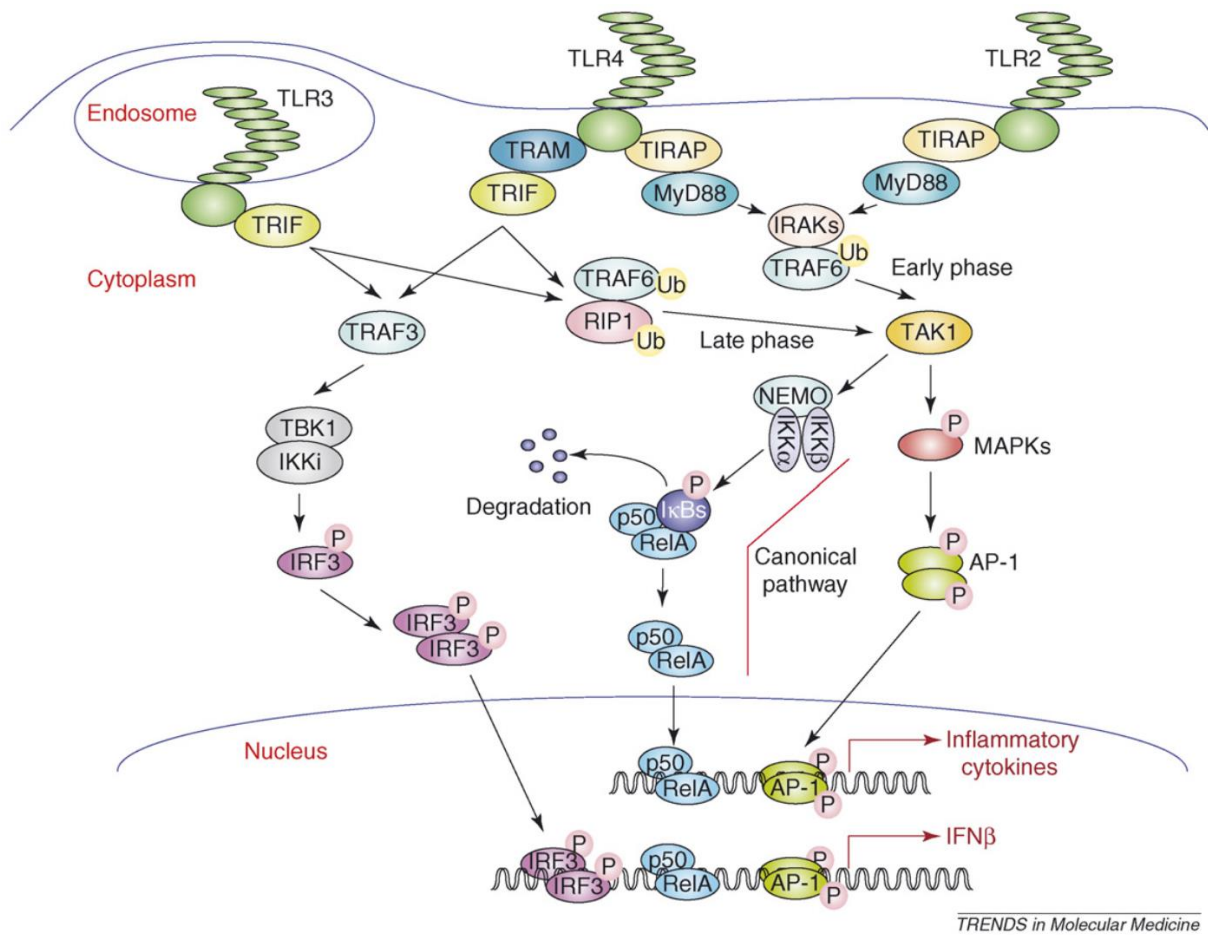
Figure 13 : Structure des FREPs. Les FREPs sont des lectines possédant un ou deux domaines immunoglobuline en N-terminal et un domaine FReD en C-terminal. Le domaine FReD est situé en C-terminal des FREP. Il est composé de trois sous-domaines (A, B et P). Le domaine A contient la terminaison N lui permettant de se connecter au reste des FREPs. Le domaine P, en C-terminal est le site de liaison interagissant avec les ligands. Les FREMs, en revanche ne possèdent pas de domaine immunoglobuline en N-terminal (Adapté de Russell F Doolittle, McNamara, et Lin 2012; Coen M. Adema 2015).

Voies de signalisation de la réponse immunitaire

La reconnaissance des PAMPs par les PRRs entraîne l'activation des récepteurs et de cascades de signalisation cellulaires. Ces cascades sont composées d'un ensemble de protéines qui, en interagissant, vont entraîner une réponse cellulaire adaptée. Parmi les nombreuses voies de signalisation décrites et impliquées dans les différents mécanismes de défense de l'immunité innée, on retrouve chez *C. gigas* : la voie de signalisation TLR/NF- κ B, la voie des MAP kinases, la voie JAK/STAT, la voie du Complément et la cascade pro-phénoloxydase (L. Wang, Song, et Song 2018).

i) La voie des TLR/NF- κ B

La voie de signalisation des TLRs est la voie de signalisation la plus décrite chez l'huître *C. gigas*. Deux voies de signalisations permettent l'activation de NF- κ B via les TLRs : la voie dépendante de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*) (principalement mobilisée au début de la voie Toll/NF- κ B), et la voie dépendante de TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) (mobilisée lors des phases plus tardives de l'activation de cette voie) (**Figure 14**). L'interaction d'un PAMP avec le domaine extracellulaire LRR du TLR conduit à la dimérisation du récepteur. La voie dépendante de MyD88 nécessite le recrutement de l'adaptateur MyD88 au niveau de sa partie intracellulaire contenant un domaine TIR en C-terminal et un domaine *death* en N-terminal (Gerdol et al. 2018). MyD88 entraîne le recrutement de protéines kinases comme les IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases), puis de TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*). TRAF6 catalyse son ubiquitination et déclenche l'activation de la kinase TAK1 (*Transforming growth factor-beta-activated kinase 1*). TAK1 phosphoryle ensuite le complexe IKK (*I κ B kinase*) (composé de IKK α , IKK β , et NEMO (*NF- κ B essential modulator*)), ce qui conduit à la phosphorylation et à la dégradation d'I κ B (*inhibitor of κ B*), et permet la libération de NF- κ B (p50-RelA). En parallèle, le complexe TAK1 active également la voie des kinases MAP (MAPK), qui activent à leur tour le facteur de transcription AP-1 (*activator protein-1*). NF- κ B et AP-1 se transloquent dans le noyau pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. La voie dépendante de TRIF nécessite son recrutement au niveau du domaine TIR des TLRs et non pas de MyD88. TRIF interagit avec TRAF6 et RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), activant TAK1 et la suite de la voie de signalisation. En parallèle TRIF recrute TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*) qui interagit ensuite avec TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et IKKi (*Inducible I κ B kinase*), deux protéines kinases phosphorylant IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3). Une fois phosphorylé, IRF3 forme des dimères qui vont pouvoir se transloquer dans le noyau, où ils agissent comme facteurs de transcription, avec NF- κ B et AP-1, pour réguler l'expression des gènes codant pour des interférons de type I, impliqués dans la réponse antivirale (Kawai et Akira 2007).



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 14 : Voie Toll/NF-κB chez l'homme. Les voies i) précoce et dépendante de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*), et ii) tardive et dépendante de TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) sont représentées. Ces voies conduisent à l'activation et à la translocation dans le noyau de NF-κB, mais aussi de IRF3 et de AP-1. Adapté de (Kawai et Akira 2007).

Au niveau transcriptomique, les protéines impliquées dans la voie TLR dépendante de MyD88 ont été décrites chez *C. gigas* (TLR, MyD88, IRAK, TRAF, IKK, IκB and NF-κB) (Linlin Zhang, Li, et Zhang 2011a). Trois protéines majeures de la voie de signalisation Rel / NF-κB ont été décrites chez *C. gigas* par des approches protéomiques (Rel/NF-κB, IκB et IKK) (C. Montagnani et al. 2004; C. Montagnani, Labreuche, et Escoubas 2008; Escoubas et al. 1999). Lors d'un challenge bactérien, MyD88, TRAF, cactus (un homologue de IκB) et ECSIT (un intermédiaire de la voie Toll interagissant avec TRAF) sont surexprimés chez *C. gigas*, mettant en évidence l'importance de l'implication de cette voie dans la réponse antibactérienne (Gueguen et al. 2003). La mise en évidence de quatre *Interferon Regulatory Factor* (IRF) chez *C. gigas* (Linlin Zhang et al. 2015) suggère l'existence de voies alternatives à la voie dépendante de TRIF, impliquée dans la réponse antivirale, faisant intervenir les IRF. Les homologues de TRIF ne sont pas encore décrits chez les bivalves (Gerdol et al. 2018). Toutefois IRF3 est

surexprimé après un challenge avec le virus OsHV-1 suggérant la conservation d'une voie interféron dépendante de la voie des TLRs alternative à celle des vertébrés, pour le moment peu connue (Green et Montagnani 2013).

ii) La voie des Mitogen Activated Protein Kinases

Comme souvent en signalisation cellulaire, les protéines impliquées dans la voie NF- κ B sont reliées à d'autres voies de signalisation, comme notamment la cascade des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) régulant l'expression de gènes en parallèle de l'activation de NF- κ B et de IRF. L'activation des MAPKs peut être déclenchée par de nombreux stimuli (facteurs de croissance, cytokines, bactéries, virus, stress oxydatif, etc.), et conduit à l'expression de gènes impliqués dans la survie, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Gerdol et al. 2018; Epelboin et al. 2016). La cascade des MAPK joue aussi un rôle très important dans les réponses immunitaires innées, allant de l'induction de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines et les chimiokines, à l'activation de voies de rétroaction anti-inflammatoires. Cette cascade fait intervenir trois principales sous-familles de protéines : les ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), les kinases p38, et les JNKs (*Jun N-terminal kinases*). Chacune de ces kinases sont activées par des cascades de phosphorylation impliquant des sérine/thréonines kinases : les MAP3Ks (*MAP kinase kinase kinases*), qui activent les MAP2K, qui à leur tour activent les MAPK. Comme décrit précédemment, dans le contexte de l'activation des TLRs suite à sa liaison avec des PAMPs, TAK1 (une MAP3K) est activée (**Figure 15**). TAK1 phosphoryle et active MKK3 et MKK6 (des MAP2Ks) qui à leur tour phosphorylent et activent p38 α et enfin MK2. MKK3/6 peuvent aussi être activées par le complexe ASK1/TRAF2/TRAF6 dont la formation dépend de la dissociation du complexe AKS1/TRX induite par des ROS (*Reactive Oxygen Species*) produites lors de l'interaction TLR-ligand. MK2 est impliquée dans la production de TNF via l'inhibition de TTP (Tris Tetra Proline) et inhibe la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. TAK1 active aussi MKK4 et MKK7, qui à leur tour phosphorylent et activent JNK1 et JNK2. JNK1/2 phosphorylent c-Jun, un composant du complexe AP-1 (décrit précédemment dans la voie TLR/NF- κ B), conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoire (TNF, IL-1 β). JNK1/2 régulent aussi la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 pro-inflammatoire. Ces macrophages expriment des niveaux plus élevés de iNOS (l'oxyde nitrique synthase inductible via les cytokines), de TNF et de IL-6. TAK1 phosphoryle et active aussi la sous-unité IKK2 du complexe IKK. IKK2 phosphoryle et inhibe p105, conduisant à sa dégradation et à l'arrêt de l'inhibition de TLP2 et

sa libération du complexe p105/TLP2/ABIN2. TLP2 phosphoryle et active MKK1 et MKK2, responsables de la phosphorylation et de l'activation d'ERK1/2. Une fois activé, ERK1/2 transloque dans le noyau où il régule l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines inflammatoires comme TNF, IL-1 β , IL-10, IL-12, IFN β , et des iNOS (Arthur et Ley 2013).

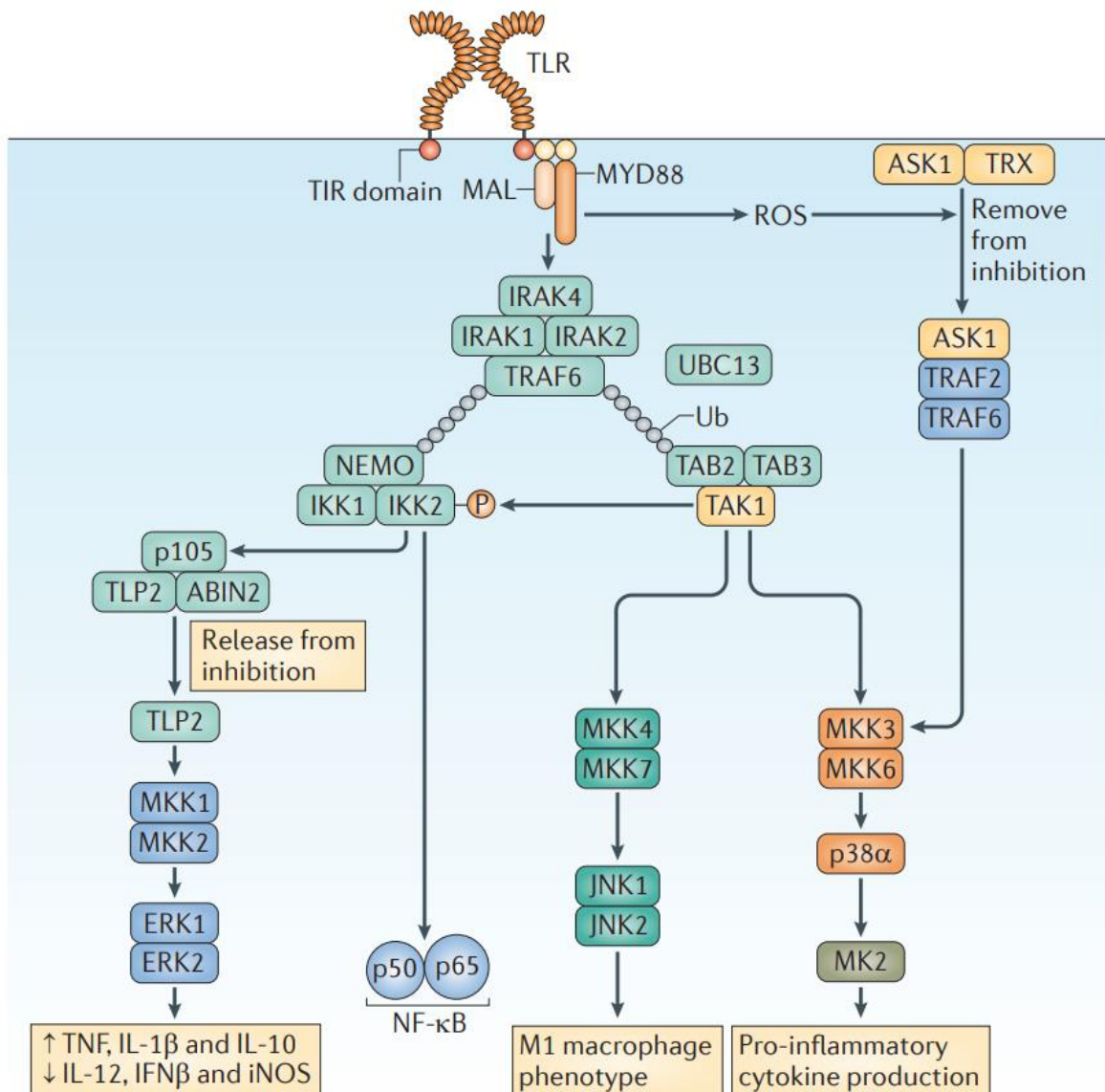


Figure 15 : Activation des MAPKs par la voie des TLRs et rôle dans l'immunité innée chez l'homme. Suite à la liaison d'un TLR avec son ligand, plusieurs cascades de MAPK conduisent à l'activation d'ERK1/2, de JNK1/2 et de MK2. L'activation du complexe NEMO/IKK1/IKK2 conduit à l'activation d'ERK1/2, entraînant la production de TNF, IL-1 β et d'IL-10 et inhibant la production d'IL-12, IFN β et d'iNOS. L'activation de TAK1 conduit à l'activation de JNK1/2, entraînant l'activation des macrophages M1 pro-inflammatoires. L'activation de MK2 dépend de l'activation de TAK1 et du complexe ASK1/TRAF2/TRAF6, conduisant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Adapté de (Arthur et Ley 2013).

Chez *Crassostrea hongkongensis*, des MAPKs ou protéines impliquées dans l'activation de la cascade des MAPKs ont été mis en évidence par recherche de séquences dans une banque de contigs EST (*Expressed Sequence Tags*). ECSIT, p38 et JNK ont été caractérisées comme exprimées respectivement dans les hémocytes, le muscle adducteur, et le manteau de l'huître et dont l'expression est induite suite à une stimulation par *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus heamolyticus* et *Saccaromyces cerevisiae* pour ECSIT. Ces protéines sont surexprimées aux stades de développement trochophore (pour p38 et JNK) et larve D (pour ECSIT) (Qu et al. 2015; 2016; 2017). Chez *C. gigas*, 371 protéines kinases ont été mises en évidence en se basant sur un protéome généré *in silico*. Parmi ces protéines kinases, *Cg*-ERK, *Cg*-p38 et *Cg*-JNK, faisant partie du groupe des CMGC (regroupant les CDK (*Cyclin-Dependent Kinases*), les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), les GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) et les CLK (*Cdc2-Like Kinases*)) ont été mises en évidence. 92% des kinases faisant partie de ce groupe sont exprimées dès le stade d'œuf, et l'entièreté de ce groupe de kinases est ensuite exprimée dans les autres stades de développement de l'huître. Les auteurs montrent aussi l'impact de différents facteurs physiques (hypoxie, température, salinité) et de polluants métalliques (cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc) sur l'expression de kinases. Seule l'hypoxie régule négativement de manière importante les kinases de ce groupe (41%), suivie de la température (13%) (Epelboin et al. 2016). Cependant, ces travaux ne nous donnent que peu de détail sur les kinases dérégulées par ces facteurs physiques ou métalliques où lors des stades de développement de l'huître. De plus, l'absence d'autres kinases impliquées dans l'immunité (les MKKs notamment) ne nous permet pas de confirmer l'existence de la cascade complète des MAPKs liées à l'immunité chez *C. gigas*. *Cg*-p38 et *Cg*-JNK sont majoritairement exprimées dans les hémocytes, et lors d'une stimulation au LPS, *Cg*-p38 et *Cg*-JNK sont surexprimées et quantifiées sous forme phosphorylée (active) (J. Sun et al. 2018; 2019). *Cg*-p38 montre une surexpression après challenge avec *V. aestuarianus*. En comparant le niveau d'expression des interleukines après stimulation au LPS sur des hémocytes sauvages et des hémocytes invalidés pour *Cg*-p38 ou pour *Cg*-JNK, ces auteurs montrent une perte de l'expression significative de celles-ci chez les huîtres invalidées (J. Sun et al. 2018; 2019). Ces résultats montrent l'importance de *Cg*-JNK et *Cg*-p38 dans la réponse à une stimulation au LPS, donc possiblement suite à une infection par des bactéries. Cependant, plus de travaux sont nécessaires, notamment pour étudier l'impact d'une plus grande diversité d'agents biotiques (bactéries, virus, champignons et parasites) sur le niveau d'expression et d'activation d'ERK, JNK et p38, et donc confirmer l'implication de ces kinases dans l'immunité innée chez *C. gigas*.

iii) La réponse antivirale via la voie JAK/STAT

De nombreuses voies de signalisation sont activées lors d'une réponse antivirale, soit par l'induction de l'expression de facteurs antiviraux (voies Toll/NF-kB et JAK/STAT) ou soit par l'induction d'une lyse cellulaire par apoptose (voie des TNFs) (Green et al. 2015).

La voie JAK/STAT est une voie clé de l'immunité innée. L'initiation de cette voie dépend de la liaison entre une cytokine et un récepteur à cytokine (**Figure 16**). Cette liaison provoque l'oligomérisation des récepteurs, rapprochant ainsi les kinases JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) associées à la partie intracellulaire du récepteur. Les JAKs se phosphorylent mutuellement, créant des sites de liaison pour les protéines STAT. Les STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, et STAT6) sont ensuite phosphorylés sur des résidus tyrosine par les JAKs, ce qui entraîne leur dimérisation. Les dimères de STAT sont transloqués dans le noyau, où ils se lient à des motifs GAS ou ISRE. Certains gènes dont l'expression dépend de la liaison d'un dimère STATs sur un motif GAS sont impliqués dans l'activation des macrophages (IFNG : Interféron Gamma), dans la prolifération (IL2RA : Récepteur de l'IL-2) et la différenciation (BCL6 : B-cell lymphoma 6) des lymphocytes T et dans la différenciation et la production d'anticorps par les lymphocytes B (PRDM1 : PR domain zinc finger protein 1) chez l'homme. Les gènes dont l'expression dépendent de la liaison d'un complexe STAT1/STAT2/IRF9 sur un motif ISRE sont impliqués dans l'immunité antivirale (IFIT1 : *Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1*, MX1 : *Myxovirus Resistance Protein 1*, OAS1 : *2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1*, ISG15 : *Interferon-Stimulated Gene 15*).

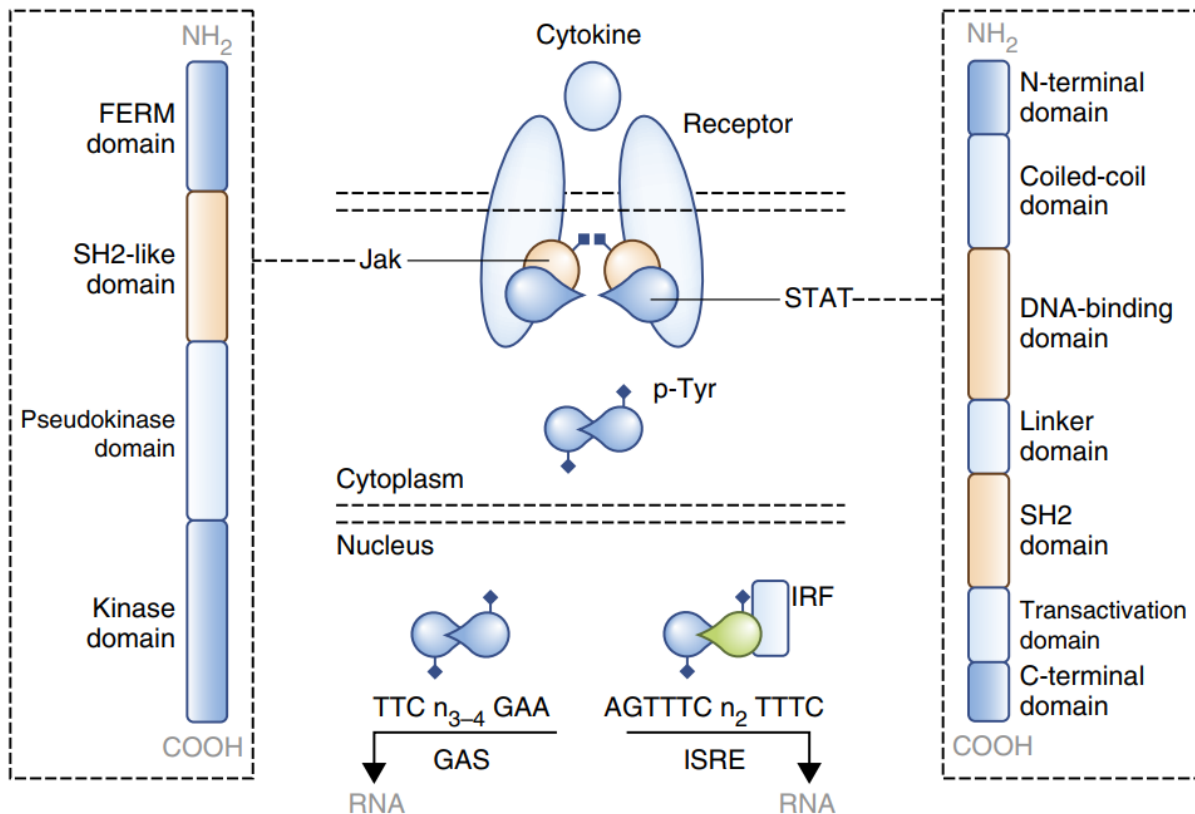


Figure 16 : Voie de signalisation canonique JAK/STAT. La liaison d'une cytokine à un récepteur associé conduit à l'activation de JAK (*Janus Kinase*) composée d'un domaine FERM (*4.1-ezrin-radixin-moesin*) en N-terminal, suivi d'un domaine SH2-like (*Src Homology 2 - like*), d'un domaine Pseudokinase et d'un domaine Kinase en C-terminal. JAK active ensuite STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) composé d'un domaine N-terminal, un domaine en super-hélice (*Coiled-coil*), un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison (*Linker domain*), un domaine SH2, un domaine de transactivation et un domaine C-terminal. STAT se transloque dans le noyau pour se fixer à des motifs GAS (*Gamma Activated Sequence*) ou ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*), permettant l'expression de gènes liés à l'immunité. Adapté de (Villarino, Kanno, et O'Shea 2017).

La voie JAK/STAT a été mise en évidence chez *C. gigas*, grâce à la découverte du récepteur *Cg-IFNR* et de son ligand (*Cg-IFNLP*) dont l'expression est augmentée en présence de poly I:C (Acide polyinosinique-polycytidylique) (R. Zhang et al. 2016). Ces mêmes auteurs montrent chez *C. gigas* l'augmentation de l'expression de STAT3 suite à l'activation de *Cg-IFNR* par *Cg-IFNLP* (R. Zhang et al. 2016). Ensemble, ces résultats suggèrent que plusieurs voies de signalisation se coordonnent afin de répondre de manière adaptée à une infection virale chez *C. gigas*. L'induction d'une réponse dépendante de l'interféron due à une infection virale dépend aussi de l'interaction des NLRs avec leurs ligands. Cette réponse nécessite la protéine CARDIF (*CARD adaptor inducing IFN-β*) et l'adaptateur VISA (*Virus Induced Signal Adaptor*) (Meylan et al. 2005; Xu et al. 2005). L'identification de *Cg-MAVS*, un homologue fonctionnel de VISA, en raison de sa surexpression suite à une infection virale, son interaction avec le domaine CARD de RIG-I-1, ainsi que l'observation d'une mortalité accrue chez les animaux

infectés par OsHV-1 après inhibition de Cg-MAVS par RNAi, confirment l'existence d'une réponse antivirale dépendante des NLRs chez *C. gigas* (B. Huang et al. 2017).

iv) La voie du complément

Le système du complément est une composante majeure de l'immunité innée. Il s'agit d'une cascade de protéines solubles et de récepteurs membranaires qui sont activés par trois voies principales qui convergent toutes vers l'activation de la protéine C3 par son clivage par une C3 convertase. Chez l'homme, la voie classique est activée via la liaison de C1q à la partie Fc (Fragment cristallisable) des anticorps fixée à leurs antigènes, ou via la liaison aux structures glycosylées à la surface des bactéries, virus et champignons. Ces liaisons activent C1r et C1s, constituant le complexe C1 et déclenchant la voie du complément. La voie des lectines est activée via la liaison de celles-ci aux PAMPs, s'associant avec des sérine protéases (les MASP : *mannan-binding lectin-associated serin proteases*), qui clivent C4 et C2, générant une C3 convertase similaire à celle de la voie classique. Enfin, la voie alternative est activée directement par l'hydrolyse de C3. Ces voies conduisent au clivage de C3 en C3a et C3b. C3b se fixe sur les agents pathogènes et joue le rôle d'opsonine en solubilisant les complexes immuns anticorps-antigènes, facilitant leur élimination via la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles. C3b contribue aussi au clivage de C5 en C5a et C5b. C5b s'associe à C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire, se fixant sur des micro-organismes pathogènes et conduisant à leur lyse. C3a et C5a sont des anaphylatoxines contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire via l'activation et le recrutement d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, éosinophiles et macrophages) sur le site de l'infection. Ces voies contribuent ainsi à l'élimination des micro-organismes pathogènes via la lyse des cellules, l'opsonisation, la modulation de la production de cytokines et l'activation des réponses inflammatoires (Oikonomopoulou, Reis, et Lambris 2012; Merle et al. 2015; Bohlson et al. 2014). Les C1qDC (C1q Domain Containing Protein) sont des protéines appartenant au système du complément. Découverte pour la première fois en 2004 chez l'homme (Aerbajinai et al. 2004), ces protéines extracellulaires contiennent un domaine C1q en C-terminal, une région collagène en super-hélice, retrouvée aussi dans la région centrale de C1q chez les vertébrés, et nécessaire à l'oligomérisation de ces protéines, une région variable, et un peptide signal en N-terminal (Gerdol et al. 2018). Chez les bivalves, les gènes C1q sont induits suite à une infection par des bactéries à Gram positives ou négatives, des champignons, mais aussi par une stimulation directe avec du LPS, du peptidoglycane, du β -glucan et du poly I:C (Gerdol et al. 2018). Plusieurs protéines impliquées dans la voie du complément ont été mises en évidence

chez *C. gigas* (**Figure 17**). Chez *C. gigas*, près de 337 gènes codent pour des C1qDC avec une localisation prédite comme cytoplasmique, transmembranaire ou extracellulaire. Parmi ces Cg-C1qDC, certaines sont spécifiquement exprimées dans les glandes digestives (156 C1qDC), les branchies (73 C1qDC) et les hémocytes (5 C1qDC), tandis que les 91 C1qDC restantes ne sont pas exprimées préférentiellement dans certains tissus (Gerdol, Venier, et Pallavicini 2015). Parmi ces C1qDC, C1qDC-6 et C1qDC-7 montrent une affinité particulière envers le peptidoglycan, le LPS, le mannane (polysaccharide composé de mannose) et le poly I:C (uniquement pour C1qDC-6) (Zong et al. 2019; Huan Li et al. 2019). C1qDC-6 recombinante (rC1qDC-6) joue aussi le rôle d'opsonine contre *Vibrio splendidus*, et facilite la phagocytose de cette bactérie par les hémocytes *in vitro* (Huan Li et al. 2019). Un homologue à C3 a été mis en évidence chez *C. gigas* (Cg-C3), tout comme neuf récepteurs à C3 surexprimés lors d'une stimulation au LPS. La conservation de la structure de Cg-C3 comparée celle de vertébrés a été confirmée par clivage des chaînes α , β et γ et détection en western-blot via l'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiques de ces chaînes (L. Wang et al. 2017). D'autres auteurs montrent que Cg-C3 peut être clivée suite à une stimulation par *V. splendidus* (J. Sun et al. 2021). D'autres protéines homologues à celles impliquées dans la voie des lectines du complément ont pu être mises en évidence chez *C. gigas* comme Cg-CLec-2, -4 et -5 avec des activités similaires aux MBLs (*Mannose Binding Lectins*) des vertébrés et avec une activité antimicrobienne de Cg-CLec-4 contre des bactéries et des champignons (Hui Li et al. 2015; Jia et al. 2016). Une MASP a été mise en évidence chez *C. gigas*, exprimée majoritairement dans l'hémolymphe, capable de se lier au LPS et au peptidoglycane et induite suite à une infection par *V. splendidus* (Wei et al. 2023). Cg-CLec-CCP, une lectine de type C reconnaissant des PAMPs, est capable de se lier à Cg-MASPL-1 pour promouvoir le clivage de Cg-C3. Après infection avec *V. splendidus*, des huîtres dont les gènes codants pour Cg-C3, Cg-MASPL-1 ou Cg-CLec-CCP sont neutralisés (KD : *Knock Down*), voient une diminution significative de la production de cytokines, de peptides antimicrobiens, et du taux de phagocytose (J. Sun et al. 2021). Ces résultats confirment l'importance de ces protéines dans la défense de *C. gigas* face aux micro-organismes pathogènes bactériens, viraux, et fongiques. Cependant, malgré la mise en évidence de C2 chez l'anémone *Aiptasia pallida* et la palourde *Sinonovacula constricta*, les protéines C4-C9 n'ont jamais été mises en évidence chez les mollusques (J. Sun, Wang, et Song 2023). Ainsi, la voie du complément n'est peut-être pas entièrement conservée chez *C. gigas*, et seulement présente de manière partielle, ou fonctionnant de manière différente à celle caractérisée chez l'Homme et ne nécessitant pas la formation du complexe d'attaque membranaire.

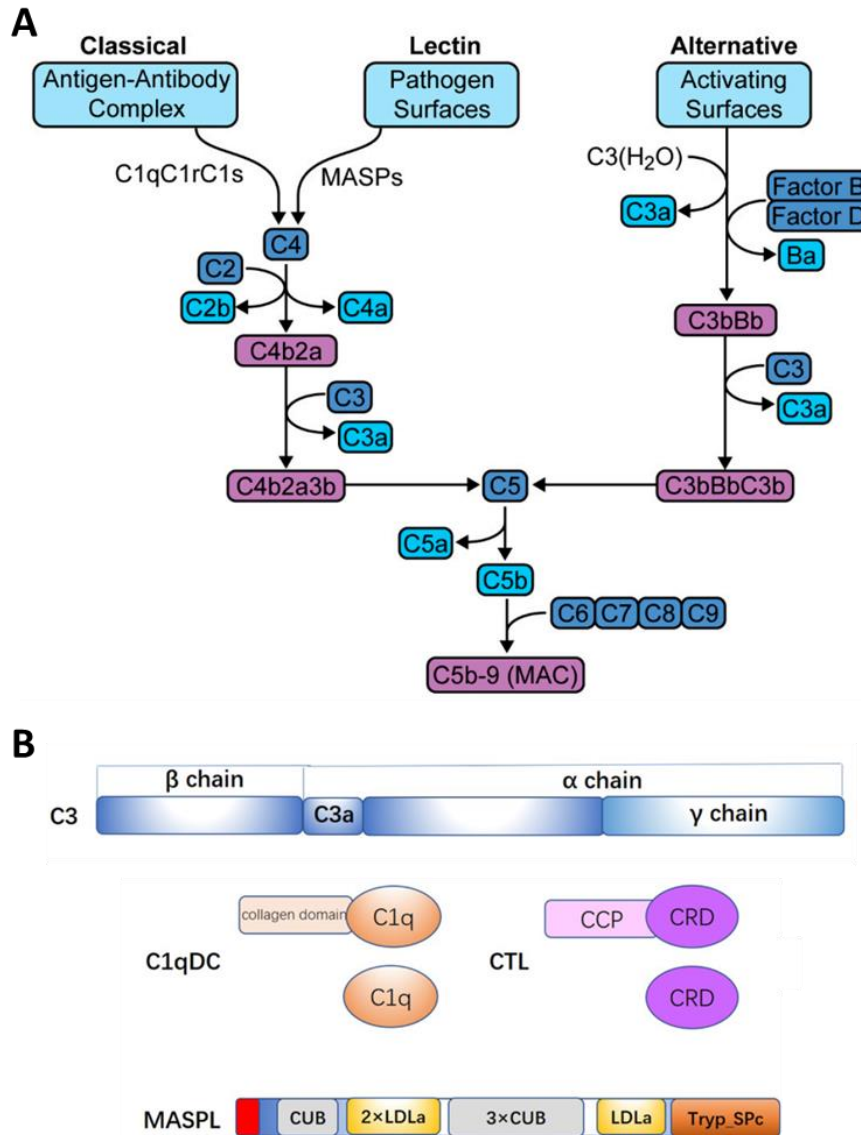


Figure 17 : La voie du complément chez l'homme. (A) La voie du complément chez les vertébrés est composé de 3 voies principales. La voie classique et celle des lectines dépendent respectivement de l'activation du complexe C1 (C1qC1rC1s) et MASPs. La voie alternative dépend du clivage de C3. Ces voies nécessitent des C3 convertases (C4b2a et C3bBb) clivant C3 en C3a et C3b. C3b possède une activité C5 convertase (C4b2a3b et C3bBbC3b) clivant C5 pour former le complexe d'attaque membranaire C5b-9 (MAC). (B) Protéines mises en évidence chez *C. gigas* et faisant partie de la voie du complément. C3 (avec la chaîne α , β et γ , ainsi que C3a, après clivage par la C3 convertase), C1qDC (possédant un domaine collagène, suivi du domaine C1q), lectines de type C (CTL) (possédant ou pas le sous-domaine CCP : *complement control protein*, suivi du domaine CRD : *carbohydrate-recognition domain*) et MASPL (dont les sous-domaines ne sont pas décrits chez *C. gigas*). Adapté de (J. Sun, Wang, et Song 2023; Ng et Powell 2021).

v) La cascade de la pro-phénoloxydase

La cascade de la proPO (prophénoloxydase) est impliquée dans les défenses immunitaires des invertébrés conduisant à des mécanismes d'encapsulation et de mélanisation (**Figure 18**). Chez les crustacés, la reconnaissance de PAMPs par les PGRPs conduit à l'activation de ppA (*proPO-activating enzyme*), responsable du clivage de la proPO en PO active (Cerenius, Lee, et Söderhäll 2008). La PO sous forme active transforme la tyrosine en L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) puis en o-dopaquinone, résultant *in fine* en la production d'eumélanine ou de pheomélanine (Y.-J. Kim et Uyama 2005). La ppA clive la proPXN (properoxinectine : un homologue de la myéloperoxydase) en PXN (peroxinectine), qui sous sa forme active possède des activités d'opsonine et est capable de promouvoir l'encapsulation. PXN est aussi capable de s'associer avec une superoxyde dismutase extracellulaire et avec une intégrine, permettant aux hémocytes de se lier aux bactéries et de produire des espèces réactives de l'oxygène *in situ*, afin de détruire le micro-organisme. Cette production de radicaux et d'intermédiaires toxiques lors de la cascade de la proPO et la formation de mélanine ont été montrées comme impliquées dans la résistance de nombreux invertébrés face à des agents pathogènes bactériens, fongiques, parasitaires et viraux, via leur élimination directe ou leur emprisonnement dans des capsules de mélanine (Cerenius et Söderhäll 2021).

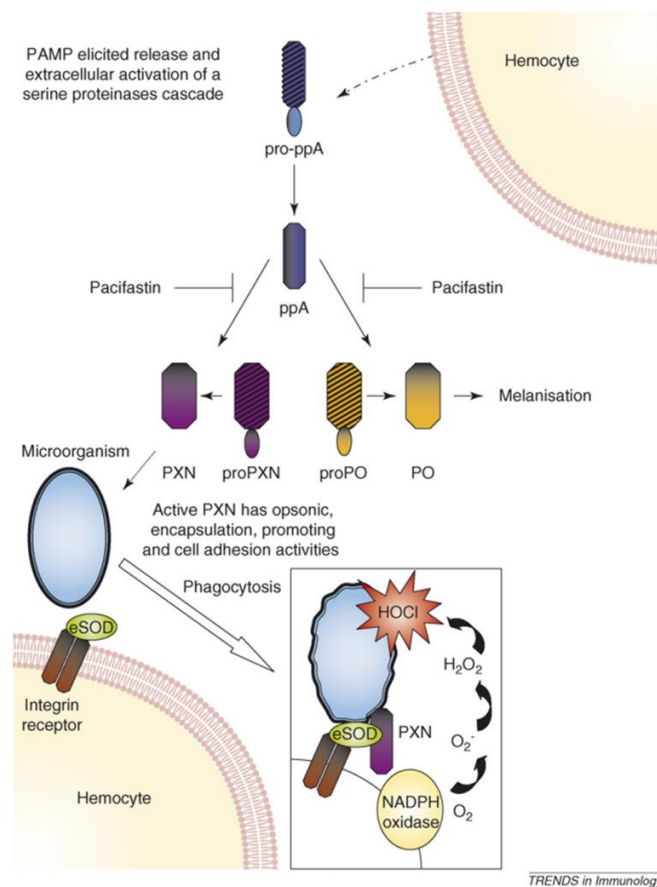


Figure 18 : Cascade de la prophénoloxydase chez les crustacés. La cascade est enclenchée suite à la liaison d'un PAMP à un PGRP, conduisant à une cascade de sérine protéinases activant la pro-ppA en ppA, elle-même impliquée dans le clivage de la proPO en PO et de la proPXN en PXN. La PO active permet la formation de la mélanine et PXN actif fonctionne comme une opsonine et encapsule la bactérie avec une superoxyde dismutase extracellulaire, promouvant la lyse de la bactérie par des espèces réactives de l'oxygène. Adapté de (Cerenius, Lee, et Söderhäll 2008).

Chez *C. gigas*, le LPS, Zymosan et la laminarine ont été montrés comme induisant l'activité PO-like impliquant une sérine protéase dans l'hémolymphe de l'huître (Hellio et al. 2007). D'autres auteurs montrent que la croissance de *V. tasmaniensis* LGP32 en lysat d'hémolymphe est perturbée lorsqu'un substrat (p-phenylènediamine ; PPD) de la PO, permettant la formation de la laccase, est présent. Les auteurs montrent une restauration de la croissance de *V. tasmaniensis* LGP32 en présence d'un inhibiteur de la cascade proPO. Ces résultats suggèrent l'implication de certains éléments de cette voie de signalisation dans la défense de l'hôte face aux bactéries qui l'infecte (Luna-Acosta et al. 2011). Cependant, aujourd'hui aucune preuve histologique ou cytologique n'a permis d'appuyer l'existence de la mélanisation chez *C. gigas* et de son rôle dans les défenses immunitaires chez cette huître.

Chez *C. gigas*, l'activation des voies de signalisation conduit à une réponse des cellules impliquant deux mécanismes. Un des mécanismes est dépendant de la synthèse d'effecteurs humoraux (peptides antimicrobiens, cytokines, lysozymes et molécules antioxydantes), tandis que l'autre fait intervenir des réponses cellulaires comme la phagocytose, l'encapsulation, et les mécanismes de mort cellulaire programmée (comme l'apoptose, la pyroptose, la nécroptose, l'autophagie, la ferroptose et l'ETose) (Evelyne Bachère et al. 2004; L. Wang, Song, et Song 2018).

c) L'immunité cellulaire chez l'huître

La phagocytose

La phagocytose est le mécanisme cellulaire d'élimination des micro-organismes pathogènes le plus décrit dans la littérature. C'est un processus cellulaire conservé chez tous les organismes eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires, dont la finalité peut être la nutrition (chez les amibes, par exemple chez *Dictyostelium*), l'immunité innée (chez les invertébrés comme *Drosophila melanogaster*), l'immunité innée et adaptative (chez les vertébrés supérieurs comme l'homme), ou le renouvellement cellulaire via le recyclage de cellules apoptotiques (Boulais et al. 2010).

La phagocytose est définie comme l'internalisation cellulaire de particules d'une taille supérieure à 0,5 μm . Plusieurs mécanismes phagocytaires sont décrits en fonction de la taille de la particule à phagocyter et de la multiplicité des interactions récepteurs-ligands. Chez l'homme, plusieurs types de cellules immunitaires sont capables de phagocytose comme les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les ostéoclastes et les éosinophiles. Ces cellules sont considérées comme les « phagocytes professionnels » en raison de leur efficacité dans l'exécution des mécanismes de phagocytose (Gordon 2016). La phagocytose est divisée en quatre grandes étapes : la reconnaissance de la particule cible, la signalisation et activation de la machinerie d'internalisation, la formation du phagosome, et la maturation du phagolysosome.

La phagocytose est initiée par la reconnaissance d'un motif, provenant d'un micro-organisme pathogène ou d'une cellule en apoptose ou nécrose par un récepteur sur la membrane plasmique. Chez l'homme, plusieurs récepteurs dits non-opsoniques (PPR reconnaissant directement des motifs PAMPs) (Dectin-1, SR-AI, CD36, MARCO, MICL, CD206 et CD169) ou opsoniques (reconnaissance des opsonines fixées sur les micro-organismes pathogènes) (FcyRIIIa, FcyRIIb et CR3) sont impliqués dans la reconnaissance des motifs associés aux micro-organismes pathogènes. Les récepteurs TIM, Stabiline-2, BAI, $\alpha\beta$ et CD36 sont quant à eux des récepteurs de corps apoptotiques. Ces récepteurs peuvent agir en monomères ou en multimères (association de plusieurs monomères entre eux) (Gordon 2016; Rosales et Uribe-Querol 2017). La reconnaissance de la particule cible provoque l'agrégation des récepteurs à la surface du phagocyte initiant les cascades de signalisation intracellulaire régulant la réorganisation du cytosquelette. Le remodelage du cytosquelette d'actine va dépendre des protéines de la famille Rho. Les protéines de la famille Rho appartiennent à la superfamille des petites GTPases. Ce sont des protéines de 21kDa capables de lier des nucléotides guanidiques (GTP et GDP). Elles existent sous deux états, un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Sous forme active les GTPases Rho sont capables de lier des protéines effectrices, impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la phosphorylation de la myosine, l'organisation de l'actine, l'adhérence cellulaire, la forme de la cellule, la motilité, et le trafic membranaire (Etienne-Manneville et Hall 2002). Dans le cas de la phagocytose, le remodelage de l'actine est dépendant de Rac1, Cdc42, et RhoA. Ces GTPases Rho jouent le rôle de commutateurs moléculaires et ont un rôle central dans la régulation du réarrangement du cytosquelette d'actine. Leur activation permet le recrutement et l'activation de WASp/N-WASp (*Wiskott-Aldrich Syndrom protein*) et du complexe Arp2/3, qui induit la polymérisation d'actine permettant la formation de pseudopodes qui s'étendent pour entourer et isoler la particule dans une vésicule

intracellulaire appelée phagosome (Chimini et Chavrier 2000; Rosales et Uribe-Querol 2017). Une fois internalisé, le phagosome suit plusieurs étapes de maturation (**Figure 19**). Il fusionne dans un premier temps avec des endosomes précoces à l'aide de (EEA1 : *Early Endosome Antigen 1*), recruté par la GTPase Rab5. Ces endosomes permettent l'acidification progressive du phagosome (pH entre 6,1 et 6,5) via le recrutement de V-ATPases, permettant l'accumulation de protons (H^+) à l'intérieur du phagosome. Le complexe HOPS (*Homotypic Protein Sorting*) coordonne l'échange de Rab5 contre Rab7 permettant la fusion du phagosome avec des endosomes tardifs. En parallèle, le phagosome fusionne avec des corps multi-vésiculaires contenant des protéines membranaires destinées à être dégradées. Une fois ces protéines dégradées, Rab7 recrute RILP (*Rab Interacting Lysosomal Protein*), une protéine possédant une affinité pour les complexes dynéine-dynactine, liant ainsi le phagosome aux microtubules, rapprochant ce dernier du noyau. En parallèle, de plus en plus de V-ATPases s'accumulent à la surface du phagosome, le rendant plus acide (pH entre 5,5 et 6). À ce stade, le phagosome acquiert des LAMPs (*Lysosomal-Associated Membrane Proteins*) et des protéases (cathepsines et hydrolases) grâce à la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs ou grâce à l'appareil de Golgi. Le phagosome tardif fusionne finalement avec des lysosomes pour former le phago-lysosome. Cette fusion dépend de la synthèse de phosphatidylinositol-4-phosphate par la phosphatidylinositol-4-kinase (PI4K) (Jeschke et Haas 2018). Le phago-lysosome est caractérisé par un pH très acide (pH 4.5 à 5.0), une concentration élevée en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, nucléases), en lactoferrine (séquestrant le fer nécessaire à certaines bactéries) et en espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces espèces réactives de l'oxygène, ainsi que le monoxyde d'azote (NO, radical libre) et l'acide hypochloreux (HOCl), participent activement à la dégradation et à l'élimination des micro-organismes pathogènes ingérés (Rosales et Uribe-Querol 2017). Chez l'homme, les macrophages dégradent complètement la particule contenue dans le phagosome, tandis que la protéolyse par les cellules dendritiques est incomplète et les peptides antigéniques s'associent aux complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH-I et CMH-II) afin d'être présentés aux lymphocytes CD4+ et CD8+, conduisant à leur activation (Gordon 2016). Une fois la particule détruite, les acides aminés, les lipides et les sucres, sont récupérés et recyclés par la cellule (Rosales et Uribe-Querol 2017).

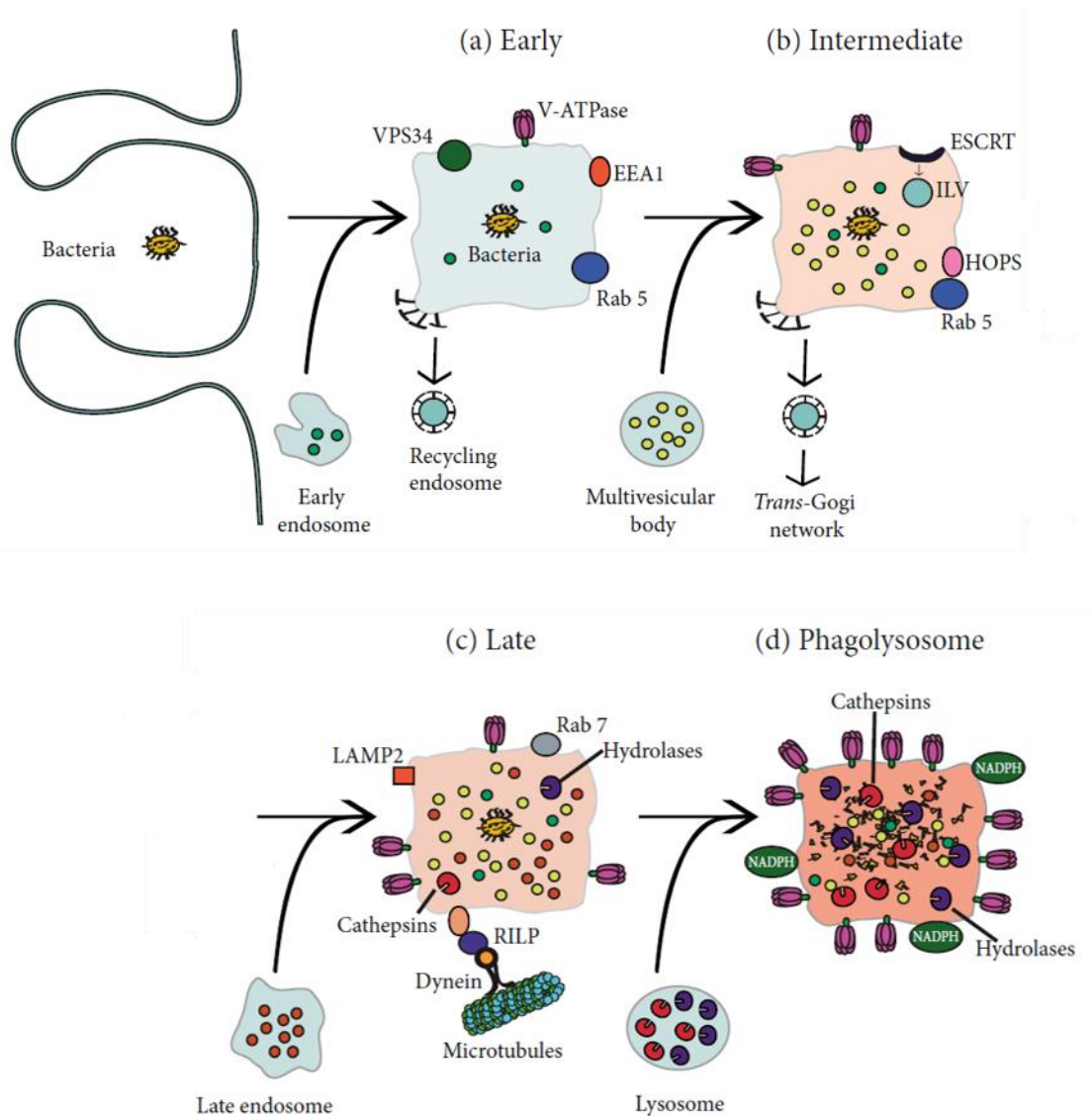


Figure 19 : Maturation du phagosome chez les vertébrés. Le stade précoce (a) débute par la fusion du phagosome avec des endosomes précoces. Des VPS34 (PI 3-kinase de classe III) génèrent du PI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphate) permettant la fixation de EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) sur la face cytosolique du phagosome et participant au recrutement de Rab7. Au stade intermédiaire (b), les corps multivésiculaires fusionnent avec le phagosome et ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) permettant l'entrée dans le phagosome d'ILV (*IntraLuminal Vesicles*) contenant des protéines membranaires vouées à être dégradées. Le stade tardif (c) est caractérisé par la fusion du phagosome avec des endosomes tardifs contenant des cathepsines et hydrolases. Enfin, la fusion avec des lysosomes permet la formation de phago-lysosomes (d), terminant la dégradation de la particule phagocytée. Adapté de (Rosales et Uribe-Querol 2017).

La phagocytose est le mécanisme principalement impliqué dans l'élimination des micro-organismes pathogènes chez *C. gigas* (L. Wang, Song, et Song 2018; W. Wang et al. 2017a). À ce jour, les étapes cruciales permettant aux hémocytes de *C. gigas* de phagocyter les micro-organismes pathogènes ont été mis en évidence, allant de la formation à la maturation du

phagosome (Mao et al. 2020) (**Figure 20**). Seuls les granulocytes sont à ce jour considérés chez *C. gigas* comme des phagocytes professionnels en raison de leur indice phagocytaire plus élevé pour le Zymosan, les billes de latex et les bactéries du genre *Vibrio* (K. G. Takahashi, Izumi-Nakajima, et Mori 2017; W. Wang et al. 2017a; S. Jiang et al. 2018).

Chez *C. gigas*, plusieurs récepteurs membranaires sont aujourd'hui considérés comme essentiels à la phagocytose de corps étrangers par les hémocytes. Parmi ces récepteurs, Cg-NimC de la famille Nimrod a une affinité importante pour les lipopolysaccharides et une faible affinité pour le peptidoglycane. L'indice de phagocytose des hémocytes envers deux bactéries du genre *Vibrio* est atténué en présence d'un anticorps anti Cg-NimC (W. Wang et al. 2015). Cg-CD63H, un homologue de CD63 chez l'Homme, normalement connu comme marqueur des endosomes tardifs (Kobayashi et al. 2000), reconnaît *Vibrio splendidus* et *Yarrowia lipolytica* via la liaison avec les PAMPs (glucane, peptidoglycane et lipopolysaccharides) et permet la formation du phagosome (Liu et al. 2020). Les intégrines sont des protéines impliquées dans l'adhérence des cellules, dans la transduction de signaux intracellulaires et dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Takada, Ye, et Simon 2007). Chez *C. gigas*, elles sont aussi impliquées dans la reconnaissance du LPS et des bactéries à Gram négatif (*Vibrio splendidus* et *Escherichia coli*), dont elles permettent la phagocytose. À ce jour, trois intégrines ont été étudiées chez *C. gigas* (β -intégrine, Cg- β V et Cg-Integrin) (Terahara et al. 2006; Jia et al. 2015; Lv, Qiu, et al. 2019). L'analyse fonctionnelle de (S. Jiang et al. 2016) révèle aussi l'implication des lectines dans la reconnaissance de *Vibrio splendidus* et de *Staphylococcus aureus* lors de leur phagocytose.

La phagocytose chez *C. gigas* dépend aussi des opsonines, protéines présentes dans l'hémolymphe et se liant aux corps étrangers afin de faciliter la phagocytose. Cg-C1qDC-5, une opsonine extracellulaire présente dans l'hémolymphe, est capable de se fixer sur *E. coli*, *V. splendidus* et *V. anguillarum* et facilite leur phagocytose par les hémocytes en se liant aux β -intégrines (Lv, Wang, et al. 2019). La superoxyde dismutase extra cellulaire de *C. gigas* (Cg-EcSOD) a été décrite comme ayant la capacité d'opsoniser des bactéries sur leur LPS et sur leurs lipides A. Cg-EcSOD va par la suite se lier aux β -intégrines présentes à la surface des hémocytes pour déclencher la phagocytose (Marcelo Gonzalez et al. 2005). Cg-FReP1, une Fibrinogen-Related Protein majoritairement exprimé dans les palpes labiaux, est capable d'agglutiner les bactéries à Gram positif et négatif et facilite aussi la phagocytose des bactéries par les hémocytes, notamment en présence de Ca^{2+} (W. Yang et al. 2021; M Dupertuy et al. 2010).

Un inhibiteur des GTPases Rho (RhoGDI) a été caractérisé chez *C. gigas* et son inhibition conduit à une augmentation de la proportion d'hémocytes phagocytaires et de l'indice de phagocytose d'*E. coli* par les hémocytes (Mao et al. 2020). De plus, 7 protéines Rab ont été identifiées dans le protéome de *C. gigas* (Rab1, Rab2, Rab7, Rab11, Rab14, Rab21, Rab33) (Mao et al. 2020). Ces résultats confirment l'implication des GTPases Rho dans les mécanismes de phagocytose d'*E. coli* chez les hémocytes de *C. gigas*. *Cg-K1QKL8* et *Cg-K1Q9V3*, deux transporteurs de protons (V-ATPases) ont été mis en évidence chez *C. gigas* (Mao et al. 2020). L'inhibition de la PI4K et donc de la formation du phagolysosome chez *C. gigas*, conduit à une baisse significative de la capacité des hémocytes à éliminer *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio parahaemolyticus* (Mao et al. 2020). Chez *C. gigas*, les lysosomes contiennent majoritairement des cathepsines, des protéases ayant des activités bactéricides, ainsi que des oxydases (Lv et al. 2018; S. Jiang et al. 2018). Ensemble, ces résultats suggèrent que les étapes de formation et de maturation du phagosome, via l'implication de GTPases Rho, la fusion phago-lysosomale, et l'action de transporteurs de protons, sont conservés et indispensables à la destruction de particules par les hémocytes de *C. gigas*.

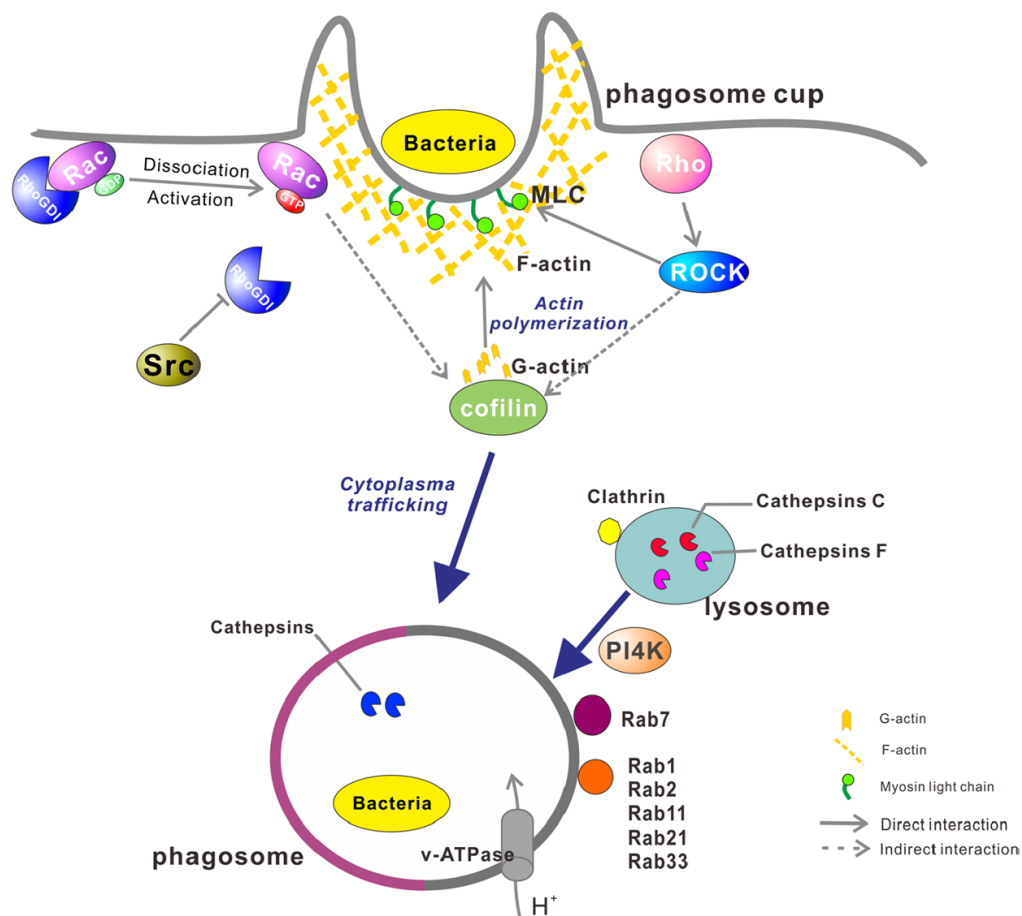


Figure 20. Résumé schématique des événements clés de la formation et de la maturation du phagosome chez *C. gigas*. La bactérie est reconnue par des PRRs ou par la liaison opsonine – récepteur.

S'ensuit la formation de la vacuole phagocytaire par polymérisation contrôlée de l'actine. Cette étape nécessite l'activation de la cofiline qui permet la mise à disposition de monomères d'actine-G. La constitution du réseau d'actine-F nécessaire lors de la phagocytose implique l'activation des chaînes légères de myosine (MLC) par phosphorylation dépendante de ROCK (*Rho-associated protein kinase*). Sans phagocytose, les GTPases Rac sont inactives et liées au GDP via l'action de RhoGDI (*Rho GDP-dissociation inhibitor*). La tyrosine kinase Src entraîne l'inactivation des GTPases Rho par phosphorylation des RhoGDI (*Rho GTPase Dissociation Inhibitors*), empêchant de former un complexe avec les protéines Rac (DerMardirossian et al. 2006). Une fois la vacuole phagocytaire formée, la PI4K (phosphatidylinositol 4-kinase), avec les protéines Rab (Rab7, Rab1, Rab2, Rab11, Rab21 et Rab33) va permettre la fusion phagosome-endosome et phagosome-lysosome conduisant à la libération de cathepsines et le recrutement de V-ATPases, contribuant à éliminer l'agent pathogène. Adapté de (Mao et al. 2020).

Les morts cellulaires programmées

La mort cellulaire programmée est essentielle pour le développement et le maintien de l'intégrité d'un organisme. Elle participe au développement des organes, au remodelage des tissus, au renouvellement des cellules épithéliales, à la réponse des cellules aux stress, à l'homéostasie cellulaire de façon générale et prévient le développement des cancers (Ameisen 2002). Chez l'homme, la mort cellulaire programmée participe à l'immunité innée et adaptative dans la réponse antivirale, l'élimination de micro-organismes pathogènes intracellulaires, la régulation et l'amplification de la réponse inflammatoire, la production de cytokines, la chemoattraction et la sélection des lymphocytes. Il existe de nombreuses voies de mort cellulaires décrites à ce jour et impliquées dans la réponse immunitaire innée chez l'Homme (apoptose, pyroptose, nécroptose, autophagie, et NETose) (Riera Romo 2021), mais chez les mollusques, l'apoptose est la seule voie de mort cellulaire ayant fait l'objet d'une recherche intensive (Romero, Novoa, et Figueras 2015; Gerdol et al. 2018).

L'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire le plus conservé chez les métazoaires. Cette voie de mort cellulaire non-inflammatoire peut être déclenchée par des signaux extracellulaires (apoptose extrinsèque) ou intracellulaire (apoptose intrinsèque) (Elmore 2007) (**Figure 21**). L'apoptose extrinsèque implique l'activation de récepteurs membranaires comme les TNFRs (*Tumor Necrosis Factor Receptors*). Après liaison avec un TNF (*Tumor Necrosis Factor*), le domaine intracellulaire du TNFR est reconnu par TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*), qui à son tour recrute des protéines à domaine FADD (*Fas Associated Death Domain*). La caspase 8 et 10 (*cysteinylnl aspartate-specific proteinase*) est recrutée par FADD au niveau du TNFR, conduisant à son activation (G. Chen et Goeddel 2002). L'apoptose intrinsèque est quant à elle dépendante des mitochondries. Son activation peut dépendre de l'absence de certains facteurs de croissance, d'hormones et de cytokines inhibitrices de l'apoptose. D'autres facteurs comme l'hypoxie, les radiations, des toxines et l'infection par des

virus peuvent aussi conduire à l'apoptose intrinsèque. Ces stimuli vont conduire à la création de pores dans la membrane mitochondriale, et la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome C ou encore Smac/DIABLO. La pro-caspase 9 et le cytochrome C vont former l'apoptosome, conduisant à l'activation de la caspase 9 (Elmore 2007). En parallèle, les endonucléases G et le facteur AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) sont libérés par les mitochondries suite à la formation de pores, et vont transloquer dans le noyau pour conduire à la condensation et la fragmentation de la chromatine, indépendamment de l'action des caspases (Sokolova 2009). Les caspases 9 et 8, dites pro-apoptotiques, ont un rôle indispensable dans le déroulement des processus apoptotiques. En effet, ces dernières vont activer les caspases 3, 6 et 7, dites effectrices et conduire aux modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose. Ces modifications incluent la condensation et la fragmentation de l'ADN ainsi qu'un rétrécissement cellulaire, la formation de « blebs » membranaires (protrusion, ou déformation de la membrane plasmique) et la translocation de la phosphatidylsérine dans le feuillet externe de la membrane cellulaire (Sokolova 2009; Elmore 2007).

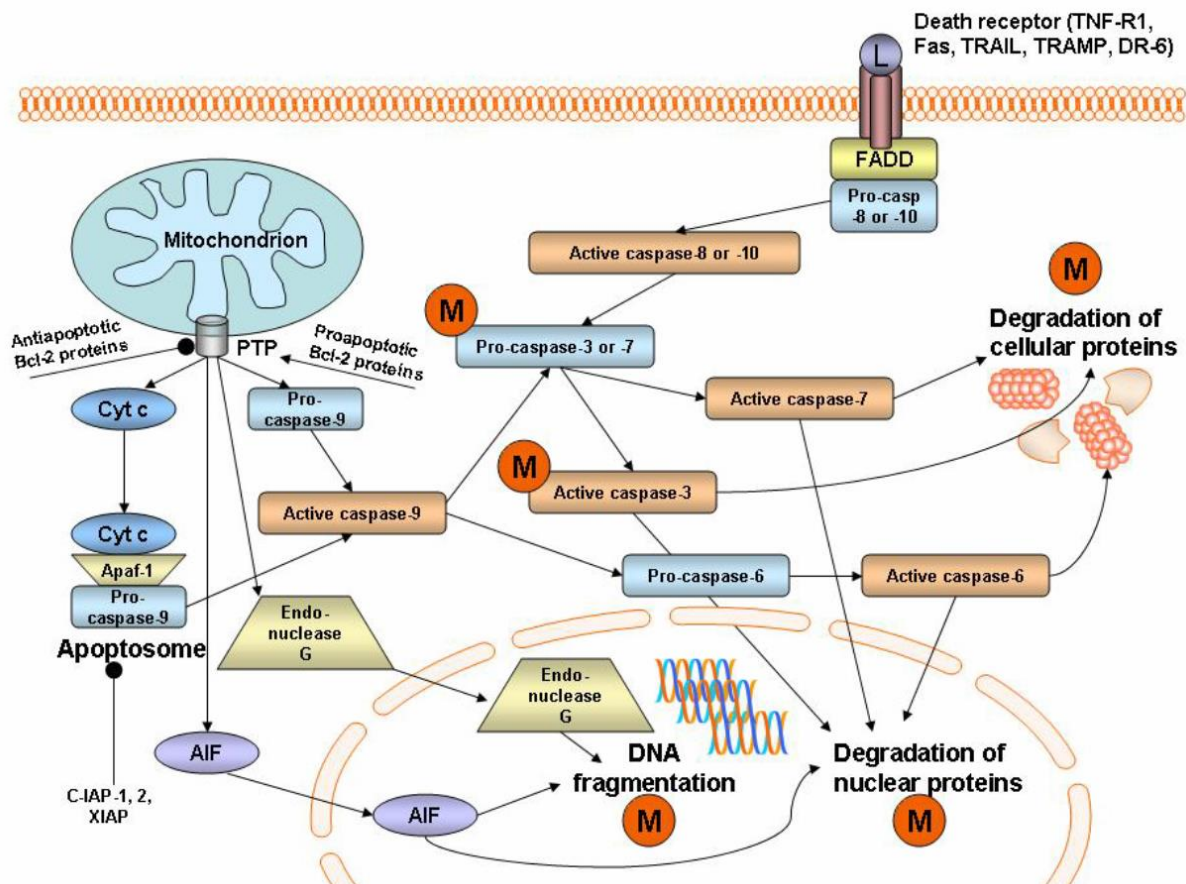


Figure 21 : Représentation des principales voies de signalisation et d'exécution de l'apoptose chez les mollusques. L'apoptose extrinsèque débute avec la liaison entre un TNF et un TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*), activant les caspases pro-apoptotiques 8 et 10 via une protéine à domaine

FADD. L'apoptose intrinsèque dépend de l'activation de la caspase 9 libérée par la mitochondrie suite à la formation de pores (*PTP* : *Permeability Transition Pore*), initié par la protéine pro-apoptotique Bcl-2, ou suite à la formation de l'apoptosome par le complexe Cytochrome c (Cyt c) – Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) – Pro-caspase-9. Les caspases 8, 9 et 10 vont activer les caspases 3, 6 et 7 dites effectrices. Ces caspases effectrices, avec le facteur AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) et l'endonucléase G, vont conduire à la fragmentation de l'ADN, la dégradation des protéines nucléaires et cellulaires, et *in fine* à la mort de la cellule. Adapté de (Sokolova 2009).

Chez *C. gigas*, de nombreux gènes impliqués dans les voies apoptotiques ont été mis en évidence par recherche de domaines, appartenant à la fois à la voie d'activation intrinsèque (BIR, Bcl-2, CARD; Smac DIABLO) comme extrinsèque (TNF, MATH, Death domain, DED) de l'apoptose (Linlin Zhang, Li, et Zhang 2011b). L'implication des caspases pro-apoptotiques et effectrices de l'apoptose chez *C. gigas* ont aussi pu être mises en évidence en réponse à différents stimuli biotiques ou abiotiques (Romero, Novoa, et Figueras 2015). L'acidification de l'eau conduit à l'augmentation de l'activité de la caspase 3 et 9 (X. Wang et al. 2021). La surexpression de la caspase 8 dans l'hémolymphe est observé après injection de poly I:C (C. Li et al. 2015). La surexpression des caspases 2, 3, 7, 8 et l'apoptose hémocytaire ont pu être mis en évidence après contact *in vitro* avec des toxines de micro-algues (Estrada et al. 2021). L'interaction *in vitro* d'hémocytes avec la bactérie marine *Planococcus citreus* entraîne des signes morphologiques de l'apoptose (condensation de la chromatine, rétrécissement cellulaire et formation de blebs membranaires) (Terahara et Takahashi 2008). Quarante-huit gènes codants pour des inhibiteurs de l'apoptose (IAPs) ont été mis en évidence chez *C. gigas* par des approches méta-génomiques, contrairement à huit chez l'homme (G. Zhang et al. 2012). Suite à une infection par le virus OsHV-1, d'autres auteurs montre une surexpression d'IAPs et une sous-expression de TNF et de la caspase 3 dans les hémocytes. Cette inhibition de l'apoptose favorise ainsi la réplication du virus dans les hémocytes (Martenot et al. 2017). Ensemble, ces observations confirment la conservation, et la régulation fine de l'apoptose intrinsèque et extrinsèque dans les mécanismes de défense de *C. gigas* face à des infections par des micro-organismes pathogènes ou aux conditions environnementales variables auxquelles elle fait face. La caractérisation d'autres voies de mort cellulaire programmée comme la pyroptose (Estrada et al. 2021), la necroptose (Zhou et al. 2024), la ferroptose (Z. Guo et al. 2023) et l'ETose (Vandepas et al. 2024), ainsi que leur implication dans l'immunité de *C. gigas* émergent. Cependant, plus de travaux sont nécessaires afin de confirmer leur existence et leur rôle dans la défense de l'hôte face aux différentes conditions environnementales, comme face aux micro-organismes pathogènes, que *C. gigas* rencontre pendant son développement.

L'encapsulation et la mélanisation

La phagocytose permet l'élimination de particules étrangères relativement petites, mais lorsque la taille de ces particules ne permet pas la phagocytose par les hémocytes, d'autres mécanismes doivent entrer en jeu afin d'isoler et d'éliminer le corps étranger. Parmi ces mécanismes, l'encapsulation et la mélanisation permettent l'élimination de parasites pluricellulaires comme des nématodes, des trématodes ou des cestodes (Soudant, E. Chu, et Volety 2013; Nguyen et Alfaro 2020).

L'encapsulation est un mécanisme bien décrit chez les insectes (**Figure 22**). Il débute après la reconnaissance de PAMPs parasitaires ou de DAMPs par les PRRs, initiant l'activation de la voie Toll, Imd ou JAK/STAT. Ces voies favorisent l'adhérence des hémocytes (plasmatocytes et cellules granuleuses chez les diptères et les lépidoptères respectivement) et la formation d'un agrégat multicellulaire autour du parasite grâce à des intégrines qui favorisent l'adhérence des cellules entre elles et ainsi la formation d'une couche multicellulaire. Les plasmatocytes jouent un rôle clé dans l'adhésion initiale aux parasites, tandis que les cellules granuleuses participent à la formation de la capsule via le relargage du contenu de leurs granules (dégranulation) dans la couche cellulaire constituant la capsule. Le contenu des granules est riche en protéines d'adhésion comme l'hémolécitine (impliquée dans la coagulation) et des lectines de type C, mais aussi en ions calcium et en prophénoloxidasés. Le calcium joue un rôle important dans la coagulation de l'hémolécitine et dans l'activation de la cascade phénol/proPO via l'amplification de la dégranulation hémocytaire. Cette cascade va contribuer à la formation d'eumélanine et de phéomélanine (mélanisation). Pendant ce processus, des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont produites, participant à la destruction du parasite. Une fois la capsule formée, une membrane basale est formée pour l'isoler du reste de l'hémolymphe (Dubovskiy et al. 2016).

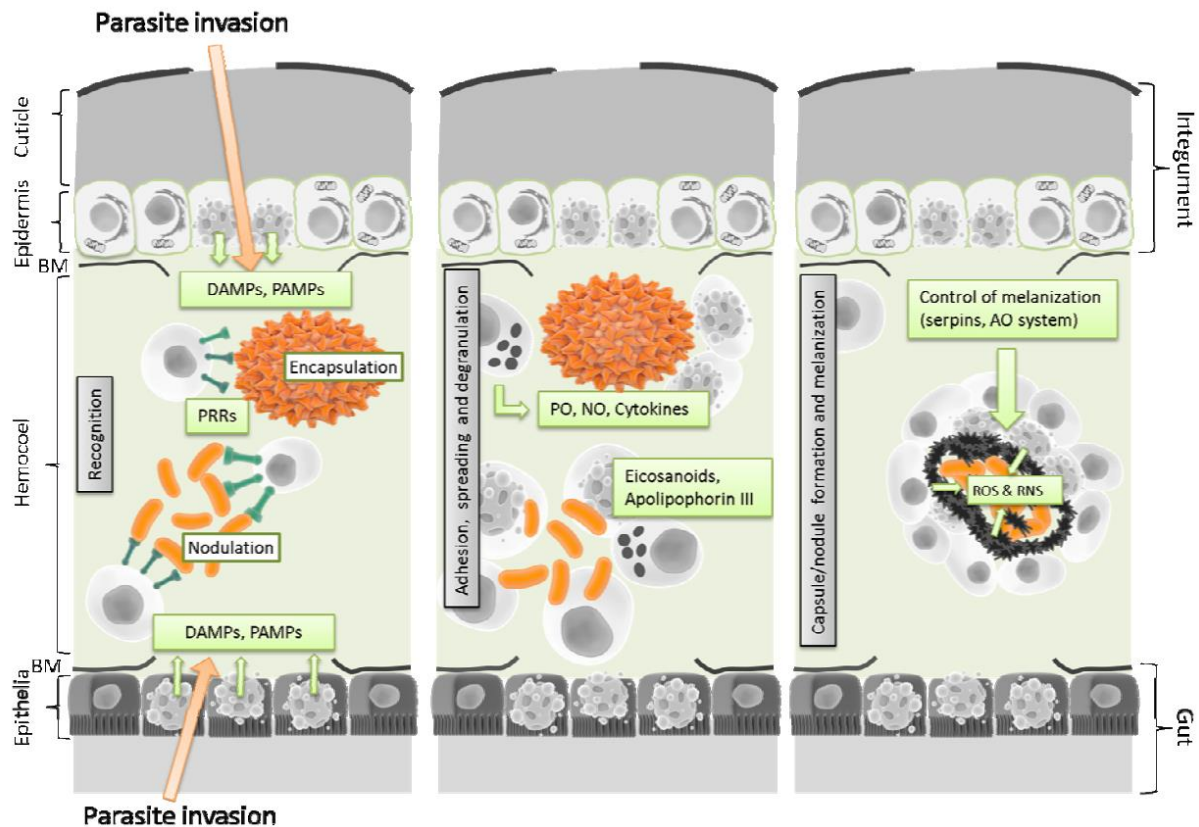


Figure 22 : Processus d'encapsulation et de mélanisation chez les insectes. Suite à l'entrée du parasite dans l'hémolymphe, les hémocytes reconnaissent les PAMPs associés aux parasites et les DAMPs associés à la destruction de l'épithélium des vaisseaux conducteurs d'hémolymphe. Chez les insectes l'invasion par des bactéries peut induire la nodulation, un processus conduisant à l'isolement et la mélanisation des bactéries. La reconnaissance des parasites va conduire à l'agrégation des hémocytes, et à la libération de proPO, d'oxyde nitrique, et de cytokines. Une fois le parasite encapsulé, la mélanisation est déclenchée (production de phéomélanine et d'eumélanine), via la cascade des proPO, produisant des ROS (*Reactive Oxygen Species*) et des RNS (*Reactive Nitrogen Species*), conduisant à l'élimination de l'agent pathogène. La mélanisation est contrôlée par des serpinines (inhibant les PAPs : *proPO Activating Proteinases*) et par des molécules antioxydantes (AO). Adapté de (Dubovskiy et al. 2016).

Chez les bivalves, ce mécanisme a pu être décrit chez la palourde *Tapes Decussatus* suite à une infection par *Perkinsus marinus* (Jf, M, et J 1996). D'après ces auteurs, le processus d'encapsulation implique le recrutement de granulocytes sur le site de l'infection, où ils sécrètent un peptide (polypeptide 225) impliqué dans la formation de la capsule. Suite à l'encapsulation du parasite, les granulocytes sécrètent du lysozyme et des espèces réactives de l'oxygène au cœur de la capsule qui auront pour rôle l'élimination du parasite encapsulé, bloquant sa dissémination dans l'hôte.

Chez l'huître *Saccostrea glomerata*, les granulocytes sont aussi capables d'encapsuler des levures. Les granulocytes libèrent le contenu de leurs granules et s'ensuit un processus de

mélanisation au sein de la capsule, comme dans l'espace extracellulaire à proximité de la capsule (Aladaileh et al. 2007).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'encapsulation et la mélanisation chez les bivalves restent peu décrits. Chez *C. gigas*, aucune preuve de l'existence de ces mécanismes cellulaires n'a pu être reportée. Lors d'une infection par *Mycicola Ostreae*, des auteurs ont pu mettre en évidence une agglomération massive d'hémocytes au parasite, qu'ils ont pu associer à la formation d'une capsule au niveau des branchies. Les auteurs supposent que cette agglomération bloque la dissémination du parasite chez *C. gigas* (Batista et al. 2009). Seuls des faisceaux d'arguments convergent vers une possible existence de ces mécanismes de défense pour les hémocytes de *C. gigas*. Ainsi, une recherche plus approfondie est nécessaire afin de mieux définir les récepteurs, les voies de signalisation et les effecteurs associés à la formation de la capsule. Caractériser plus en détail ces mécanismes pourrait conduire à une meilleure compréhension des processus cellulaires impliqués dans l'élimination de parasites pluricellulaires infectant les différentes espèces d'huîtres en ostréiculture.

d) L'immunité humorale

L'immunité humorale constitue l'une des deux principales composantes du système immunitaire, aux côtés de l'immunité cellulaire. Chez les vertébrés supérieurs, dotés d'un système immunitaire adaptatif, elle repose principalement, mais pas uniquement, sur la production et la libération d'anticorps par les lymphocytes B, capables de neutraliser et d'éliminer les agents pathogènes extracellulaires (Charles A Janeway et al. 2001). Ce mécanisme adaptatif est propre aux vertébrés supérieurs et joue un rôle crucial dans la reconnaissance spécifique des antigènes. Les anticorps se lient aux antigènes, favorisant leur élimination via des processus tels que la phagocytose ou l'activation de la voie classique du complément (Murphy et Weaver 2017).

Cependant, chez les invertébrés, l'immunité repose exclusivement sur des mécanismes immunitaires innés, en raison de l'absence d'une immunité adaptative. Les bivalves, comme les moules et les huîtres, dépendent de molécules solubles présentes dans l'hémolymphe, notamment des lectines, des peptides antimicrobiens et des enzymes, afin de neutraliser les agents pathogènes (Allam et Raftos 2015). Ces éléments de l'immunité humorale sont impliqués dans la reconnaissance de motifs moléculaires communs aux micro-organismes pathogènes, un processus moins spécifique que celui observé chez les vertébrés, mais néanmoins efficace pour la survie dans des environnements riches en micro-organismes (Allam

et Raftos 2015). Ces effecteurs (peptides antimicrobiens, lysozymes, et espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, voie alterne et des lectines du complément) sont essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire de *C. gigas* et permettent d'inhiber la croissance (effet bactériostatique) et d'éliminer (effet bactéricide) des micro-organismes pathogènes bactériens et de limiter la propagation d'infection virales et parasitaires (Wang et al. 2018b).

Peptides et protéines antimicrobiennes

Découverts en 1939, les peptides antimicrobiens (AMPs) sont une famille de petits peptides (faisant en général moins de 10 kDa) produits par tous les organismes vivants avec des actions diverses ciblant les virus, les bactéries, les parasites et les champignons (Dubos 1939). Les AMPs sont classés en quatre grandes familles en fonction de leur structure secondaire : feuillet β , hélice α , structure étendue et boucle. La plupart des AMPs sont cationiques, ce qui leur permet de se lier facilement aux parois cellulaires anioniques des bactéries et des champignons, mais aussi des virus enveloppés pouvant contenir à leur membrane des protéines anioniques comme des phospholipides et des glycoprotéines, ou encore de certains parasites possédant du glycosaminoglycane à leur surface (Bahar et Ren 2013). Ces peptides vont ensuite agir de façons différentes notamment par la lyse de la membrane plasmique, l'inhibition de la synthèse protéique, de la synthèse des ARNs, de la synthèse de l'ADN ou ils vont interagir avec des protéines intracellulaires conduisant à l'inhibition de protéases, la perturbation de voies métaboliques ou encore l'activation de l'autolysine contribuant à la lyse et à l'inhibition de la croissance des micro-organismes (Bahar et Ren 2013). D'autres protéines cationiques plus larges ont été décrites possédant des propriétés similaires aux AMPs.

Chez *C. gigas*, quatre familles d'AMPs ont été décrites (molluscidines, défensines, big-défensines et les peptides riches en proline). D'autres protéines cationiques plus larges ont été décrites possédant des propriétés similaires aux AMPs. Chez *C. gigas*, deux familles de protéines antimicrobiennes larges ont été décrites : *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI) et *macrophages expressed gene 1-like* (Mpeg).

Les molluscidines sont des peptides de 5,5 kDa composés de 55 acides aminés isolés pour la première fois chez *C. gigas*. Ces peptides contiennent 10 régions Lysine-Lysine et Lysine-Arginine répétées ainsi qu'une région hydrophobe composée de 15 alanines. La Cg-Molluscidine a été purifiée à partir d'extraits de branchies et ne possède aucune homologie avec d'autres AMPs caractérisés. Cet AMP est bactéricide sur les bactéries à Gram positives et

négatives et montre une distribution systémique dans les organes de *C. gigas* (Seo et al. 2013; Evelyne Bachère et al. 2015).

Les défensines sont des peptides isolés pour la première fois chez la moule, et particulièrement caractérisés chez *C. gigas*. Ces peptides, de 4 à 5 kDa, possèdent 8 résidus de cystéine engagés dans quatre motifs *cysteine-stabilized α -helix/ β -sheet* (des hélices et des feuilletts β antiparallèles, reliés par des ponts disulfures) (Evelyne Bachère et al. 2015). On retrouve ces peptides dans le manteau (*Cg-Defm*) et dans les hémocytes (*Cg-Defh1* et *Cg-Defh2*), ils possèdent une activité d'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et sont donc plus efficaces sur les bactéries à Gram positives (Gueguen et al. 2006; M. Gonzalez et al. 2007). Ils sont cependant capables de lyser la membrane de *V. tasmaniensis* LGP32 (bacille à Gram négatif) à forte concentration (Marylise Dupertuy et al. 2011).

Les *big-defensines* sont des polypeptides de 8 à 11 kDa purifiés pour la première fois dans les amoebocytes du limule *Tachypleus tridentatus*. Chez le limule, les *big-defensines* possèdent un domaine N-terminal hydrophobe et un domaine C-terminal contenant des structures en feuilletts β repliées par des ponts disulfures. Chez *C. gigas*, des homologues à ces *big-defensines* (*Cg-BigDef1 – 7*) ont été mis en évidence, et sont uniquement exprimés dans les hémocytes (Gerdol et al. 2020). Chez *C. gigas*, le domaine N-terminal des *big-defensines* est capable de s'assembler, via des liaisons covalentes, pour former des nanonets, structures capables d'emprisonner les bactéries sans induire leur perméabilisation (Loth et al. 2019). Malgré tout, *Cg-BigDef1* et 2 sont surexprimés lors d'une infection par *V. tasmaniensis* et *V. splendidus* (Rosa et al. 2011) et *Cg-BigDef1* et 5 sont respectivement bactéricides et bactériostatiques à des concentrations de 2,5 à 10 μ M sur les bactéries qui composent le microbiote de *C. gigas* (Loth et al. 2019; De San Nicolas et al. 2022).

Les peptides riches en proline (Prp) sont des AMPs identifiés aussi bien chez les invertébrés que les vertébrés. La caractéristique commune à ces Prp est la présence de nombreux résidus proline et arginine formant des motifs Pro-Arg leur conférant une activité antimicrobienne (Evelyne Bachère et al. 2015). Ces peptides forment des pores et détruisent la membrane plasmique, pénètrent dans les bactéries et interfèrent avec le repliement des protéines néo-synthétisées et la synthèse du LPS, conduisant à la mort des bactéries (W. Li et al. 2014). Chez *C. gigas*, 13 copies de *Cg-Prp* ont été identifiées dans le génome, d'une longueur de 16 ou 18 acides aminés, ne différant que d'un motif Pro-Arg (Schmitt et al. 2010). La forme longue de

Cg-Prp, exprimée uniquement dans les hémocytes, n'est que peu bactériostatique contre les bactéries à Gram négatives, positives ou des champignons. Cependant, cet AMP est capable de fonctionner en synergie avec *Cg-Defm* contre les bactéries à Gram négatives et positives (Gueguen et al. 2009).

Les *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI) sont des protéines retrouvées chez les vertébrés et invertébrés. Ces protéines possèdent un domaine N-terminal, bloquant la stimulation du système immunitaire par liaison avec le LPS, et conférant l'activité bactéricide de cette protéine. Le domaine C-terminal est quant à lui impliqué dans l'opsonisation des bactéries à Gram négatives (activation des mécanismes de phagocytose par les hémocytes via la fixation de récepteurs membranaires) (Bülow et al. 2018). Chez *C. gigas*, un homologue du BPI humain a été caractérisé (*Cg-BPI*). Cette protéine de 50,4 kDa est exprimée de manière constitutive dans les organes de *C. gigas* et possède les mêmes propriétés fonctionnelles que la BPI humaine (liaison avec le LPS, activité bactéricide et opsonisation des bactéries à Gram négatives) (Marcelo Gonzalez et al. 2007).

Les *macrophages expressed gene 1-like* (*Mpeg*) sont des protéines appartenant à la superfamille du complexe d'attaque membranaire/perforine, conservé chez tous les vertébrés. On retrouve ces protéines dans l'espace extracellulaire mais aussi dans les phago-lysosomes. Ces protéines forment des pores dans la membrane plasmique des bactéries et sont exprimées en réponse à des signaux pro-inflammatoires comme la présence de LPS et de TNF α (Bayly-Jones et al. 2020). Chez *C. gigas*, *Cg-Mpeg1* est exprimée dans tous les organes mais plus particulièrement dans les branchies, gonades et les glandes digestives. Cette protéine de 81,8 kDa possède un domaine transmembranaire en C-terminal et un domaine de complexe d'attaque membranaire / perforine en N-terminal. *Cg-Mpeg1* diminue le taux de croissance de bactéries à Gram positives (*S. aureus*, *B. subtilis* et *B. thuringiensis*) et à Gram négatives (*E. coli* et *V. alginolyticus*). L'injection de *V. alginolyticus* dans le muscle adducteur de *C. gigas* conduit à une surexpression de *Cg-Mpeg1* six heures après injection. Malgré l'effet de *Cg-Mpeg1* sur le taux de croissance de la bactérie, l'activité de *Cg-Mpeg1* sur la membrane plasmique des bactéries n'a pas été testé (He, Zhang, et Yu 2011). Toutefois, la présence de cette protéine dans le génome de *C. gigas*, pourrait fonctionnellement remplacer les protéines formant le complexe d'attaque membranaire associé au système du complément (C6, C7, C8 et C9), dont les représentants ne sont pas caractérisés chez *C. gigas*, malgré des différences majeures dans les voies d'activation et dans les mécanismes de formation des pores de ces deux complexes d'attaque membranaires.

Les Lysozymes

Les lysozymes sont des glycosidases, des enzymes hydrolytiques cationiques retrouvées chez tous les animaux et dans de nombreux tissus. Ils peuvent être sécrétés ou associés à des lysosomes et sont impliqués dans la défense antibactérienne. Ils sont retrouvés associés aux cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages), dans les larmes, la salive, le lait maternel, et dans les tractus digestifs et respiratoires (Callewaert et Michiels 2010). Les lysozymes clivent la liaison entre l'acide N-acétylmuramique et les résidus N-acétylglucosamine du peptidoglycane (**Figure 23**). Ce clivage conduit à la perte de l'intégrité du peptidoglycane et la lyse de la bactérie dans un milieu hypo-osmotique. Leurs rôles sont définis par leur pH optimum (proche de sept pour les lysozymes antibactériens et plus acides pour les lysozymes impliqués dans la digestion). Trois groupes majeurs de lysozymes sont décrits dans la littérature : les lysozymes de type c (*conventional type*), g (*goose type*) et i (*invertebrates type*) (Callewaert et Michiels 2010). Chez *C. gigas*, seuls trois lysozymes ont été décrits (CGL-1, -2 et -3). CGL-1 a été isolé des organes digestifs et a une taille de 137 acides aminés. Il est exprimé dans le manteau, les branchies, les gonades, les organes digestifs et les hémocytes (Matsumoto, Nakamura, et Takahashi 2006). CGL-2 et CGL-3 ont tous les deux été isolés du manteau et font tous les deux 142 acides aminés de long (Itoh et Takahashi 2007; Itoh et al. 2010). Suite à une infection par des bactéries du genre *Vibrio* virulents (*V. tasmaniensis* LPG32 et *V. aestuarianus* 02/041), une augmentation du nombre de transcrits codant pour un lysozyme a été observée chez les hémocytes de *C. gigas* ayant survécus à l'infection (Lorgeril et al. 2011). De plus, lors d'une stimulation conjointe avec du LPS et du TNF, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité du lysozyme dans l'hémolymphe de *C. gigas*, indiquant qu'une stimulation de PRR impliqués dans l'immunité favorise la production de lysozymes (Y. Sun et al. 2014). Ensemble ces résultats confirment l'existence des i-lysozymes chez *C. gigas* et leur implication dans la défense de l'hôte face aux agents pathogènes.

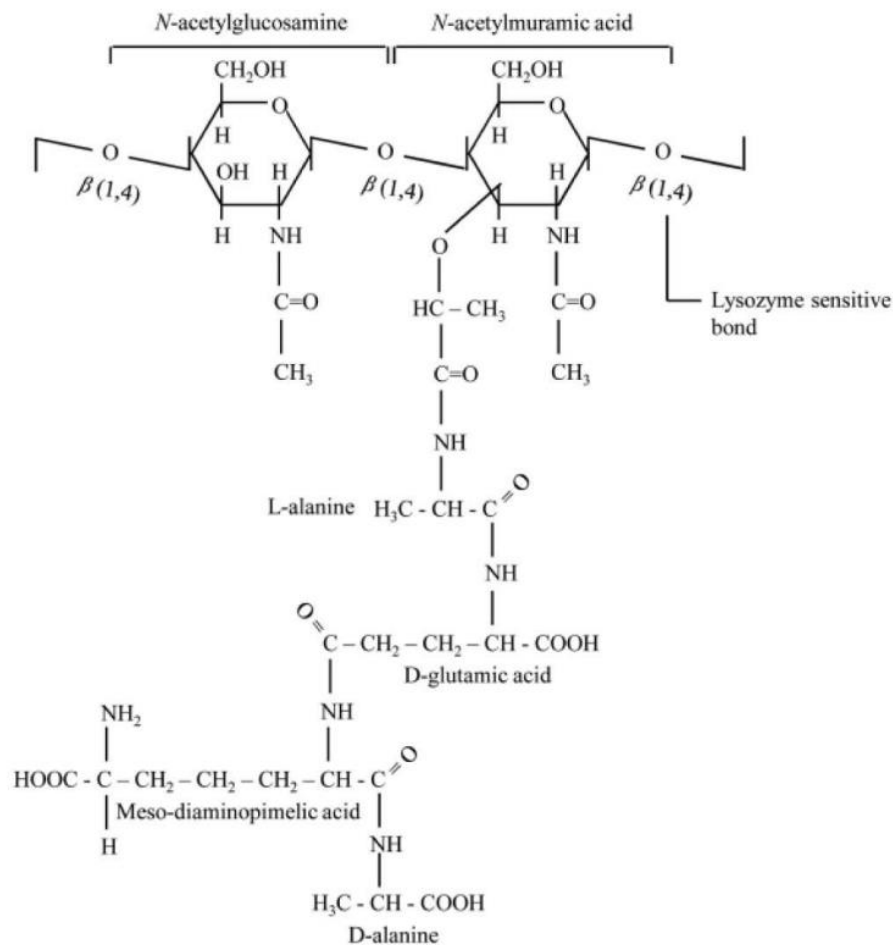


Figure 23 : Structure du peptidoglycane et site de liaison des lysozymes. Le peptidoglycane est retrouvé chez les bactéries à Gram négatives et positives. Il est composé d'une répétition de motifs N-acetylglucosamines et N-acetylmuramiques reliés par des liaisons $\beta(1,4)$ -glycosidiques. Les lysozymes hydrolysent ces liaisons, conduisant à la perte de l'intégrité du peptidoglycane et à la lyse de la bactérie. Adapté de (Callewaert et Michiels 2010).

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont des molécules formées lors du fonctionnement normal des cellules. Ces deux espèces sont des radicaux libres, très réactifs et avec une demi-vie très courte. Les ROS sont produites par la chaîne respiratoire mitochondriale (lors de la production d'ATP), par les peroxysomes, par les lysosomes, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique ou lors du fonctionnement de certaines protéines cytosoliques. L'oxyde nitrique (NO^* , un RNS) est produit quant à lui lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline par la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) (Di Meo et al. 2016). Les ROS et les RNS peuvent être produits au niveau intracellulaire et extracellulaire. D'un point de vue physiologique ces radicaux libres (ROS et RNS) jouent des rôles importants dans la signalisation cellulaire normale, mais des concentrations élevées conduisent à des dommages cellulaires par oxydation et nitration des protéines, des lipides et

de l'ADN. Ces propriétés en font d'excellents effecteurs antimicrobiens dans la défense de l'hôte face aux micro-organismes pathogènes (Andrés et al. 2022). Par exemple, lors de la phagocytose, les neutrophiles assemblent sur la membrane du phagosome la NADPH oxydase (NOX) qui génère une libération massive d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans le compartiment phagosomal. Cette réaction massive est appelée le « burst » oxydatif. De façon concomitante, des myélo-peroxydases sont acheminées à la vacuole phagocytaire via les lysosomes et vont permettre la formation d'acide hypochloreux (HOCl), un composé particulièrement microbicide, via l'oxydation du chlore avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé suite à la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ par la superoxyde dismutase (SOD) (Hurst 2012). L' H_2O_2 peut réagir directement avec $O_2^{\cdot-}$ pour former l'ion hydroxyle (OH^-). Le fer ferreux (Fe^{2+}) et le cuivre cuivreux (Cu^{2+}) peuvent aussi participer à la destruction de l' H_2O_2 pour former l' OH^- ou le radical hydroxyle ($\cdot OH$) pendant la réaction de Fenton (Birben et al. 2012). L'oxyde nitrique peut être produit dans la vacuole phagocytaire par les NOS et peut être converti de manière spontanée à l'aide de catalyseurs en différentes formes de RNS (NO_2^{\cdot} , $ONOO^-$ et N_2O_3) (Flannagan, Cosío, et Grinstein 2009). Ces ROS et ces RNS ont des rôles importants dans l'élimination des micro-organismes phagocytés (**Figure 24**).

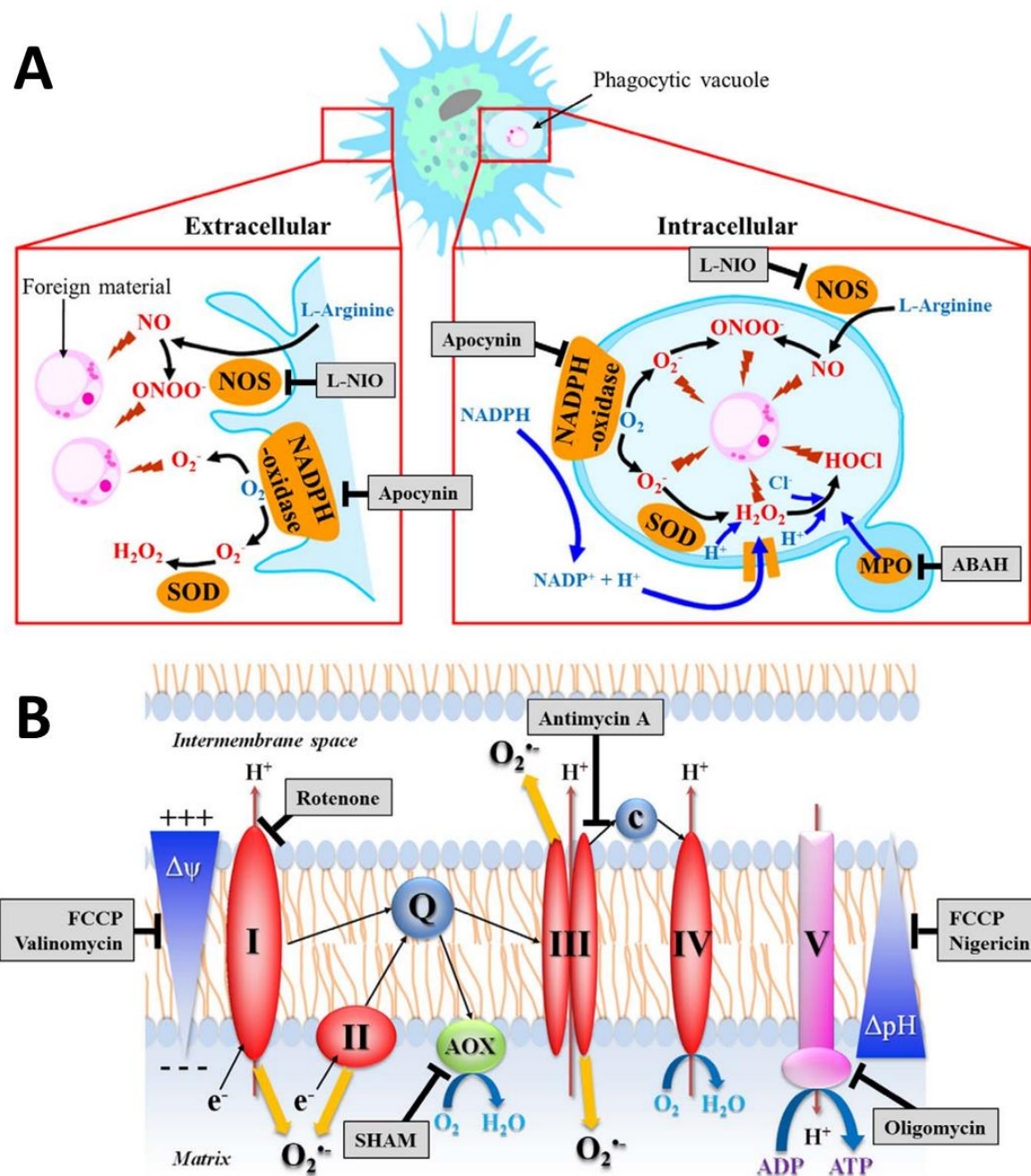


Figure 24 : Voies de signalisation impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène chez *C. gigas*. (A) Voie de production de ROS indépendante des mitochondries. La production de ROS peut être intracellulaire dans un phagosome ou extracellulaire et dépend de diverses enzymes : NOS (*Nitric Oxide Synthase*), NADPH-oxydase, SOD, MPO (Myélo-peroxydase) afin de produire différents radicaux oxygénés (NO, ONOO⁻, O₂⁻, H₂O₂ et HOCl). (B) Voie de production de ROS dépendante des mitochondries. Les 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale permettent la production d'ATP mais en se faisant, libèrent des ROS (de l'O₂⁻). Les cadres gris représentent les inhibiteurs des enzymes et complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. Adapté de (Donaghy et al. 2012).

Chez *C. gigas*, les hémocytes non stimulés produisent des ROS par leur activité respiratoire mitochondriale basale. C'est lors d'une stimulation par un micro-organisme pathogène qu'un

burst oxydatif impliquant la NADPH oxydase, la myélo-péroxydase ou la NOS se met en place (Donaghy et al. 2012). Dans le cas d'une stimulation par le Zymosan, les granulocytes produisent une quantité importante de ROS/RNS qui n'est pas retrouvée chez les hyalinocytes (Lambert et al. 2007). Aurore Poirier et ses collaborateurs mettent notamment en évidence la cinétique de production de ROS par les hémocytes stimulés au Zymosan et montrent une production massive de ROS atteignant un pic après les 20 premières minutes de cinétique, suivi d'une diminution progressive le reste de la cinétique (Poirier et al. 2014). Ce burst oxydatif biphasique, rappelle les mécanismes décrits chez les granulocytes, monocytes et macrophages chez l'homme (Birben et al. 2012). Ces résultats suggèrent que les granulocytes, les principaux hémocytes capable de phagocyter, réalisent un burst oxydatif lors d'une stimulation par le zymosan. Les auteurs montrent aussi que des mécanismes de mort cellulaire programmée avec libération de pièges extracellulaires d'ADN (ETose) sont dépendant de la production de ces ROS (Poirier et al. 2014). Ensemble, ces résultats montrent que les ROS sont des effecteurs humoraux majeurs de l'immunité innée chez *C. gigas*.

f) Plasticité du système immunitaire de *Crassostrea gigas* lors de son développement

Lors du développement chez l'homme du nourrisson à un âge avancé, le système immunitaire va connaître de nombreuses étapes de maturation. Chez les nouveaux nés le système immunitaire est encore immature et dépend majoritairement des neutrophiles, monocytes et macrophages immatures. Les cellules dendritiques ne produisent que très peu d'interférons α et β , rendant les nouveaux nés particulièrement susceptibles aux infections virales à ce stade de développement. Pendant la croissance, l'exposition à des micro-organismes commensaux ou composant le microbiote intestinal contribue à la maturation des cellules immunitaires de l'enfant. Par exemple, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, au départ peu différenciés, acquièrent progressivement une spécialisation en réponse aux microbes environnementaux et agents pathogènes, façonnant le répertoire immunitaire adaptatif et diminuant la sensibilité à des infections virales, bactériennes, parasitaires et fongiques. A mesure que le système immunitaire mûrit de l'enfance à l'âge adulte, l'efficacité des réponses immunitaires s'améliore, notamment avec l'accumulation de cellules à mémoire et la spécialisation des lymphocytes T et B. À un âge plus avancé, une sénescence immunitaire est observée caractérisée par une réponse plus faible aux infections et une augmentation de l'inflammation (Simon, Hollander, et McMichael 2015). Malgré l'absence de système immunitaire adaptatif, le développement du système immunitaire inné chez les bivalves est essentiel pour leur permettre de répondre aux micro-organismes avec

lesquels ils interagissent. Aujourd'hui, les processus régulant la différenciation et la maturation des hémocytes au cours de la vie des bivalves sont très peu connus. Ces processus ont tout de même été montrés comme dépendant de l'âge, et du dialogue entre l'hôte et les communautés microbiennes (provenant de l'environnement et du microbiote) avec lesquelles les bivalves interagissent (Destoumieux-Garzón et al. 2024). Cependant, plus de recherches, notamment via l'utilisation de techniques de séquençage de nouvelle génération, sont nécessaires à une compréhension de l'évolution du système immunitaire du stade larvaire au stade adulte (Bassim et al. 2015).

L'huître *C. gigas* est sujette à de nombreuses infections en ostréiculture et les micro-organismes pathogènes impliqués affectent les huîtres à des stades de développement différents. La maturation du système immunitaire est un élément clé dans les mécanismes de résistance de l'huître à différentes pathologies. En effet, la réponse antivirale immature de *C. gigas* au stade juvénile induit une susceptibilité accrue au virus OsHV-1 μ Var, ne lui permettant pas de faire face à cette infection (Green, Vergnes, et al. 2016). Ainsi, étudier l'ontogénie de l'immunité à différents stades de développement de l'huître est d'une importance majeure afin de comprendre les pathologies affectant *C. gigas* au cours de son développement.

La première mise en évidence de l'expression de gènes liés à l'immunité dans les stades de développement précoce de *C. gigas* a été reportée en 2007. C'est entre les stades gastrula et trochophores que l'expression de quatre gènes marqueurs des hémocytes à l'âge adulte ont été quantifiés. Ces gènes codent pour *Cg-TIMP* (un inhibiteur de métalloprotéinases), *Cg-Tal* (facteur de transcription hématopoïétique), la superoxyde dismutase extracellulaire *Cg-EcSOD* et *Drac 3* (impliqué dans la prolifération cellulaire) (Tirape et al. 2007). Par des approches de séquençage d'ARN messenger sur cellule unique réalisées chez *C. gigas* au stade trochophore, des auteurs ont pu mettre en évidence quatre clusters hémocytaires (ensemble de cellules possédant des profils transcriptomiques similaires) exprimant des gènes liés à l'immunité : la thymosine- β (impliquée dans la prolifération, migration et différenciation cellulaire), la flotillin-2 (impliquée dans la croissance cellulaire) et *Tal1* (un facteur de transcription), dont la localisation a pu être associée au tractus digestif par hybridation *in situ* (Piovani et al. 2023). Ces résultats suggèrent que l'apparition des cellules spécialisées dans l'immunité, les hémocytes, survient entre les stades de développement gastrula et trochophore chez *C. gigas*. Dans les stades plus tardif de développement de *C. gigas* (larve D, larve véligère et larve pédivéliger) une surexpression de nombreux gènes impliqués dans l'immunité sont reportés (*GATA3*, C-type lectine, intégrines, Caspase-3, défensines hémocytaires, *TLR4*, *IL-17*, *HSP70*, *Catalase*, *EcSOD*, *REL* et *IKK*), suggérant l'induction de fonctions impliquées dans la réponse

au stress, la reconnaissance et la phagocytose, la production d'effecteurs immunitaires, dans l'hématopoïèse hémocytaire et dans l'induction de mort cellulaire programmée (Song et al. 2016).

Le développement du système immunitaire de *C. gigas* dépend aussi des micro-organismes avec lesquels elle interagit ou qui compose son microbiote. En particulier, le microbiote façonne de nombreux aspects physiologiques chez l'huître comme la croissance, la nutrition, la formation de la coquille, ou la taille de l'huître mais aussi la résistance aux micro-organismes pathogènes (Dantan et al. 2024). L'exposition d'huîtres au stade larvaire à un environnement riche en micro-organismes issus d'animaux adultes sains, conduit à un changement dans la composition du microbiote chez des huîtres larvaires, et un changement dans l'expression de gènes de voies de signalisation liés à l'immunité (Toll/NF- κ B, JAK/STAT et IFN) et aux protéines et peptides antimicrobiens (Big-défensines, BPI et défensines hémocytaires). Ces changements sont conservés pendant le développement de l'huître du stade larvaire au stade juvénile et aussi chez les descendants des huîtres exposées, conduisant à une meilleure résistance des huîtres (parents comme descendants) à une infection par le virus OsHV-1 (Fallet et al. 2022). En parallèle le système immunitaire façonne à son tour le microbiote associé à l'huître. En particulier, les peptides antimicrobiens, comme la *big défensine* a été montrés comme ayant ce potentiel. L'injection de Cg-BigDef1 dans les tissus de l'huître conduit à un décalage dans la composition du microbiote 6 h et 24 h après injection (De San Nicolas et al. 2022). Ainsi le dialogue constant entre le système immunitaire et les bactéries qui composent le microbiote de *C. gigas* contribue à l'établissement d'un équilibre favorable à la survie de l'huître tout au long de sa vie, via l'éducation du système immunitaire et le façonnement des communautés microbiennes composant le microbiote (Destoumieux-Garzón et al. 2024).

Ensemble, ces travaux suggèrent l'apparition de l'immunité à des stades très précoces du développement de *C. gigas* et que l'exposition à des micro-organismes à des stades de développements larvaires est essentielle au développement optimal de son système immunitaire et de celui de ses descendants. Cependant, plus de travaux sont nécessaires pour comprendre l'évolution du système immunitaire du stade larvaire au stade adulte. En effet, si l'apparition de l'immunité au stade trochophore est bien caractérisée, l'évolution des défenses immunitaires jusqu'au stade juvénile, et du stade juvénile au stade adulte ne sont pas connues. Une connaissance de l'ontogénie immunitaire globale de *C. gigas* est indispensable afin de comprendre les éléments conduisant à une susceptibilité différentielle de l'huître aux agents

pathogènes qui l'affecte au cours de son développement, et ce afin de limiter les mortalités en ostréiculture.

g) Renouvellement cellulaire lors de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est définie comme le processus de production des cellules sanguines. Ce processus est indispensable au renouvellement des cellules immunitaires chez les vertébrés et invertébrés, et participe activement à la survie et à l'adaptation des animaux face aux stress biotiques et abiotiques rencontrés dans l'environnement.

Chez *Drosophila melanogaster*, l'hématopoïèse est très bien connue et décrite. Elle suit deux lignages distincts ayant lieu lors de deux stades de développement (**Figure 25**). Le premier lignage commence au stade embryonnaire où l'hématopoïèse se déroule dans la tête du mésoderme. Les pro-hémocytes se différencient en un nombre fixe de 700 plasmatoctes, et de 30 *crystal cells*. Les plasmatoctes sont quiescents jusqu'à la fin de l'embryogénèse et colonisent ensuite au stade larvaire des poches hématopoïétiques dans lesquelles ils vont se multiplier et pouvoir se différencier en *crystal cells*. Le deuxième lignage se déroule dans le ganglion lymphatique, dont la formation est issue du développement du mésoderme pendant l'embryogénèse. Au stade embryonnaire, les pro-hémocytes se multiplient lentement jusqu'au stade larvaire, stade pendant lequel ils se différencient en *crystal cells*, en cellules progénitrices intermédiaires et en plasmatoctes, capables de se multiplier. Dans le cas d'une infection parasitaire, les plasmatoctes issus des poches hématopoïétiques, et les pro-hémocytes issus des ganglions lymphatiques peuvent se différencier en lamellocytes pour faire face à l'infection. Ces deux lignages sont mobilisés pendant le stade chrysalide, et persistent au stade adulte, où seul les plasmatoctes et une faible proportion de *crystal cells* sont présents. Les hémocytes sont en déclin au stade adulte et ne se multiplient plus (Crozatier et Meister 2007; Gold et Brückner 2015). La différenciation des hémocytes dépend de l'expression de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription hématopoïétiques sont des protéines qui se lient à des régions spécifiques de l'ADN pour réguler l'expression de gènes impliqués dans le destin des cellules indifférenciées ou en cours de différenciation. Ces facteurs régulent non seulement l'activation des programmes transcriptionnels spécifiques à chaque lignage cellulaire, mais aussi la répression des programmes associés à d'autres lignages. Ils peuvent également induire des modifications épigénétiques, comme la modification des histones ou la méthylation de l'ADN, stabilisant ainsi l'engagement des cellules dans un lignage donné et leur conférant des fonctions spécialisées (Duddu et al. 2020). La différenciation des pro-hémocytes en plasmatoctes dépend de l'expression de *Serpent* (*Srp*), un facteur de transcription possédant

un motif GATA (Guanine-Adenine-Thymine-Adenine) et de Gcm (*Glial cells missing*). La différenciation des pro-hémocytes en crystal cells dépend des facteurs de transcription Lozange (Iz, faisant partie de la famille Runx), Srp et Ush (U-shaped). Enfin, la différenciation des pro-hémocytes en lamellocytes dépend de l'activation des voies de signalisation Toll et JAK/STAT et de Collier (Col), un facteur de transcription orthologue à EBF (*Early B-cell Factor*) (Crozatier et Meister 2007).

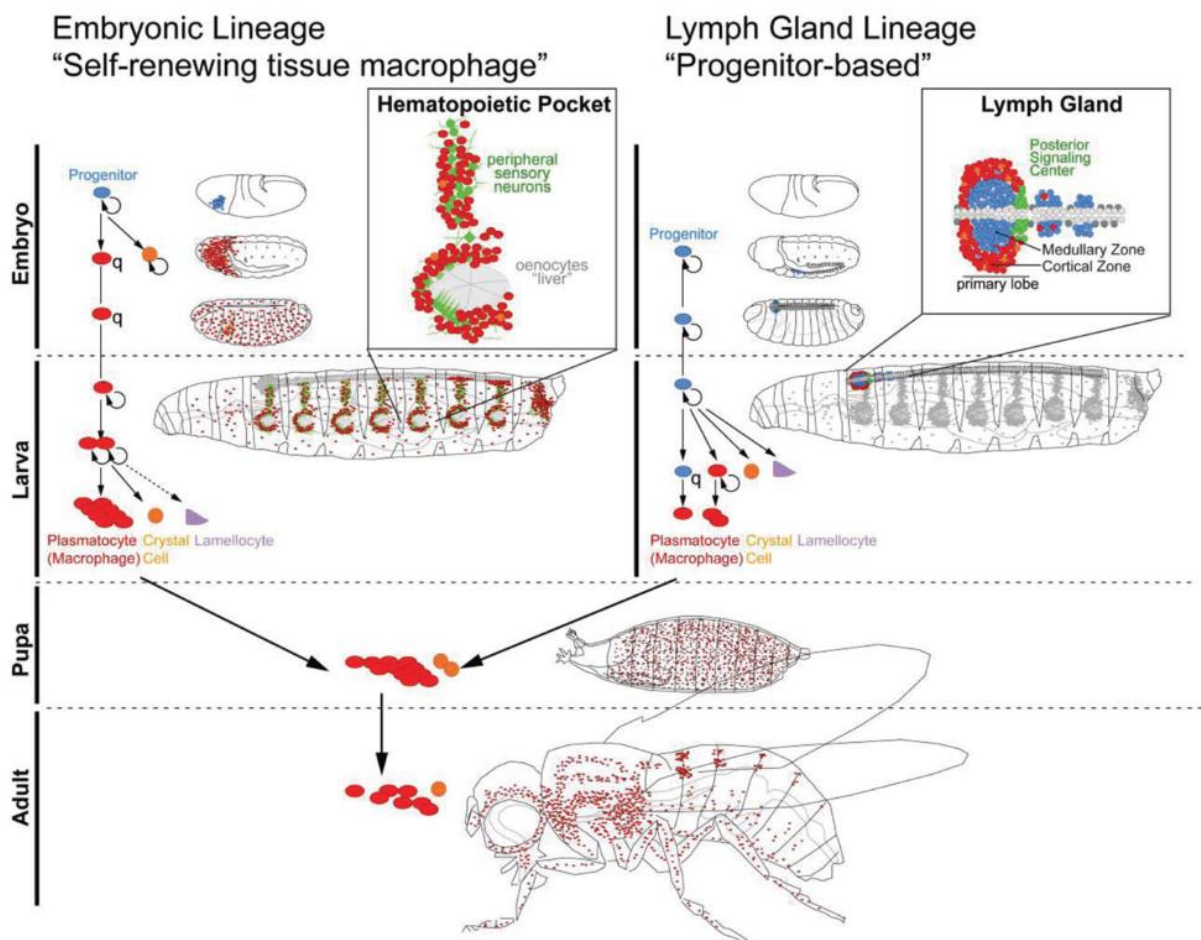


Figure 25 : Hématopoïèse chez *Drosophila melanogaster*. Les hémocytes sont issus de deux sites hématopoïétiques et suivent des étapes de différenciation aux stades embryonnaires et larvaires. Sont représentés les pro-hémocytes (bleu) se différenciant en plasmatocytes (rouge), en *crystal cells* (orange) et en lamellocytes (violet) aux stades embryonnaire (lorsqu'issus de la tête du mésoderme) et larvaires (lorsqu'issus des ganglions lymphatiques).

Chez l'huître, la mobilisation des hémocytes suite à une infection conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire pouvant affecter la viabilité des hémocytes, notamment via l'activation de différentes fonctions immunitaires comme la production de ROS/RNS, la phagocytose et l'encapsulation. De plus, lors des processus infectieux de certains micro-organismes pathogènes, la cytotoxicité des hémocytes va être observée. C'est notamment le cas lors d'infection avec certaines bactéries pathogènes d'huîtres comme *V. tasmaniensis* LGP32,

V. crassostreae J2.9 et *V. harveyi* (Rubio et al. 2019a; Oyanedel et al. 2023). Ainsi, un renouvellement via la production de nouveaux hémocytes circulants est nécessaire au maintien des défenses immunitaires. Aujourd'hui l'hématopoïèse est peu décrite chez les mollusques, et une caractérisation de l'ontogénie hémocytaire chez l'huître est nécessaire (Pila et al. 2016).

Une façon d'explorer l'hématopoïèse chez l'huître est d'étudier la dynamique d'expression de facteurs de transcription hématopoïétiques. Le premier facteur de transcription mis en évidence chez *C. gigas* fut *Cg-Tal* en 2003. *Cg-Tal3*, homologue à *Tal1* chez l'homme, est exprimé dans les hémocytes et ne semble pas être affecté par l'infection de l'huître à un mélange de quatre espèces bactériennes du genre *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. metschnikovii*, *V. tubiashii* et *V. S322*) (Barreau-Roumiguière, Montagnani, et Escoubas 2003). Ce gène est exprimé aux stades de développement de gastrula-trochophore chez *C. gigas*. Par hybridation *in situ*, ce facteur de transcription est exprimé dans les hémocytes présents au niveau de l'épithélium des canaux hémolymphatique (Tirape et al. 2007).

Par des coupes histologiques, d'autres auteurs mettent en évidence la présence de structures irrégulières dans les branchies de *C. gigas*. Des cellules ayant un rapport nucléo-cytoplasmique très élevé composent ces structures et sont connectées à la lumière des vaisseaux hémolymphatiques. Par marquage de ces coupes histologique au BrdU, et à l'aide d'un anticorps spécifique de l'histone H3 ou de Sox2 (un facteur de transcription spécifique des cellules précurseurs), les auteurs mettent en évidence que ces cellules répliquent l'ADN, prolifèrent, et possèdent le marquage Sox2. Ces résultats montrent l'existence de cellules précurseurs capables de prolifération dans les branchies de *C. gigas*. Par co-marquage de ces coupes histologiques avec Sox2 et un anticorps spécifique de la superoxyde dismutase (utilisé ici comme marqueur des hémocytes) ou un anticorps spécifique de la filamine (marqueur des lamellocytes chez *D. melanogaster*) les auteurs mettent en évidence des cellules co-marquées et des cellules soit marquées par l'un ou l'autre des marquages. Les auteurs suggèrent donc que les branchies sont des organes ayant une importance dans l'hématopoïèse des hémocytes de *C. gigas* via la différenciation d'hémocytes exprimant Sox2 en hémocytes exprimant la filamine (Jemaà et al. 2014).

Suite à une stimulation par la bactérie *V. splendidus*, des auteurs montrent une augmentation de l'expression de la *Cg-EcSOD* et de la *Cg-GATA3* dans les branchies de *C. gigas*, signe de la prolifération et de la différenciation d'hémocytes dans ces tissus en réponse à l'infection (Yiqun Li et al. 2017). Ces mêmes auteurs mettent en évidence l'expression de *Cg-Runx* (facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse chez la drosophile) au stade larvaire et dans les hémocytes au stade adulte suite à une infection par *V. splendidus* (Song et al. 2019).

Ensemble, ces résultats montrent que les branchies sont un site hématopoïétique potentiel chez *C. gigas*, et que certains facteurs de transcription régulant la différenciation hémocytaire sont très conservés des vertébrés aux invertébrés. Cependant, les mécanismes régissant la prolifération, différenciation, et maturation des hémocytes sont pour le moment inconnus chez les mollusques (Pila et al. 2016). L'utilisation de nouvelles approches génomiques, telles que le séquençage d'ARNm sur cellule unique, revêt aujourd'hui une importance majeure pour répondre à ces interrogations. Ces techniques permettraient de déterminer les voies de différenciation et les gènes associés à ces voies chez les hémocytes de *C. gigas*. Ces approches ont pu notamment remettre en question les anciens modèles qui décrivaient l'hématopoïèse comme une série d'étapes discrètes et linéaires. En effet, l'hématopoïèse des cellules souches hématopoïétiques (HSC) est un processus continu. Les HSC se différencient en une multitude de voies, influencées par des réseaux de régulateurs complexes, où les décisions de différenciation se font de manière subtile et progressive plutôt que par des transitions nettes (Liggett et Sankaran 2020).

C) Perturbation de l'homéostasie immunitaire et impact sur la santé des huîtres

1. L'anthropocène et ses conséquences sur l'ostréiculture

Les activités anthropiques ont un impact indéniable sur l'environnement marin. En 2007, aucune zone maritime mondiale n'était épargnée par les activités humaines. Les activités industrielles et agricoles autant terrestres que maritimes déversent des polluants métalliques, des hydrocarbures, des pesticides et des microplastiques dans les environnements côtiers et hors côtes, impactant ainsi de nombreux organismes (Halpern et al. 2008) (**Figure 27**).

a) Les métaux lourds et l'effet particulier du Cuivre

Les métaux sont les polluants les plus problématiques en ostréiculture en raison du fait qu'ils ne sont pas biodégradables (Zamora-Ledezma et al. 2021). Chez les huîtres, organismes filtreurs, l'accumulation de polluants métalliques (zinc, cuivre, cadmium, chrome, nickel, plomb, arsenic et mercure) peut constituer un risque pour la consommation humaine, notamment dans les régions où les parcs ostréicoles sont exposés à de fortes concentrations de métaux provenant de la métallurgie (Jonathan et al. 2017; Ayling 1974). En plus du risque encouru par les consommateurs, ces métaux ont un impact sur la physiologie de l'huître. En effet, ces métaux sont retrouvés accumulés dans de nombreux organes et dans les cellules qui les composent, telles que les cellules épithéliales des branchies, les hémocytes, les cellules

digestives, les néphrocytes, les cellules péricardiques, les entérocytes et les cellules du manteau (Marigómez et al. 2002). En présence notamment d'une forte concentration en cadmium et en mercure, l'immunocompétence des hémocytes est perturbée entraînant l'augmentation de la production de ROS, des dommages sur l'ADN, l'augmentation du taux de cellules apoptotiques et la réduction du taux de phagocytose. Ces altérations des défenses immunitaires impactent la survie de l'huître face aux micro-organismes pathogènes ostréicoles (B Gagnaire, Thomas-Guyon, et Renault 2004; Cao, Liu, et al. 2018a; Haberkorn et al. 2014; Cong et al. 2012).

Le cuivre est un métal dont des traces sont retrouvées dans les sédiments de nombreuses zones ostréicoles, en particulier dans le sud de la France où la viticulture utilise de grandes quantités de cuivre (Bouillie Bordelaise : solution de sulfate de cuivre et d'oxyde de calcium). Le lessivage des sols, suite à des épisodes pluvieux, entraîne leur accumulation vers les zones de conchyliculture (Flemming et Trevors 1989). La toxicité du cuivre pour l'huître *C. gigas* a déjà été décrite en 1976 (Okazaki 1976). Une exposition répétée au cuivre entraîne des modifications physiologiques comme l'hypertrophie et l'érosion des cils des branchies ainsi que l'altération de l'activité de certaines enzymes (glutathione transférase, acétylcholinestérase, malondialdéhyde) caractéristiques d'un stress oxydatif (Cao et al. 2019). À des concentrations physiologiques, le cuivre, chez *C. virginica*, se retrouve localisé sur les sites de lésions tissulaires et dans les granules intracytoplasmiques d'hémocytes circulants (Fisher 2004). Le cuivre augmente aussi le nombre d'hémocytes circulants, l'adhérence, le taux de phagocytose et la concentration en lysozyme dans les hémocytes (Ivanina, Hawkins, et Sokolova 2016). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le cuivre conduit à l'activation d'une réponse inflammatoire, potentiellement délétère (via un stress oxydatif), sur les hémocytes des huîtres. Le cuivre favorise aussi les échanges de mitochondries entre hémocytes et donc la répartition du potentiel énergétique pour faire face à l'accumulation du cuivre (Luo et Wang 2023). Ce mécanisme dépend de nanotubes, découverts chez les vertébrés en 2004 (Rustom et al. 2004). Ces structures permettent l'échange d'organelles entre cellules. Récemment, Luo et collaborateurs ont mis en évidence l'existence de ces nanotubes et l'échange de mitochondries entre hémocytes chez *C. hongkongensis* (Luo et al. 2024). Plus particulièrement ces échanges vont des hémocytes pas ou peu granuleux, vers les granulocytes, considérés comme les cellules les plus immunocompétentes. Par des analyses protéomiques et immuno-histochimiques, les auteurs ont mis en évidence qu'après exposition au cuivre, l'expression de ATP7A, un transporteur du cuivre impliqué dans sa relocalisation vers les compartiments cellulaires, était augmentée et colocalisait avec les lysosomes et les mitochondries. La colocalisation du cuivre et des lysosomes dans les nanotubes, ainsi que l'augmentation de l'expression de gènes

impliqués dans le transport lysosomal et la dépense énergétique laisse suggérer que la gestion du cuivre dans les hémocytes de *C. hongkongensis* dépend des nanotubes, permettant une meilleure répartition des stress que subissent les hémocytes exposés à des concentrations élevées en cuivre (Luo et al. 2024).

Malgré une meilleure compréhension de l'impact du cuivre sur les défenses immunitaires de l'huître et sur sa gestion par les hémocytes, aucun travail n'a pour l'instant cherché à élucider l'impact et le rôle de ce métal dans le cadre d'une infection par des agents pathogènes. La colocalisation du cuivre et des lysosomes ainsi que l'altération de l'immunocompétence des hémocytes (phagocytose, adhérence, nombre d'hémocytes circulants) en présence de cuivre suggère un effet important de ce métal lors d'une infection.

b) Les perturbateurs organiques (pesticides, hydrocarbures, microplastiques, etc.)

L'exposition des huîtres à des polluants de types pesticides et hydrocarbures est également inquiétante, tout en restant des problématiques locales associées respectivement aux pratiques agricoles et à des fuites accidentelles de pétrole issues de pétrolier (Auffret et al. 2004; Donaghy et al. 2010).

Une étude parue en 1998 montre une accumulation de 60 pesticides issus de l'agriculture dans des huîtres cultivées dans la Baie de Chesapeake aux états unis (Lehotay, Harman-Fetcho, et McConnell 1998). Certains de ces pesticides (Glyphosate, AMPA, Atrazine, Alachlor, Carbaryl, Diuron, Metolachlor, Terbutylazine) ont été retrouvés dans le bassin de Marennes-Oléron et causent une augmentation de l'activité de la glutamine synthétase (enzyme impliquée dans le métabolisme des composés azotés), de la catalase et de la glutathione S-transferase dans les glandes digestives de *C. gigas*. Les résultats montrent également que le pourcentage de phagocytose des hémocytes est diminué suite à l'exposition à ces pesticides (Geret et al. 2013). Cependant, une autre étude indique que ces mêmes pesticides ne modifient aucun paramètre hémocytaire (viabilité, activités des estérases non spécifiques, calcium intracellulaire, nombre et activité des lysosomes et phagocytose) (Moreau, Burgeot, et Renault 2014). Ces résultats montrent donc que les pesticides sont accumulés et métabolisés par *C. gigas* mais des travaux sont encore nécessaires afin de confirmer leurs effets sur les hémocytes et sur l'immunocompétence de *C. gigas*.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont accumulés dans les tissus riches en lipides comme les branchies, le manteau, l'hépatopancréas, le muscle adducteur et les gonades (Gan, Martin, et Xu 2021) et induisent notamment l'atrophie des tubules digestifs près 24 h

d'exposition (dos Reis et al. 2020). La réduction du nombre d'hémocytes circulants, de la capacité de phagocytose, et de la motilité des hémocytes de *C. gigas*, suggèrent que les hydrocarbures impactent la physiologie et l'immunocompétence des huîtres exposées (Jeong et Cho 2005).

Bien que les métaux demeurent les polluants majeurs en ostréiculture, l'exposition aux pesticides et hydrocarbures présente également des risques pour les huîtres. La prise en compte de l'ensemble de ces contaminants, ainsi que de leurs effets cumulatifs, est essentielle pour garantir la durabilité des pratiques ostréicoles et la santé des écosystèmes marins associés.

2. Effet de stress abiotiques environnementaux sur l'immunité de *Crassostrea gigas*

L'ensemble des activités anthropiques est responsable de nombreux rejets de gaz à effet de serre (CO₂, CH₄, N₂O, O₃ et des gaz fluorés comme HFC, PFC, SF₆ et CFC), contribuant au réchauffement global et océanique. Une conséquence de ces changements climatiques, particulièrement préoccupante pour les zones ostréicoles, est l'acidification et le réchauffement de l'eau, à laquelle sont ajoutées des précipitations importantes, contribuant à la fluctuation de la salinité de l'eau (Lejeusne et al. 2010; Neokye et al. 2024). Seuls, ces paramètres physico-chimiques affectent les huîtres mais aggravent aussi les perturbations physiologiques et immunologiques subies face à des polluants (Zanette et al. 2011; Cao, Liu, et al. 2018a) (**Figure 27**).

a) Impact de l'acidification des océans sur la réponse immunitaire de *Crassostrea gigas*

L'acidification des océans est une conséquence directe de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ (ppm : parties par million). Rien qu'entre le début et la fin du XX^{ème} siècle, cette concentration atmosphérique a augmenté de 280 ppm à 370 ppm, conduisant à la diminution du pH global des océans de 0,02 unité de pH par décennie depuis le début des années 80 (**Figure 26**) (Doney et al. 2009; Turley et al. 2006).

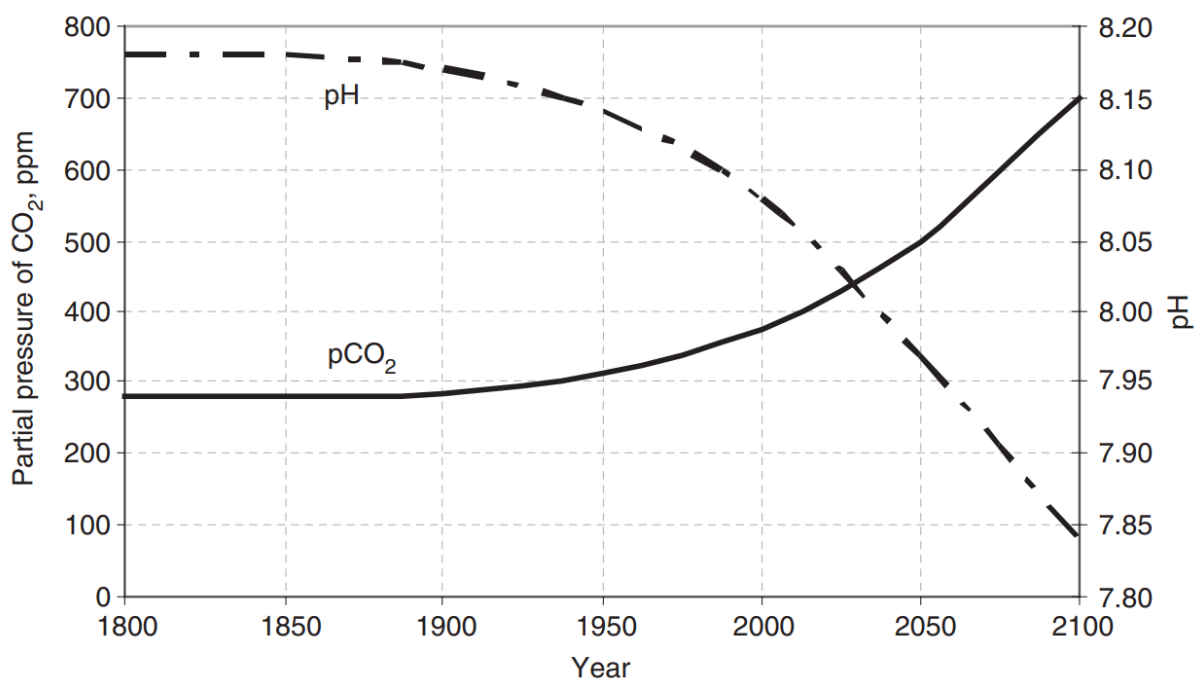


Figure 26 : Changements passés et projetés de la concentration atmosphérique en CO₂ et du pH océanique. Le graphique montre une augmentation de la pCO₂ à partir du début des années 1900 passant de 280 ppm à 370 ppm dans les années 2000, associée à une diminution du pH océanique passant de 8,17 à 8,08 unités de pH. Ces travaux projettent une augmentation de la concentration en CO₂ atteignant 500 ppm en 2050, et 700 ppm en 2100 associée à une diminution à ces mêmes dates du pH océanique respectivement à 7,97 et 7,84 unités de pH. Adapté de (Turley et al. 2006).

Une acidification des environnements maritimes impacte grandement les écosystèmes océaniques et constitue une menace particulièrement importante pour les organismes marins calcifiants. En effet, l'acidification de l'eau réduit la concentration en ions carbonates dans l'eau et donc la concentration en carbonate de calcium essentielle à la formation de la coquille chez ces invertébrés (Orr et al. 2005). Des analyses protéomiques réalisées sur les branchies de *C. gigas* rapportent un changement dans le métabolisme énergétique des glucides et des lipides pour faire face à l'augmentation du pH de l'eau, associé à une augmentation des protéines associées au stress oxydatif. De plus, même si la formation de la coquille n'est pas affectée, sa dureté et sa résistance aux fractures est plus faible (Timmins-Schiffman et al. 2014). Ces résultats suggèrent que l'acidification des océans affecte la gestion des ressources énergétiques et la structure de la coquille.

En plus de l'impact sur la calcification de la coquille, une exposition prolongée à des concentrations en CO₂ élevée (7 à 28 jours, de 1000 à 2000 ppm) induit sur les hémocytes de l'huître une augmentation de l'apoptose, de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une augmentation de l'expression de gènes liés à l'immunité (Def, BPI, Prp, SOD,

Hsp70, Hsp90) ainsi qu'une diminution du niveau d'expression de GPx (Glutathion Peroxydase) impliqués dans la réponse aux stress oxydatifs (Q. Wang et al. 2016). Ces modifications d'expression ne modifient pas le taux de phagocytose de billes de carboxylate par les hémocytes lorsqu'ils proviennent d'huîtres saines. Cependant lorsque les huîtres sont infectées par *V. splendidus*, une baisse significative de la phagocytose de ces microsphères est observé à des concentration en CO₂ de 2000 ppm comparé à 400 ppm (Cao, Wang, et al. 2018). Ces résultats soulignent l'impact physiologique, et immunologique qu'induit l'acidification des océans sur *C. gigas*. Ces impacts sont des facteurs aggravants des perturbations causés par les micro-organismes pathogènes et pourrait conduire à des épisodes plus massifs de mortalité en ostréiculture.

b) Effets des variations de salinité sur la physiologie de l'huître

La salinité des milieux estuariens varie beaucoup au cours d'une année, en raison des épisodes pluviaux ou de sécheresse, du cycle des marées et du drainage des sites terrestres adjacents. Les bivalves sont sensibles aux variations de salinité et de nombreuses mortalités sont observées lors de variations importantes de salinité en milieu conchylicole (Des et al. 2021; Domínguez et al. 2020). En effet, les huîtres cultivées possèdent une capacité d'adaptation réduite à l'hyper-salinité (45 g/L de NaCl) par rapport aux huîtres sauvages. L'exposition d'huîtres cultivées à de fortes salinités induit un niveau relatif de HSP72 et une charge énergétique adénylique plus faible dans le manteau comparée aux huîtres sauvages (C.-Y. Yang et al. 2016) suggérant une réponse au stress plus faible et donc une capacité moins importante des huîtres cultivées à faire face à des augmentations de salinité.

Le pourcentage de phagocytose de billes de carboxylate par les hémocytes augmente lorsqu'ils proviennent d'huîtres dans un milieu hypo-salin (15 g/L) ou hyper-salin (45 g/L) sans que leur viabilité ne soit affectée (Beatrice Gagnaire et al. 2006). Au niveau des branchies, une hypo-salinité à 8 g/L de NaCl induit la surexpression de gènes impliqués dans la phagocytose (lectines de type C, protéines à domaine C1q, IAP) et la sous-expression de gènes codant pour des caspases pro-apoptotiques (Zhao et al. 2012). Ces résultats suggèrent une meilleure capacité de *C. gigas* à se défendre face aux agents pathogènes pouvant être phagocytés lorsque l'huître est dans des conditions d'hypo- et d'hyper-salinité. La sous expression des caspases et la surexpression d'IAP suggèrent l'inhibition de l'apoptose à des salinités faibles, une fonction essentielle à la réponse antivirale, et donc suggère une sensibilité accrue lors d'infections virales (Zhao et al. 2012). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les huîtres de l'étude de cette étude ne sont pas acclimatées à l'hypo-salinité, et que cette absence d'acclimatation à des

salinités faibles, conduit à une surmortalité lors d'une infection par le virus OsHV-1 (Marine Fuhrmann et al. 2016). L'étude de Fuhrmann montre cependant que l'acclimatation des huîtres à des salinités faibles réduit de 15 fois les mortalités causées par le virus OsHV-1 (Marine Fuhrmann et al. 2016). Ensemble, ces résultats montrent que la salinité a des effets notables sur la physiologie de *C. gigas* et plus spécifiquement sur l'immunocompétence des hémocytes. L'hypo-salinité de l'eau de mer peut résulter d'une dilution lors de pluies importantes, donc dans des conditions où les animaux n'ont pas le temps de s'acclimater. Ces conditions pourraient donc être défavorables à la survie de l'huître dans le cas d'infection par le virus OsHV-1 par exemple.

c) Influence de la température sur les interactions huître - micro-organismes pathogènes

Les bivalves d'intérêt conchylicoles sont sujets à des variations importantes de température entre les mois les plus chauds et les plus froids de l'année. Ces animaux sont également soumis aux cycles des marées qui entraînent une exposition à de fortes températures lorsque les animaux se retrouvent exondés. Ces variations de la température conduisent à des modifications de l'activité des hémocytes chez ces bivalves. L'exposition à des températures élevées (jusqu'à 25°C) augmente de manière significative le nombre total d'hémocytes circulants, l'activité de phagocytose tout comme l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase chez *C. gigas*, chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et chez la coque *Katelysia rhytiphora*, suggérant une immunocompétence accrue chez les bivalves à 25°C (Rahman et al. 2019). Ces variations de température impactent aussi la virulence des micro-organismes pathogènes auxquelles sont sujettes les huîtres et notamment *C. gigas*. En effet, le virus OsHV-1 possède une fenêtre de permissivité comprise entre 16 et 24°C, dans laquelle il est pathogène chez *C. gigas*. C'est à des températures de 25°C que l'on observe une diminution de la mortalité due aux infections par OsHV-1 chez *C. gigas*, associée à l'induction de processus physiologiques défavorables à l'infection virale, notamment via la surexpression de 12 gènes impliqués dans l'activation de l'apoptose, favorisant l'inhibition de la réplication du virus (Delisle et al. 2020). L'augmentation de la température peut cependant aggraver les épisodes infectieux dus à des bactéries pathogènes. En effet, le taux de survie de *C. gigas* suite à une infection par *V. alginolyticus* est plus faible à une température de 33°C versus 23°C (X. Li et al. 2023). Lors d'une infection par *V. alginolyticus*, les huîtres à 33°C sur-rexpriment des gènes liés à l'apoptose et au stress oxydatif 12 h et 48 h après infection, que l'on ne retrouve pas chez des animaux à 23°C. En revanche, les huîtres à 23°C sur-

rexprirent, 12 h post-infection des gènes impliqués dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire (NF- κ B, IL-17, IL-4, IL-6 et TNF), que les huîtres à 33°C ne sur-rexprirent qu'après 48 h d'infection. De plus, ces mêmes auteurs montrent un changement dans la composition du microbiote de la glande digestive, s'enrichissant en bactéries du genre *Vibrio*, associé à des épisodes de mortalité massifs en ostréiculture (X. Li et al. 2023). Ensemble, ces résultats montrent qu'une température élevée favorise les mortalités associées à *V. alginolyticus*, un agent pathogène bactérien. Toutefois, l'influence de la température est complexe, car elle affecte non seulement les défenses immunitaires de l'hôte, mais également la composition du microbiote et la permissivité des micro-organismes pathogènes. Certaines températures peuvent ainsi favoriser ou défavoriser, un ou plusieurs de ces paramètres et conduire à des mortalités en ostréiculture.

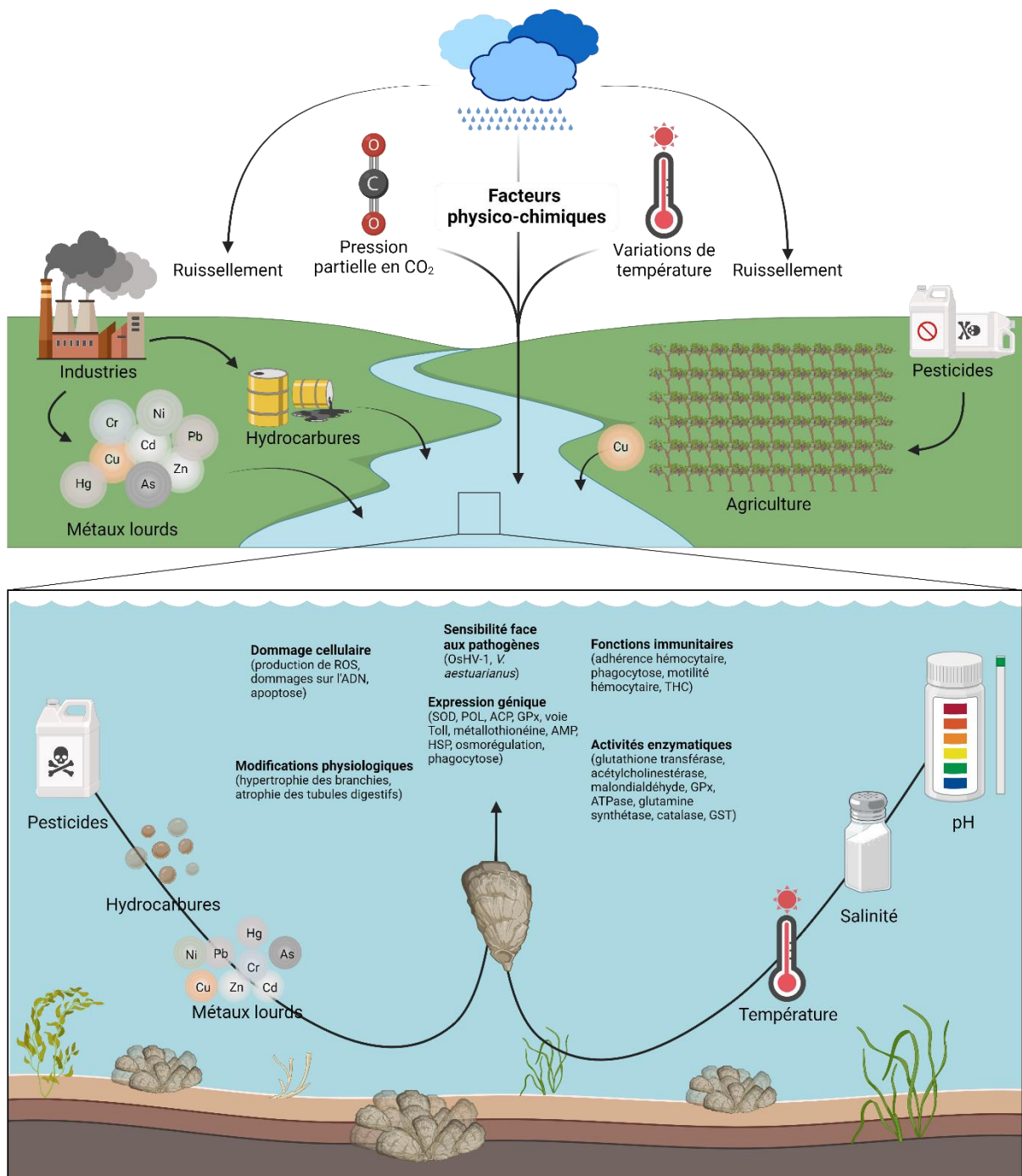


Figure 27 : Effet des perturbateurs abiotiques sur la physiologie et le système immunitaire de *C. gigas*. Les pesticides issus de l'agriculture, les hydrocarbures et métaux lourds issus de l'industrie sont déversés dans l'eau par ruissellement. Ces polluants, avec les variations physico-chimiques du milieu (température, concentration en CO₂ dans l'air, et salinité dus aux ruissellements) affectent la physiologie et le système immunitaire de *C. gigas*, conduisant à une sensibilité accrue aux agents pathogènes ostréicoles.

3. Impact des agents pathogènes sur l'immunité de l'huître

Dans un contexte de changements globaux dû notamment au réchauffement climatique, les dynamiques d'interactions entre hôtes et micro-organismes pathogènes évoluent. En effet, les

changements climatiques sont aujourd'hui considérés comme ayant aggravé de près de 58 % les maladies touchant l'homme (Mora et al. 2022). Ces changements ne se limitent pas à l'homme mais s'étendent aussi aux animaux et aux espèces utilisées en aquaculture, avec l'émergence de maladies et l'augmentation des cas d'infections chez les bivalves comme les huîtres, dus notamment à l'augmentation de la température globale des océans (King et al. 2019). Chez les huîtres cultivées en France, on retrouve tous types de vecteurs responsables de pathologies ; des protistes infectant *O. edulis* (*Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*), des virus infectant *C. angulata* (Iridovirus) et *C. gigas* (OsHV-1 et OsHV-1 μ Var), et des bactéries du genre *Vibrio* infectant *C. gigas* chez les huîtres juvéniles (*V. tasmaniensis*, *V. crassostreae*, *V. harveyi* et *V. rotiferianus* due à une primo-infection par le virus OsHV-1), et chez les huîtres adultes (*V. aestuarianus*) (Figure 33). Tous ces agents pathogènes possèdent différentes stratégies pour infecter les huîtres. L'étude de ces micro-organismes pathogènes, de leurs interactions avec les huîtres et de leurs actions sur le système immunitaire est indispensable afin de pouvoir comprendre et prévenir, à terme, les épisodes de mortalité (Figure 28).

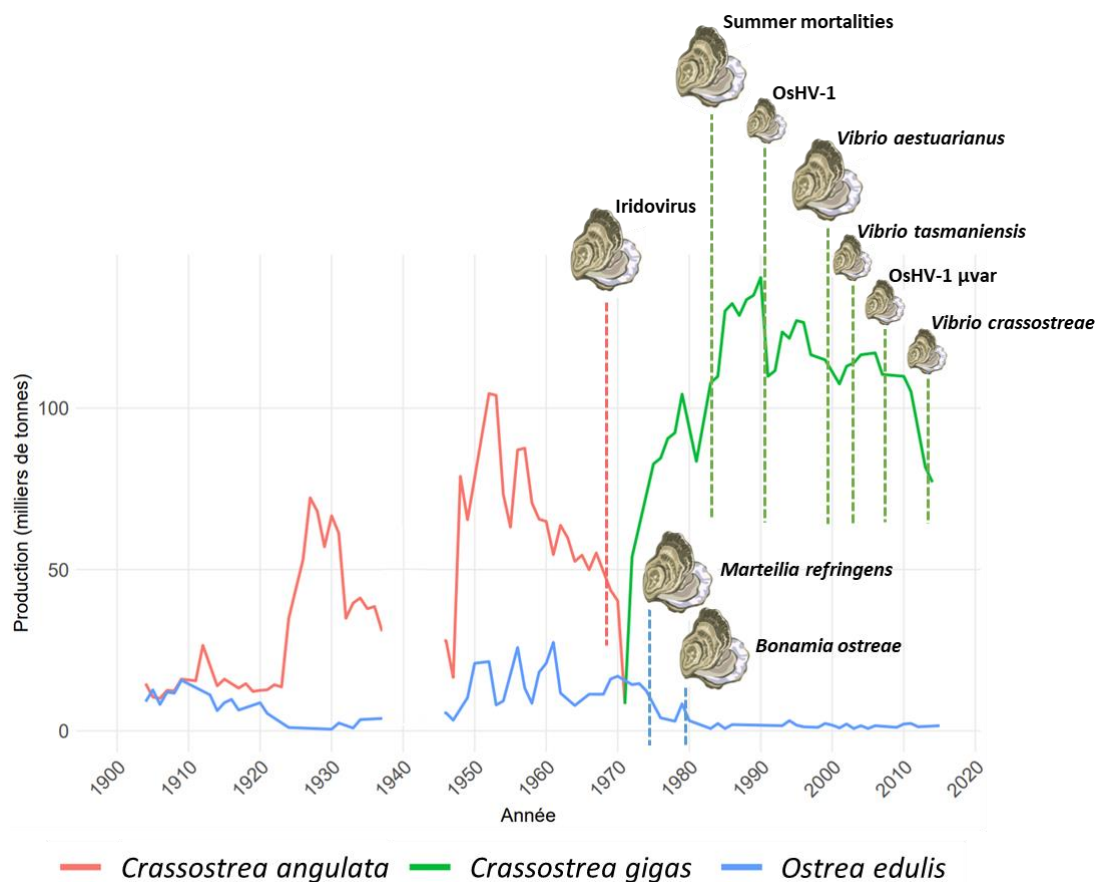


Figure 28: Historique de la production d'huître *Ostrea edulis* (bleu), *Crassostrea angulata* (rouge) et *Crassostrea gigas* (vert) en France. Les principaux agents pathogènes associés aux mortalités chez les huîtres adultes ou aux juvéniles et naissains sont représentés en fonction de l'année de leur identification. Adapté de (Buestel et al. 2009; Gouletquer et Heral 1997).

a) Les protistes comme micro-organismes pathogènes majeurs chez *O. edulis*, *C. angulata*, et *C. virginica*

Les huîtres cultivées en claires ostréicoles sont sujettes à des infections par des protistes unicellulaires. En effet, avant l'expansion de la culture de *C. gigas* en France et en Europe, *Crassostrea angulata* et *Ostrea edulis* étaient les huîtres principalement cultivées et consommées. Les productions d'*O. edulis* ont été impactées par des infections parasitaires, notamment par des protistes du genre *Bonamia*, causant de nombreuses pertes ostréicoles et amenant *O. edulis* dans la liste des espèces menacées (I. Arzul et al. 2014).

Bonamia ostreae est un parasite infectant *O. edulis* et donc le cycle infectieux implique les cellules épithéliales des branchies et les hémocytes dans lesquelles le parasite se répliquent (Montes, Anadón, et Azevedo 1994). *Bonamia* peut aussi infecter *C. gigas*, mais cette dernière est capable de l'éliminer, ne causant pas de mortalités en claires ostréicoles. *Bonamia ostreae* fait cependant partie de l'ordre des Haplosporidians, dans lequel d'autres protistes pathogènes d'huître sont retrouvés, notamment du genre *Haplosporidium*, infectant *C. gigas* (Hine 2020). *Haplosporidium nelsoni* est un parasite retrouvé pour la première fois en 1957 chez *C. virginica* et causant de nombreuses mortalités en ostréiculture. Chez *C. gigas*, ce parasite ne cause pas d'épisodes de mortalité massives, mais reste source d'inquiétude, notamment car *C. gigas* peut agir comme vecteur asymptomatique de ce parasite, le transmettant à d'autres espèces de bivalves plus sensibles comme *C. virginica*. L'origine des épisodes de mortalité observés chez cette dernière a pu être associée à l'importation de juvéniles de *C. gigas* en provenance du Japon, porteurs sains du parasite (Burreson, Stokes, et Friedman 2000). Des plasmodia de *H. nelsoni* ont pu être retrouvés dans des frottis de cœur d'*O. edulis* infectés provenant des côtes d'Irlande (Lynch et al. 2013). Chez *C. virginica* et *C. gigas*, les hémocytes ne semblent pas infectés et ces derniers ne phagocytent pas le parasite (Ford, Ashton-Alcox, et Kanaley 1993), probablement en raison d'une similarité entre les protéines de surface des hémocytes et celles du parasite (Kanaley et Ford 1990), empêchant les hémocytes de considérer *H. nelsoni* comme corps étranger.

Haplosporidium costale, un autre membre de l'ordre Haplosporidien, a récemment été identifié comme cause de faibles mortalités chez *C. gigas* en France en 2019, via la colonisation des tissus conjonctifs (Isabelle Arzul et al. 2022). Ce parasite, tout comme *H. nelsoni*, reste peu étudié chez *C. gigas*.

Comme pour *H. costale* des infections à des protistes moins répandus comme *Perkinsus* et *Mikrocytos* sont aussi à risque pour les claires ostréicoles. *Perkinsus marinus* infecte *C. gigas* et *C. virginica*. *C. gigas* est aussi sensible à une infection par ce protiste, pouvant conduire à des mortalités (Barber et Mann 1994). Les mécanismes impliqués dans la résistance accrue de *C. gigas* face à *P. marinus* ont été suggérés comme étant due à l'expression différentielle d'inhibiteurs de protéase chez *C. gigas*, pouvant conduire à une élimination des protéases parasitaires, elles-mêmes jouant sur les opsonines impliquées dans l'élimination des micro-organismes pathogènes par phagocytose (Romestand, Corbier, et Roch 2002).

Mikrocytos mackini infecte les huîtres et cause de nombreuses mortalité chez *C. virginica* et *O. edulis*. Chez *C. gigas*, ces mortalités peuvent atteindre jusqu'à 30 % dans les régions endémiques, notamment en Colombie-Britannique au Canada. *Mikrocytos mackini* infecte les tissus conjonctifs vésiculaires de son hôte et se développe fortement lorsque la température de l'eau est froide (Sm, D, et Gr 1997).

Assez peu de choses sont aujourd'hui connues sur les protistes infectant *C. gigas*, leurs cycles de vie, les épithéliums visés par ces protistes, ou encore la réponse immunitaire de l'huître face à ces agents pathogènes. Malgré cela, des outils de détection fiable de ces protistes ont été développés ayant comme objectifs de réduire l'impact de ces micro-organismes pathogènes sur les populations d'huître sensible, comme de réduire les risques de transmission de ces agents pathogènes à de nouveaux hôtes plus sensibles (Jørgensen et al. 2020; Thébault et al. 2005; Polinski et al. 2015; Isabelle Arzul et al. 2022; Villalba et al. 2004).

b) Le virus OsHV1 μ var et Le Pacific Oyster Mortality Syndrom

Depuis 2008, *C. gigas* est affectée par un syndrome appelé *Pacific Oyster Mortality Syndrome* (POMS), qui tue plus de 35 % des huîtres juvéniles dans les cultures ostréicoles en Europe et en Océanie chaque année (Petton et al. 2021). Le POMS est une maladie polymicrobienne (**Figure 29**) affectant les huîtres juvéniles dont l'agent pathogène principal est le virus OsHV-1 μ Var (*Ostreid herpesvirus 1*) (de Lorgeril et al. 2018a). OsHV-1 μ Var est un variant du virus OsHV-1 possédant des mutations sur plusieurs cadres de lecture ouverts accentuant l'aspect pathogène de ce virus (modification des protéines et glycoprotéines membranaires) via l'amélioration de ces capacités d'invasion des hémocytes de *C. gigas* (Burioli, Prearo, et Houssin 2017). L'émergence et la dissémination de ce variant en ostréiculture en Europe ont été associées à l'augmentation de la densité d'élevage, au déplacement de naissains infectés à

travers différentes régions pour optimiser la production, et au manque de biosécurité efficace, via le partage d'équipements contaminés (M. Fuhrmann et al. 2019; Pelletier et al. 2023).

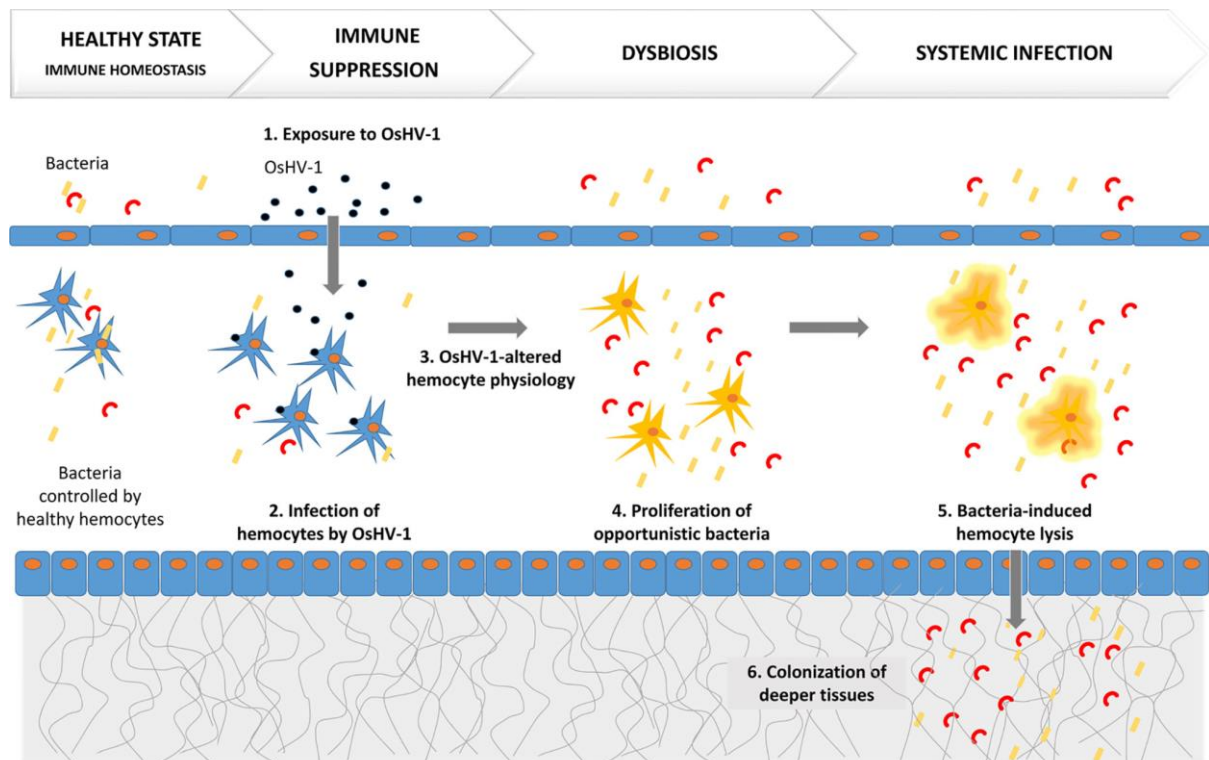


Figure 29 : Représentation schématique des étapes conduisant au POMS. La primo-infection des hémocytes par OsHV-1 μ Var, affecte leur physiologie, via notamment la diminution de la production de peptides antimicrobiens. Les hémocytes n'étant plus capable de contrôler le microbiote, la prolifération de bactéries pathogènes opportunistes conduit à une bactériémie secondaire entraînant la lyse des hémocytes, la colonisation des tissus adjacents, et enfin, la mort de l'huître. Adapté de (Petton et al. 2021).

Le virus OsHV-1 μ Var est un virus à ADN enveloppé composé d'une capsid de 116 nm, d'un génome de 180 kbp et d'un fragment de 266 bp. L'infection des huîtres par OsHV-1 μ Var débute suite à l'entrée du virus dans le système circulatoire de l'huître. Le virus est capable d'infecter les hémocytes, et d'altérer leur physiologie. Cette altération des hémocytes induit un état immunodéprimé de l'huître, caractérisé par la sous-expression de gènes codants pour des peptides antimicrobiens et pour la superoxyde dismutase extracellulaire, impliqués dans le contrôle du microbiote chez l'huître (de Lorgeril et al. 2018a). Le microbiote de l'huître est principalement composé des phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*. La composition du microbiote est influencée par de nombreux facteurs comme notamment la température, l'âge, le système immunitaire ou par l'interaction de l'huître avec un organisme pathogène (Z. Li et Wang 2017). Certains genres qui composent le microbiote des huîtres pourraient avoir un rôle dans la résistance face aux micro-organismes pathogènes (Clerissi et

al. 2020). A l'inverse, d'autres genres sont associés à des événements infectieux. Ainsi, dans le cas d'huîtres affectées par le POMS, l'altération des hémocytes conduit à un déséquilibre dans le microbiote et à l'émergence d'un ensemble de genres bactériens devenant systématiquement dominant. Ce pathobionte est notamment composé des genres *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas*, et *Vibrio* (de Lorgeril et al. 2018a; Lucasson et al. 2020). Ce changement dans la composition du microbiote suggère que ces genres bactériens sont capables de contourner le système immunitaire des huîtres lorsque celui-ci est affaibli, et/ou qu'ils sont dotés de capacités de compétition supérieures par rapport aux autres genres bactériens. Une infection bactérienne secondaire causée par des agents pathogènes opportunistes associés à ce pathobionte cause une infection systémique responsable de la mort de l'animal (Petton et al. 2021).

c) Les bactéries du genre *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des Gamma-protéobactéries à Gram négatif présentes dans les environnements marins. Ce genre bactérien est connu pour posséder 2 chromosomes, un génome de taille moyenne autour de 4,5 Mb, et comme étant anaérobie facultatif. On retrouve ces bactéries sous des formes de vie libre ou associées à d'autres organismes, dans des relations qui peuvent être mutualistes, commensales ou pathogènes. Certaines infectent l'homme (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*), d'autres peuvent infecter les animaux marins comme les coraux (*V. coralliilyticus*), les palourdes (*V. celticus*, *V. tapetis*), les crevettes (*V. campbellii*, *V. nigripulchritudo*), les moules (*V. splendidus*, *V. alginolyticus*) et les huîtres (*V. tasmaniensis*, *V. crassostreae*, *V. harveyi*, *V. aestuarianus*). *Nocardia crassostreae*, une autre bactérie qui infecte *C. gigas* a pu être isolée suite à des épisodes de mortalité, mais elle reste pour le moment peu décrite (Travers et al. 2015). Les *Vibrios* sont très diversifiés et les 191 espèces actuellement décrites sont structurées en plusieurs clades, portant le nom de l'espèce majeure du clade (**Figure 30**) (Sawabe et al. 2013). On y retrouve notamment les *Vibrios* du clade *Splendidus*, du clade *Harveyi*, ou du clade *Anguillarum*, dont des représentants de ces trois clades ont pu être retrouvés chez des huîtres malades dans des épisodes de mortalités massives d'huîtres. *V. tasmaniensis* (Rubio et al. 2019a) ou *V. crassostreae* (Bruto et al. 2017) appartiennent notamment au clade *Splendidus*, *V. harveyi* appartient au clade *Harveyi* (Oyanedel et al. 2023), et *V. aestuarianus* appartient au clade *Anguillarum* (Sawabe et al. 2013).

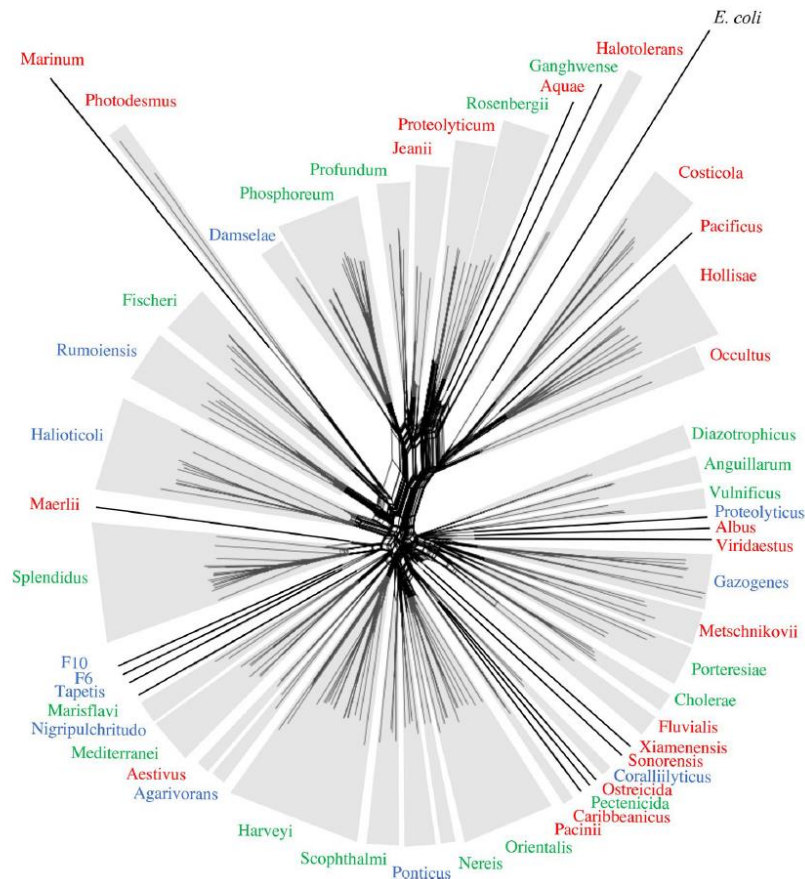


Figure 30 : Arbre phylogénétique des principaux représentants des différents clades de *Vibrio*. L'arbre est construit sur la base des séquences codantes pour 8 gènes (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* et *topA*). Les espèces sont regroupées en clades délimités par des zones grisées. Les clades rouge, bleu et vert représentent respectivement des clades nouveaux, inchangés et corrigés par l'étude à partir de laquelle cette figure est adaptée : (C. Jiang et al. 2021).

Clade *Splendidus* : Les souches cytotoxiques de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. Crassostreae* J2-9.

V. tasmaniensis LGP32 et *V. crassostreae* J2-9, deux bactéries du clade *Splendidus*, utilisent deux stratégies distinctes afin d'infecter l'huître, (Rubio et al. 2019a) (**Figure 31**). La virulence de *V. tasmaniensis* a été décrite comme étant dépendante de son système de sécrétion de type 6 pour induire la lyse des hémocytes de manière phagocytose dépendante. En effet, la souche de *V. tasmaniensis* LGP32 peut être phagocytée par les hémocytes dans lesquels elle survit à l'accumulation du cuivre et aux espèces réactives de l'oxygène, dans des vacuoles phagocytaires (Marylise Duperthuy et al. 2011; Audrey Sophie Vanhove et al. 2015; Rubio et al. 2019a). Cette étape d'internalisation est nécessaire à l'expression de sa cytotoxicité envers les hémocytes et à sa virulence dans le cadre de tests d'infection expérimentale. Cette bactérie intracellulaire facultative des hémocytes de l'huître, est utilisée comme modèle dans les interactions pathogènes entre les *Vibrios* et les huîtres (Gay et al. 2004).

V. crassostreae J2-9 est quant à elle capable d'induire la lyse des hémocytes sans être internalisée par ces derniers et ce à l'aide d'un gène de fonction inconnue, R5.7, nécessaire à la virulence et à la cytotoxicité de la souche (Rubio et al. 2019a). Un appareil de sécrétion T6SS porté par un plasmide de virulence joue également un rôle dans la cytotoxicité (Piel et al. 2020). Ainsi il a été montré que les activités cytotoxiques de ces deux espèces de *Vibrios* du clade *Splendidus* sont nécessaires au cours de l'infection de l'hôte pour échapper au contrôle par les hémocytes dans l'hémolymphe et pour se disséminer dans différents tissus de l'hôte en causant des dommages qui vont conduire à la mort de l'animal (Rubio et al. 2019a). Une colonisation totale a pu être observée sur les glandes digestives, les gonades et sous la lame basale des intestins.

Virulent *Vibrio tasmaniensis*

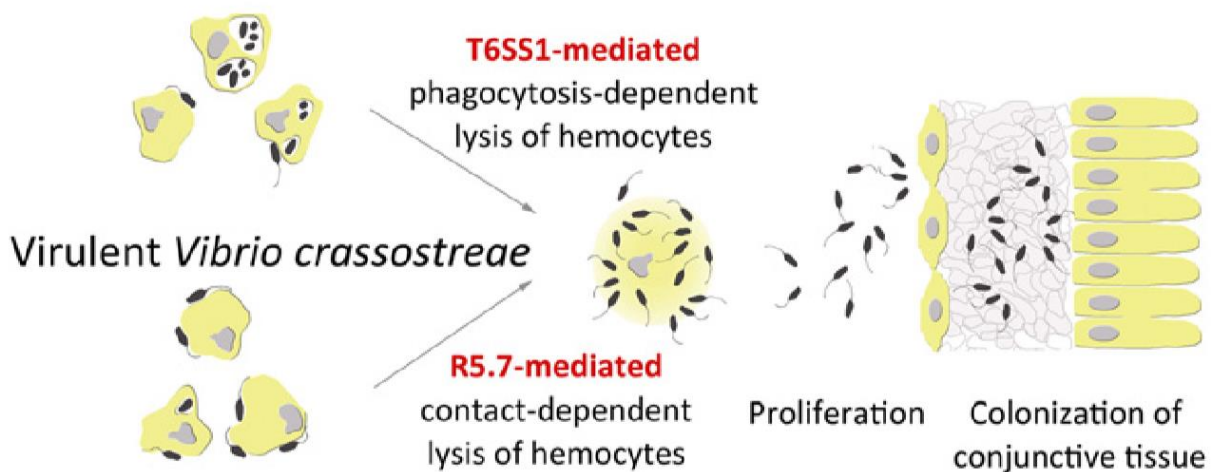


Figure 31 : Mécanismes de cytotoxicité hémocytaire de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 . *V. tasmaniensis* LGP32, micro-organisme pathogène intracellulaire, induit la lyse des hémocytes à l'aide d'un système de sécrétion de type 6 retrouvé sur le chromosome 1. *V. crassostreae*, micro-organisme pathogène extracellulaire, à l'aide de la protéine R5.7. Après la lyse des hémocytes, les bactéries colonisent les tissus conjonctifs et induisent la mort de l'huître par septicémie (Rubio et al. 2019a).

Clade *Harveyi* : les espèces colonisatrices *V. harveyi* et *V. rotiferianus*

Suite à l'immersion d'huîtres juvéniles saines dans l'étang de Thau lors d'épisodes de mortalité en automne 2015, Philippe Haffner et Arnaud Lagorce ont pu observer une forte prévalence de *Vibrio* du clade *Harveyi*, dans l'eau de l'étang et dans les huîtres malades. Dans ce clade, les espèces *V. harveyi* et *V. rotiferianus*, étaient dominantes dans les huîtres infectées par le virus OsHV-1, et très rares dans l'eau alors que d'autres espèces comme *V. owensii* et *V. jasicida*, étaient préférentiellement retrouvés dans la colonne d'eau et rarement dans les huîtres. L'association positive de *V. harveyi* et *V. rotiferianus* et l'association négative de *V. owensii* et

V. jasicida, avec *C. gigas* ont pu être confirmées expérimentalement en mésocosmes grâce à une exposition des huîtres au virus OsHV-1 μ Var et à un cocktail de 25 souches appartenant aux 4 espèces du clade *Harveyi* (Oyanedel et al. 2023). *V. harveyi* a été montré comme exerçant une cytotoxicité dépendante d'un système de sécrétion de type 3 sur les hémocytes de *C. gigas*. Il produit aussi un sidérophore (la vibrioferrine) et un récepteur à cette même protéine permettant à cet agent pathogène de capter le fer dans l'environnement. *V. harveyi* et OsHV-1 coopèrent lors du syndrome polymicrobien appelé POMS (Pacific Oyster Mortality Syndrom) en favorisant leur croissance mutuelle. *V. rotiferianus* ne possède pas les gènes codants pour la vibrioferrine mais possède son récepteur facilitant ainsi sa croissance chez l'huître et lui conférant le rôle de "tricheur" dans cette interaction. En revanche, retrouvé seul dans l'hémolymphe, *V. rotiferianus* ne colonise pas *C. gigas*, et ne cause pas de mortalité (Oyanedel et al. 2023).

Clade *Anguillarum* : *V. aestuarianus* comme micro-organisme pathogène primaire de *C. gigas*

i) Niche écologique et cycle infectieux.

Vibrio aestuarianus est le vibrio causant les plus forts épisodes de mortalités chez les huîtres adultes. Cette bactérie est retrouvée naturellement dans toutes les eaux estuaires, douces et marines du monde entier. Elle occupe des habitats allant de la mer profonde aux environnements aquatiques peu profonds (Vezzulli et al. 2015) et cause de nombreuses épizooties ostréicoles chaque année (M. Garnier et al. 2007). *V. aestuarianus* est un agent pathogène strict de l'huître adulte, contrairement aux autres espèces de *Vibrios* qui infectent les huîtres juvéniles après une primo-infection par le virus OsHV-1 μ Var. *V. aestuarianus* serait présent dans les sédiments pendant les périodes les plus froides. Dans ces périodes, peu à pas de mortalités sont associées à cette bactérie, et on la retrouve dans les animaux sous une forme de persistance pour l'instant non définie. Il a été proposé qu'elle puisse aussi s'associer à d'autres organismes (Vezzulli et al. 2015). Des concentrations plus élevées sont détectées pendant les périodes estivales, associées à des épisodes de mortalités massives (Azandégbé et al. 2010). Dans un contexte de réchauffement des océans lié au changement climatique, le comportement de cette bactérie pathogène est pourrait être responsable d'une augmentation des épisodes de mortalités massives chez les huîtres adultes (Vezzulli et al. 2015). De nombreuses sous-espèces de *V. aestuarianus*, ont été décrites avec des caractéristiques phénotypiques différentes (Matthieu Garnier, Labreuche, et Nicolas 2008; Garcia et al. 2021). Ainsi, certaines souches de *V. aestuarianus* sont capables d'induire des mortalités, alors que d'autres présentes dans l'environnement ne sont pas pathogènes. Il a été montré que les génotypes de *V. aestuarianus* virulents pour les

huîtres, qui se sont répandues à travers l'Europe ces 20 dernières années, peuvent être résumés à deux lignées clonales contenant un îlot de résistance au cuivre (Mesnil et al. 2023). En testant la virulence de plusieurs souches de *V. aestuarianus*, Travers et ses collaborateurs montrent que seulement 100 bactéries sont nécessaires pour induire la maladie et 80% de mortalité des huîtres par injection. Cependant ces mêmes souches nécessitent d'être à des concentrations de 800 000 bactéries / mL pour permettre à la bactérie de causer des taux de mortalité similaires par immersion des huîtres dans des bacs contenant de l'eau contaminée. Ces résultats suggèrent que les étapes initiales de l'entrée de la bactérie dans l'hôte sont indispensables pour permettre à la bactérie d'exprimer sa pathogénicité (Travers et al. 2017). Le mécanisme d'infection de *V. aestuarianus* dans l'huître se ferait par liaison de la bactérie à des cellules phytoplanctoniques ou des agrégats marins qui seraient ensuite filtrés et consommés par *C. gigas*. En effet, les plus fortes concentrations en bactéries sont retrouvées dans l'hémolymphe de *C. gigas* lorsque des sources de nourriture (phytoplancton) sont ajoutées lors d'infections expérimentales (Doni et al. 2023). Les mortalités causées par *V. aestuarianus* surviennent par vagues successives. Après 5 jours d'incubation et de développement de la maladie et suite à la mort de l'huître, cette dernière va sécréter *V. aestuarianus* dans l'eau. Ces nouvelles bactéries, acquièrent alors un statut hypervirulent et vont infecter de nouveaux animaux, perpétuant le cycle infectieux. En claires ostréicoles, des vagues de mortalités chroniques vont ainsi être observées tous les 4 à 6 jours en fonction des conditions environnementales permettant à la maladie de se développer plus ou moins rapidement (Parizadeh et al. 2018).

ii) Tropisme de *V. aestuarianus* et réponse de l'hôte.

Au niveau histopathologique, *V. aestuarianus* infecte plusieurs tissus à différents stades de développement de la maladie. En effet, dans les premiers stades de l'infection, la bactérie est retrouvée dans les branchies, puis se dissémine dans les glandes digestives, le manteau et les palpes labiaux à des stades d'infection intermédiaires. Enfin au stade septicémique, la bactérie est retrouvée dans le muscle adducteur et dans l'hémolymphe (Parizadeh et al. 2018; Mandas et al. 2020). Des auteurs complètent ces observations en montrant que la progression de l'infection de *C. gigas* par *V. aestuarianus* nécessite une étape de colonisation de l'hémolymphe, primordiale pour permettre à la bactérie de se multiplier dans l'huître, pour conduire à de étapes de septicémie de la maladie (Parizadeh et al. 2018; Geslin et al. 2024) (**Figure 32**).

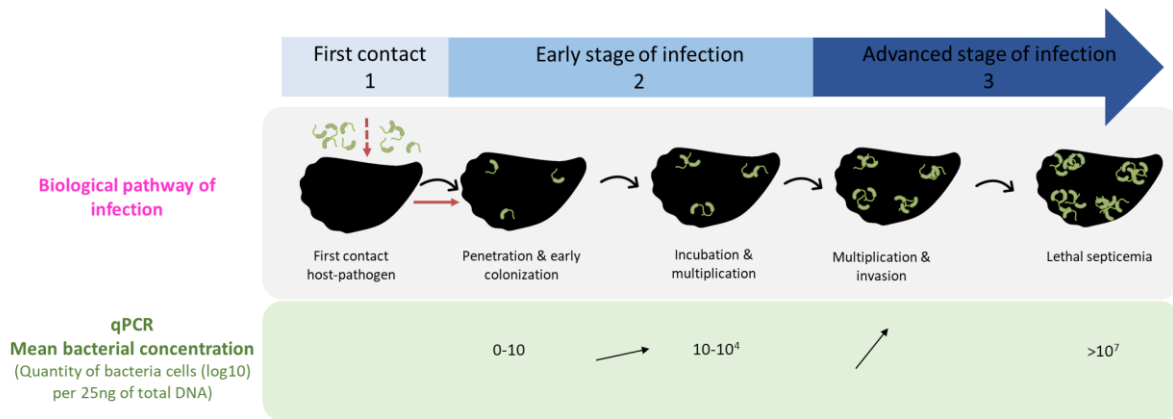


Figure 32 : Etapes successives de la pathogénèse induite par *V. aestuarianus*. Figure réalisée sur la base d'observations histologiques et de la charge bactérienne retrouvée dans l'ensemble des tissus des animaux infectés. De 0 à 10 bactéries / 25ng d'ADN tissulaire : pénétration et début de colonisation. De 10 à 10⁴ bactéries / 25ng d'ADN tissulaire : incubation et multiplication de *V. aestuarianus*. S'en suit une invasion des autres tissus et une multiplication importante de la bactérie jusqu'à une concentration septicémique >10⁷ bactéries / 25ng d'ADN tissulaire. Adapté de (Geslin et al. 2024).

Par des approches de génomique comparative, couplées à des approches d'infections expérimentales avec plusieurs souches de *V. aestuarianus*, le gène *varS* a été mis en évidence comme régulateur clé de la virulence de *V. aestuarianus* (Goudenège et al. 2015). Ce gène code pour une histidine-protéine kinase décrite pour la première fois chez *V. cholerae* (*VarS/VarA*) comme régulant l'expression du gène *hapR*, un régulateur transcriptionnel impliqué dans des mécanismes de *quorum sensing* (mécanisme de communication bactérienne qui permet de coordonner des comportements collectifs en fonction de la densité de population via la détection de molécules signal) (Tsou et al. 2011). Chez *V. aestuarianus*, le gène *varS* fait partie d'un système à deux composants régulant l'expression d'autres facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie, notamment de la métallo-protéase *Vam* (Goudenège et al. 2015). Cette enzyme extracellulaire, dont l'introduction dans une souche de *V. tasmaniensis* non virulente conduit à l'apparition d'un phénotype virulent similaire à celui de *V. aestuarianus*, induit la perturbation des capacités adhésives et phagocytaires des hémocytes diminuant leurs capacités immunitaires (Labreuche et al. 2010; Labreuche, Soudant, et al. 2006). La superoxyde dismutase extracellulaire (*Cg-EcSOD*) joue un rôle essentiel dans l'opsonisation des agents pathogènes en vue de leurs reconnaissances par les phagocytes (Marcelo Gonzalez et al. 2005). La diminution de l'expression de gènes codants pour la (*Cg-EcSOD*) est observée dans les stades précoces de l'infection, et une activité de protéases accrues est observée dans les stades tardifs de l'infection (Labreuche, Lambert, et al. 2006a). Ces protéases pourraient avoir un rôle dans la protéolyse de la *Cg-EcSOD*, qui couplé à la diminution de son expression conduisent *V.*

aestuarianus a échapper à la phagocytose par les hémocytes de *C. gigas* (Labreuche, Lambert, et al. 2006a). Après injection de *V. aestuarianus* dans l'hémolymphe, les hémocytes de *C. gigas* expriment des gènes de réponse immunitaires (IAP, lectines de type C, metallothionéine IV, Thioredoxine, HSP22, Cystatines A2, intégrines, lectines liant le L-rhamnose, et protéines du cytosquelette) et ce, 4 jours après injection (Lorgeril et al. 2011). En effet, les travaux montrent une surexpression de nombreux gènes communs, dans le cas où les huîtres sont infectées par *V. aestuarianus* 02/041 et *V. splendidus* LGP32. Ces gènes sont réprimés en absence d'injection, où lorsque *C. gigas* est injecté par *V. tasmaniensis* LMG20012t (une souche non virulente de *Vibrio*) (Lorgeril et al. 2011). Ces résultats suggèrent que les hémocytes d'huîtres infectés déclenchent l'expression de gènes impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose de ces bactéries pathogènes, dans la réponse au stress oxydatif, dans l'inhibition de l'apoptose, et dans l'inhibition de protéases.

La diversité des mécanismes et facteurs de virulence impliqués dans les pathologies bactériennes affectant *C. gigas*, et l'augmentation de la récurrence des épizooties causant parfois des pertes allant jusqu'à 100% des huîtres en claires ostréicoles soutiennent l'importance des études de ces bactéries pathogènes afin de réduire les mortalités qui leur sont associées.

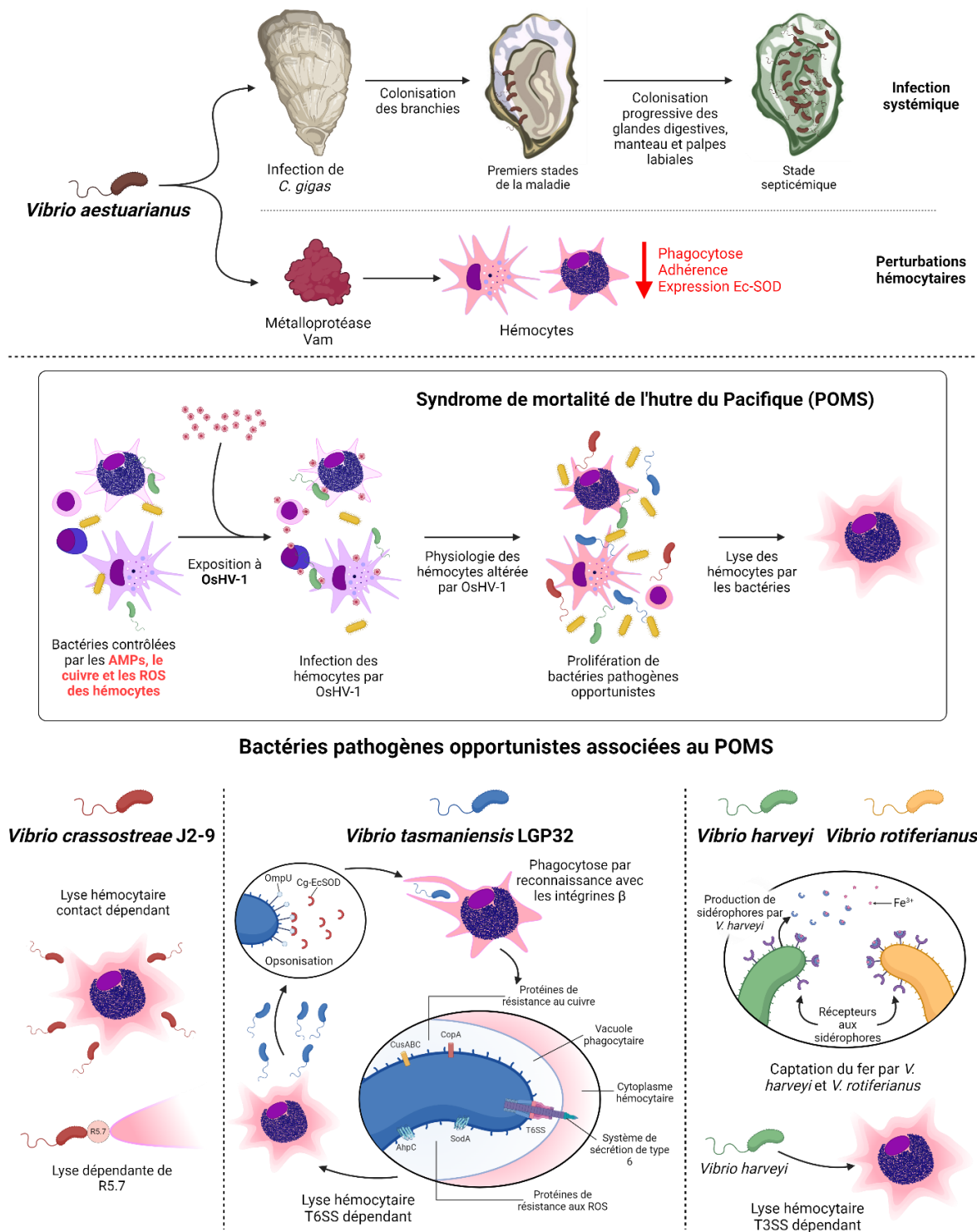


Figure 33 : Principales pathologies bactériennes et virale affectant *C. gigas*. *V. aestuarianus* perturbe l'adhérence et la phagocytose des hémocytes et colonise les tissus de *C. gigas*, conduisant à la mort de l'huître. Le virus OsHV-1 infecte les hémocytes et perturbe leur physiologie, conduisant à une bactériémie secondaire par des bactéries pathogènes opportunistes. Ce phénomène est appelé le syndrome de mortalité de l'huître du pacifique. Parmi ces bactéries opportunistes, *V. crassostreae*, *V. tasmaniensis* et *V. harveyi* lyse les hémocytes. *V. rotiferianus* est associé avec ce syndrome par sa capacité à capter le fer des sidérophores de *V. harveyi*.

PROBLEMATIQUE DE THESE

Les huîtres, en particulier *Crassostrea gigas*, présentent un intérêt économique et écologique majeur. Cependant, les activités anthropiques favorisent aujourd'hui l'émergence de maladies responsables de mortalités massives dans les élevages ostréicoles (Neokye et al. 2024). Ces maladies engendrent des pertes économiques dramatiques pour les ostréiculteurs, et limiter leurs impacts sur *C. gigas* est donc crucial. Pour cela, il est indispensable de mieux comprendre comment cette espèce d'huître interagit avec les pathogènes responsables de ces mortalités.

Le système immunitaire de *C. gigas*, principalement impliqué dans la défense contre les agents pathogènes, fait l'objet d'une compréhension croissante, et de nombreuses études mettent en lumière sa complexité ainsi que l'impact des pathogènes sur ce système (L. Wang, Song, et Song 2018). Au laboratoire, divers travaux ont démontré que certains pathogènes induisent des mortalités chez *C. gigas* en affectant directement les hémocytes, les cellules immunitaires circulantes dans l'hémolymphe. Par exemple, le virus OsHV-1 altère l'expression des peptides antimicrobiens produits par les hémocytes (de Lorgeril et al. 2018b). Les bactéries *Vibrio tasmانيensis* LGP32, *V. crassostreae* J2.9 et *V. harveyi*, isolées lors d'épisodes de mortalités associés à OsHV-1, se révèlent quant à elles cytotoxiques pour les hémocytes de *C. gigas* (Rubio et al. 2019b; Oyanedel et al. 2023). Les hémocytes sont ainsi au cœur des interactions entre l'huître et ces pathogènes, et constituent également une cible privilégiée pour les agents pathogènes à l'origine de ses mortalités massives en ostréiculture.

Plusieurs tissus ont comme rôle la défense de l'huître face aux pathogènes. Les nombreux épithélia de l'huître au contact du milieu extérieur (manteau, branchies et palpes labiales) représentent une première barrière. Grâce à leur structure et via la sécrétion d'un mucus de nature glycoprotéique, ils limitent l'entrée de pathogènes (Allam et Pales Espinosa 2016). Le mucus contient divers effecteurs immunitaires tels que des lectines et des enzymes hydrolytiques, qui neutralisent les pathogènes avant qu'ils n'envahissent les tissus sous-jacents. Les hémocytes, capables de phagocytose et agissant comme des cellules sentinelles, peuvent migrer à travers les barrières épithéliales, pour interagir directement avec les agents pathogènes dans le mucus, jouant ainsi un rôle clé dans la prévention des infections (Allam et Pales Espinosa 2016). Ainsi, les hémocytes jouent un rôle central dans la réponse immunitaire de l'huître via des mécanismes cellulaires comme la phagocytose, ou encore via la production de cytokines et d'effecteurs cytotoxiques comme les peptides antimicrobiens ou les espèces réactives de l'oxygène (de la Ballina et al. 2022). Bien que plusieurs classifications aient été

proposées pour les hémocytes, mettant en évidence 3 principaux types hémocytaires (granulocytes, hyalinocytes et cellules de type « blast-like »), il n'existe pas encore de consensus sur leur diversité exacte, ni sur les potentielles voies de différenciation qui sous-tendent cette diversité. Il est ainsi difficile aujourd'hui d'associer les types d'hémocytes à des fonctions immunitaires précises. Cette difficulté, exacerbée par des approches méthodologiques variées qui ont été employées pour les caractériser (microscopie photonique, électronique, cytométrie en flux, etc.), freine la compréhension globale des réponses immunitaires face aux infections. Dans ce contexte, afin de définir de manière plus précise les mécanismes de défense de l'huître lors d'interaction avec des pathogènes, nous nous sommes demandés quelle était la diversité hémocytaire chez *C. gigas* : combien de types hémocytaires existe-t-il et quels sont leurs rôles et leurs fonctions lors d'une infection par des pathogènes ?

Pour répondre à ces questions, j'aborderai dans le chapitre 1 de ma thèse les travaux que nous avons réalisés afin de caractériser la diversité des hémocytes chez *C. gigas* en utilisant trois approches complémentaires : une approche de transcriptomique, une approche cytologique et une approche de biologie fonctionnelle. La caractérisation des populations hémocytaires au niveau transcriptomique a été réalisée par la technique de séquençage d'ARN sur cellules uniques (scRNA-Seq). Cette approche novatrice chez l'huître, couplée à des analyses bio-informatiques, a permis de distinguer, grâce à leurs profils transcriptomiques, les différentes populations d'hémocytes circulants. Grâce à ces analyses nous avons défini des marqueurs moléculaires de ces populations (gènes spécifiquement exprimés dans une population donnée) et nous avons retracé l'ontologie à l'origine de cette diversité cellulaire hémocytaire. La caractérisation des spécificités fonctionnelles des sous-populations hémocytaires identifiées par scRNA-Seq a été réalisée suite à la mise en place de techniques de fractionnements cellulaires (gradients de Percoll) suivis de colorations cytologiques et de tests fonctionnels sur les hémocytes ainsi séparés. L'objectif a été de produire un atlas hémocytaire de référence de l'huître *C. gigas* pour lequel chaque sous-population cellulaire est définie d'un point de vue cytologique, fonctionnel, transcriptionnel et identifiable par des marqueurs moléculaires spécifiques. Les travaux ont également permis de proposer des voies de différenciation à partir des hémocytes séquencés.

Sur la base de cette nouvelle description des hémocytes, j'aborderai dans le chapitre 2 une autre partie de mon travail qui a consisté à définir la dynamique de variations des populations hémocytaires en réponse à un pathogène bactérien bien connu. Ainsi, les hémocytes d'huîtres soumises à une infection expérimentale par *Vibrio aestuarianus francensis*, un agent

responsable de mortalités massives en France, ont été analysés tant au niveau cytotologique qu'au niveau transcriptomique.

PARTIE 2 : RESULTATS

PARTIE 2 : RESULTATS

CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA DIVERSITÉ CYTOLOGIQUE, FONCTIONNELLE ET TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES IMMUNITAIRES DE *C. GIGAS*.

Contexte et objectifs :

L'huître du Pacifique, *Crassostrea gigas*, est un mollusque bivalve d'une valeur écologique et économique considérable et une espèce modèle émergente dans la recherche sur l'immunité innée des mollusques. Les populations de *C. gigas* sont de plus en plus exposées aux épidémies exacerbées par le changement climatique et les activités anthropiques. Des études récentes réalisées au sein de notre laboratoire ont permis la caractérisation des bactéries et virus causant ces épidémies, ainsi que l'implication clé des cellules immunitaires des huîtres, appelées hémocytes, dans la dynamique de ces infections (de Lorgeril et al. 2018b; Rubio et al. 2019b; Oyanedel et al. 2023).

Les hémocytes sont connus pour être la pierre angulaire de l'immunité chez les mollusques, et malgré des décennies d'études, la diversité et la spécialisation fonctionnelle de ces cellules chez *C. gigas* ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique (de la Ballina et al. 2022).

Les premières tentatives de caractérisation des hémocytes de *Crassostrea gigas* reposaient principalement sur des observations morphologiques en cytologie. Six types hémocytaires différents, appelés à l'époque des corpuscules sanguins (blood corpuscles) ont alors été mis en évidence (Tanaka, Takasugi, et Maoka 1961). Toutefois, seules, ces approches de coloration cytologique manquent de précision et présentent le risque d'être subjectives et donc difficilement reproductibles.

Par ces approches de microscopie électronique à transmission, Ruddell et ses collaborateurs ont permis d'affiner ces observations et ont mis en évidence les types hémocytaires recrutés dans le manteau suite à une blessure. Ces auteurs appellent les hémocytes amoebocytes et différencient 5 types hémocytaires différents : trois types d'agranular amoebocytes (les monocytes-types, les fibroblast-type et les myoblasts-type) et deux types de granular amoebocytes (les acidophiles et les basophiles) (Ruddell 1971) dont les noms font référence à l'immunologie humaine (Pollard et al. 2017). Par des approches de cytologie et de microscopie électronique, Feng et ses collaborateurs ont mis en évidence 3 types d'amoebocytes sur la base de la taille du noyau des cellules. Le type I possède un noyau de 3 à 5 μm avec peu de

cytoplasme, le type II possède un noyau moins compact (5 à 8 μm) et le type III possède un noyau de 6 à 10 μm après coloration de May-Grunwald-Giemsa. Chaque type possède 2 sous-types en fonction de la granulométrie du cytoplasme (Feng, Feng, et Yamasu 1977). Les granulocytes (éosinophiles, basophiles et un mélange de ces deux types cellulaires), les agranulocytes et cellules vésiculaires ont été mis en évidence par microscopie à lumière blanche et par microscopie électronique à transmission (SuJung, SuMin, et HsinYiu 2005). La cytométrie en flux et le fractionnement par gradient de Percoll ont ensuite permis d'isoler les hémocytes selon leur taille, granulométrie ou densité, affinant ainsi leur classification. Ainsi, trois groupes majeurs d'hémocytes : les granulocytes (à granules denses ou lucides aux électrons), les hyalinocytes de taille variable, et les « blast-like cells » ont été mis en évidence sur la base d'une description morphologique en microscopie électronique à transmission suite à un tri cellulaire sur gradient de Percoll (Evelyne Bachère, Chagot, et Grizel 1988). Les granulocytes, petits granulocytes et agranulocytes ont été en revanche mis en évidence par des approches de microscopie par contraste de phase suite à un tri cellulaire par cytométrie en flux (Ashton-Alcox et Ford 1998a). Ainsi, 3 types majeurs d'hémocytes semblent émerger de ces classifications : les hémocytes granuleux, ou non, et les hémocytes de petites tailles. Cependant, malgré ces avancées techniques, la microscopie électronique à transmission reste limitée à l'observation structurelle des cellules, et même si les approches de cytométrie et de fractionnement sur gradient de Percoll permettent de distinguer les cellules par des critères ne dépendant pas seulement de leur morphologie, seule, ces approches ne permettent pas d'associer ces types hémocytaires à des fonctions immunitaires spécifiques. L'avènement du tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) a ouvert la voie à des caractérisations fonctionnelles des hémocytes. Lambert et ses collaborateurs ont identifié des hyalinocytes, de petits agranulocytes et des granulocytes, associant la production de ROS et la phagocytose à ces derniers, après stimulation par des *Vibrio* pathogènes ou du zymosan (Lambert et al. 2003b). En utilisant les mêmes approches d'autres auteurs confirment ces résultats mais nomment les petits agranulocytes les blast-like cells, et montrent que la production de ROS et la phagocytose sont affectés par la pollution issue d'une fuite de pétrole (Donaghy et al. 2010). Plus récemment, une étude utilisant la cytométrie, le fractionnement sur gradient de Percoll et la microscopie à lumière transmise a permis d'établir une classification des hémocytes de *C. gigas* en granulocytes, semi-granulocytes et agranulocytes. Cette classification, couplée à l'analyse des fonctions immunitaires des hémocytes (phagocytose, activité lysosomale, niveaux de ROS et de NO, expression de Cg-Def et d'autres gènes liés à la reconnaissance et la phagocytose), est désormais considérée comme une référence pour la description des hémocytes chez cette espèce

(W. Wang et al. 2017b). Cependant, l'absence de marqueurs cellulaires spécifiques, la fonction imprécise des différents sous-types d'hémocytes et le manque de description de leur lignage rendent difficile l'établissement d'une classification claire des hémocytes, indispensable à la compréhension des bases cellulaires de l'immunité chez *C. gigas*. Cette lacune constitue un obstacle majeur à la compréhension des interactions entre huître et pathogène, et freine ainsi le développement de stratégies prophylactiques en ostréiculture.

Définir les différents types cellulaires au sein d'un tissu hétérogène et les fonctions associées à ces cellules peut être réalisé par de nouvelles approches moléculaires. Ainsi un type cellulaire va pouvoir être défini par son contenu en transcrits révélé par séquençage d'ARNm. En 2009, une nouvelle méthode a été développée pour étudier le transcriptome de cellules uniques, à l'origine testée sur des blastomères de souris (Tang et al. 2009). Aujourd'hui de nombreuses techniques permettent d'avoir accès à l'ensemble des transcrits au niveau d'une cellule unique (technique de séquençage d'ARNm sur cellule unique - scRNA-seq), via des approches de type CEL-seq2, Drop-seq, MARS-seq, SCRIB-seq, Smart-seq, Smart-seq2 et Split-seq (Ziegenhain et al. 2017). La première étape de ces approches consiste à obtenir des préparations de cellules dissociées, isolées individuellement pour ensuite réaliser les réactions de séquençage, après transcription inverse des ARNm. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients, tels que la sensibilité, la précision dans la quantification des niveaux d'expression, la réduction des duplications d'amplification via l'utilisation d'identifiants moléculaires uniques (UMI: Unique Molecular Identifier), ainsi que le coût et le nombre de cellules séquencées (Ziegenhain et al. 2017). Ces techniques permettent ainsi d'établir le profil transcriptomique associé à chaque cellule séquencée et les marqueurs moléculaires associés à chaque groupe de cellules transcriptomiquement identiques, mais aussi d'étudier les relations de lignage entre les cellules. En effet, le traçage de lignées permet de suivre l'historique clonale des cellules et de reconstituer leurs trajectoires de différenciation au fil du temps, offrant ainsi une compréhension approfondie des transitions cellulaires ainsi que des destins et origines des cellules (Wagner et Klein 2020). Ces nouvelles techniques confèrent ainsi une précision accrue dans l'étude des transcriptomes, et donc une meilleure compréhension des interactions et relations entre cellules au sein d'un tissu ou du potentiel immunitaire que composent des cellules immunitaires circulantes (Shapiro, Biezuner, et Linnarsson 2013). Ces approches de scRNA-seq ont été utilisées aussi bien chez l'Homme (Vallejo et al. 2021) que chez les invertébrés pour caractériser et définir les différentes cellules qui composent leurs systèmes immunitaires. Par exemple chez *Drosophila melanogaster* l'approche par scRNA-seq a permis de mettre en évidence la présence d'un facteur de croissance des fibroblastes lorsque parasitées par des œufs

de guêpe parasitoïdes (Tattikota et al. 2020). Chez la crevette *Marsupenaeus japonicus*, ces approches ont permis de caractériser avec un niveau de détail supplémentaire la diversité transcriptomique des types d'hémocytes (Koiwai et al. 2021). Plus récemment, le scRNA-seq a permis de mettre en évidence 13 différents profils transcriptomiques distincts parmi les hémocytes circulants de *Crassostrea hongkongensis*, ainsi que 5 états de différenciations des hémocytes et deux lignées cellulaires distinctes au sein des granulocytes grâce à une analyse de trajectoire. Des facteurs de transcription, tels que Runx1, SCL/Tal-1, et GATA2, ont également été identifiés comme régulateurs de la différenciation des granulocytes (Meng, Zhang, et Wang 2022). Avant l'utilisation de cette approche, seuls les hyalinocytes et les granulocytes étaient décrits chez cette espèce (J. Li et al. 2018). Par ailleurs, cette technique a permis d'étudier l'impact du cuivre sur les populations d'hémocytes, révélant que les hémocytes granuleux répondaient de manière plus efficace pour faire face à l'exposition au cuivre (Meng et Wang 2022).

Ces approches innovantes apportent une compréhension plus détaillée des hémocytes circulants chez les invertébrés, et de leur rôle face aux stress biotiques et abiotiques. Cependant, l'absence de caractérisation fonctionnelle associée à l'approche de scRNA-seq développée chez *Crassostrea hongkongensis* par (Meng, Zhang, et Wang 2022) limite encore la compréhension du rôle des populations transcriptomiques identifiées.

Ces travaux montrent que de nouvelles méthodes permettent aujourd'hui une meilleure compréhension de la diversité des hémocytes chez une espèce donnée. Il est crucial d'appliquer ces approches de séquençage d'ARN sur cellules uniques (scRNA-seq) aux hémocytes de *Crassostrea gigas* pour enrichir les études existantes et offrir une caractérisation transcriptomique détaillée de leur hémocytes. Toutefois, ces techniques doivent être couplées à des analyses fonctionnelles et cytologiques pour valider les résultats et obtenir une vision complète des populations cellulaires identifiées.

Ainsi, dans la présente étude actuellement en revue dans eLife, nous avons cherché à élucider la diversité et le rôle des différents types d'hémocytes, chez *C. gigas*, dans l'exécution de fonctions immunitaires clés essentielles au contrôle des micro-organismes pathogènes, ainsi que proposer des marqueurs moléculaires et l'ontogénie des différents hémocytes.

Pour ce faire, nos objectifs ont été de :

- Caractériser au niveau transcriptomique les hémocytes par des approches de séquençage d'ARNm sur cellules uniques afin d'identifier différents clusters (ensembles de cellules possédant un profil transcriptomique similaire), ainsi que les marqueurs moléculaires

qui leur sont associés, les fonctions des gènes majoritairement surexprimés dans chaque cluster.

- Caractériser la diversité morphologique des hémocytes de *C. gigas* par des observations en microscopie photonique après coloration cytologique.
- Caractériser fonctionnellement les différents types hémocytaires identifiés par cytologie (phagocytose, production d'espèces réactives de l'oxygène, accumulation du cuivre et expression des peptides antimicrobiens (*Cg-Defh*, *Cg-BigDef* et *Cg-BPI*)).
- Associer les types cytologiques avec les clusters transcriptomiques par qPCR, à l'aide de marqueurs moléculaires définis à partir des données de scRNA-seq.
- Enfin, identifier les potentielles voies de différenciation entre les cellules séquencées par scRNA-Seq.

L'analyse transcriptomique de scRNA-Seq a été réalisée sur une seule huître adulte naïve. La technologie utilisée était une technique de microfluidique : Chromium de 10X Genomics (Drop-seq) sur hémocytes dissociés en milieu antiagrégant. Cette approche a été retenue pour sa capacité à analyser un grand nombre de cellules simultanément, ce qui est particulièrement adapté à l'étude de populations cellulaires faiblement représentées dans un pool hétérogène (Ziegenhain et al. 2017). Cette approche nous a permis d'identifier 7 clusters transcriptionnels. Chaque cluster a ensuite été annoté fonctionnellement (après ré-annotation complète du génome de *C. gigas*) par des analyses de voies métaboliques (KEGG) et l'analyse des termes d'ontologie génique (GO : gene ontology). Cette analyse nous a permis de définir des marqueurs moléculaires pour chacun des 7 clusters transcriptomiques.

Afin de confronter nos résultats de transcriptomiques à la réalité biologique nous avons cherché à définir la formule hémocytaire d'une huître naïve. Pour atteindre cela, des hémocytes ont été prélevés d'huîtres adultes exemptes de pathogènes afin d'obtenir un profil hémocytaire chez *C. gigas*. L'analyse cytologique a révélé sept types morphologiques d'hémocytes, classés en fonction de leur taille, de leur granulométrie, et leur coloration cytologique. Trois types non granuleux ont été mis en évidence : hyalinocytes (30 % des hémocytes), blastes basophiles (18 % des hémocytes) et blastes acidophiles (15 % des hémocytes), et quatre types granuleux : cellules à petits granules (12 % des hémocytes), cellules à grandes granules (4 % des hémocytes), cellules vésiculaires (2 % des hémocytes) et macrophage-like (19 % des hémocytes). Nous avons utilisé la méthode de tri cellulaires sur gradient de Percoll, nous permettant d'obtenir des fractions enrichies en différents types hémocytes pour établir une association entre clusters transcriptomiques et types cytologiques. Cette association a été recherchée par RT- qPCR, via des analyses de corrélation entre le profil d'expression des gènes

marqueurs issus des analyses scRNA-seq et la proportion des types hémocytaires dans les fractions correspondantes. Ces analyses nous ont permis de relier le cluster 2 aux hyalinocytes, le cluster 3 aux cellules à petits granules, et le cluster 7 aux cellules vésiculaires.

Afin de compléter cette association clusters transcriptomiques / types hémocytaires, nous avons examiné les fonctions de phagocytose, un mécanisme immunitaire largement partagé dans le règne animal et principalement impliqué dans l'élimination des agents pathogènes chez *C. gigas* (W. Wang et al. 2017b), ainsi que le burst oxydatif et l'expression de peptides antimicrobiens. Les macrophages-like et les cellules à petits granules ont été identifiés comme capables de phagocyter le zymosan et *Vibrio tasmaniensis* LMG20012t, mais seuls les macrophages-like ont montré une capacité à produire un burst oxydatif après stimulation par le zymosan. Ce burst est associé à l'activité de la NADPH-oxydase, particulièrement exprimée dans le cluster 1. L'expression des peptides antimicrobiens testés par qPCR (Cg-Defh, Cg-BigDef et Cg-BPI) a été associée aux cellules agranuleuses (hyalinocytes, blasts basophiles et acidophiles).

Comme décrit dans l'introduction générale les huîtres accumulent des métaux, notamment le cuivre, dans leurs tissus et leurs hémocytes. Pour déterminer quels hémocytes accumulent le cuivre, ces derniers sont mis en contact de rhodanine, un colorant se fixant sur le cuivre intracellulaire. Cette méthode a confirmé l'accumulation de cuivre dans certains hémocytes, avec une prédominance dans les cellules à petits et à gros granules. Enfin, nous avons complété l'analyse de scRNA-Seq initiale par une étude de trajectoire de différenciation. Dans ce but, l'algorithme Monocle3 a été utilisé pour reconstruire les lignées cellulaires et ordonner les cellules en fonction de leur pseudo-temps de différenciation, une échelle temporelle virtuelle modélisant ainsi les transitions cellulaires et les trajectoires de différenciation à partir des profils d'expression génique. Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence 4 voies principales de différenciation, dont une spécifique des hémocytes granuleux et d'identifier des facteurs de transcription marqueurs potentiels de voies de différenciation.

Publication 1

Diversity and functional specialization of oyster immune cells uncovered by integrative single cell level investigations

Sébastien de La Forest Divonne, Juliette Pouzadoux, Océane Romatif, Caroline Montagnani, Guillaume Mitta, Delphine Destoumieux-Garzon, Benjamin Gourbal, Guillaume M. Charrière, Emmanuel Vignal

Soumise pour publication dans Elife le 27/08/2024

Title

Diversity and functional specialization of oyster immune cells uncovered by integrative single cell level investigations

Authors

Sébastien de La Forest Divonne¹, Juliette Pouzadoux¹, Océane Romatif¹, Caroline Montagnani¹, Guillaume Mitta², Delphine Destoumieux-Garzon¹, Benjamin Gourbal³, Guillaume M. Charrière^{1#}, Emmanuel Vignal^{1#*}

Affiliations

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

² Ifremer, IRD, Institut Louis-Malardé, Univ Polynésie française, UMR 241 SECOPOL, 98179 Taravao, Tahiti - Polynésie française, France

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

EV and GC co-supervised the work.

corresponding author: emmanuel.vignal@umontpellier.fr

Abstract

Mollusks are a major component of animal biodiversity and play a critical role in ecosystems and global food security. The Pacific oyster, *Crassostrea (Magallana) gigas*, is the most farmed bivalve mollusk in the world and is becoming a model species for invertebrate, biology. Despite the extensive research on hemocytes, the immune cells of bivalves, their characterization remains elusive. Here we were able to extensively characterize the diverse hemocytes and identified at least seven functionally distinct cell types and three hematopoietic lineages. A combination of single-cell RNA sequencing, quantitative cytology, cell sorting, functional assays and pseudo-time analyses was used to deliver a comprehensive view of the distinct hemocyte types. This integrative analysis enabled us to reconcile molecular and cellular data and identify distinct cell types performing specialized immune functions, such as phagocytosis, reactive oxygen species production, copper accumulation, and expression of antimicrobial peptides. This study emphasized the need for more in depth studies of cellular immunity in mollusks and non-model invertebrates and set the ground for further comparative immunology studies at the cellular level.

Introduction

Mollusca is the second largest invertebrate phylum, after Arthropoda, and the largest marine phylum, comprising approximately 23 % of all known marine organisms (1). Among them, bivalves exhibit a high diversity and a rich evolutionary history (2). The Pacific oyster *Crassostrea (Magallana) gigas* (*C. gigas* - Thunberg, 1793) (NCBI:txid29159) is a sessile filter-feeding bivalve that thrives in a variety of stressful environments ranging from intertidal to deep-sea conditions (3). It is a key species for the aquaculture industry worldwide (4). Several infectious diseases affect *C. gigas* at different life stages, which impacts its production. Given the significant socio-economic value of this species, there has been an increased focus on understanding and mitigating these diseases (5). The causes of these mortalities can involve a variety of pathogens, including viruses, bacteria and parasites that can be responsible for the mortality events affecting *C. gigas* (6). One of the most extensively researched infectious diseases is POMS (Pacific Oyster Mortality Syndrome), a polymicrobial disease responsible for mass mortalities of juvenile oysters (7). The disease is triggered by the OsHV-1 μ Var herpesvirus, which alters the immune defenses of oysters, allowing the colonization of opportunistic bacteria, including *Vibrio*, that cause hemocyte lysis and bacteremia, ultimately leading to animal death (7). Other bacterial pathogens have also been identified as a contributing factor in mass mortalities of adult Pacific oysters in several countries. The most notable is *Vibrio aestuarianus* which affects adult oysters in Europe (8, 9). To date, the majority of oyster pathogens or opportunistic pathogens that have been characterized in detail have been found to subvert hemocyte defenses for their own benefit. These include the OsHV-1 μ Var herpesvirus (10) and virulent *Vibrio* strains of the species *Vibrio crassostreae* and *Vibrio tasmaniensis* (11), *Vibrio aestuarianus* and *Vibrio harveyi* (12), highlighting the critical role of hemocytes in oyster immunity. The development of immune-based prophylactic treatments, such as immune-priming and immune-shaping, represents a promising avenue for enhancing the natural defenses of oysters against pathogens and increasing their survival rate. Nevertheless, the advancement of such therapies is still constrained by a dearth of knowledge regarding the underlying molecular and cellular mechanisms (13, 14).

The study of hemocytes has a long history, dating back to the 1970s (for review see (15)). Hemocytes are cellular effectors of the immune system. They engage in phagocytosis to engulf and destroy potential pathogens, neutralizing parasites by encapsulation, or preventing pathogen dissemination by cell aggregation and the release of extracellular DNA traps (16). Furthermore, they engage in the humoral response by releasing cytokines, antimicrobial peptides, and reactive

oxygen species (ROS), which enable them to combat pathogens (17). In addition to their role in oyster immunity, hemocytes have been implicated in numerous physiological processes, including shell repair (18), wound healing, nutrient transport, and environmental contaminant removal (19). Despite this acquired knowledge, hemocytes remain an under-characterized population of circulating immune cells. The lack of a unified classification and of molecular and functional genetic tools hinders our understanding of lineage ontogeny and functional specialization. Several studies have proposed different classifications of hemocytes in the *Ostreidae* family, with 3 to 4 hemocyte types reported (15). These classifications are primarily based on either microscopic or flow cytometry analyses. In *C. gigas*, three primary hemocyte cell types have been classically identified : blast, hyalinocyte, and granulocyte cells. While the immune response of *C. gigas* has been extensively studied using classical transcriptomics at the whole animal, tissue, or circulating hemocyte levels, these approaches have failed to consider the diversity of hemocyte cell types and lineages that underpin these responses (20). However, it is still imperative to accurately describe the diversity of these cells, understand their ontogeny, and delineate cell lineages to comprehend their specific roles. The advent of single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) techniques has enabled the monitoring of global gene expression at the single-cell level with thousands of individual cells in a single experiment. This provides a unique opportunity to overcome these limitations and deepen our understanding of hemocyte diversity and function in bivalves. Recently scRNA-seq was used to provide a first molecular description of a hemocyte population in the oyster *Crassostrea hongkongensis* (21). However, in the absence of morphological and/or functional characterization studies, the authors could not deduce the hemocyte cell types to be matched to the transcriptomic profiles generated by scRNA-seq. While numerous transcriptomic analyses have been conducted on *C. gigas* hemocytes, none have adopted a single-cell approach. In this study, we present an integrative analysis of the diversity of *C. gigas* hemocytes at the single-cell level. To this end, we combined scRNA-seq from a pathogen-free adult oyster combined with cytological, cell fractionation and functional assays. This approach allowed us to create a comprehensive transcriptomic, cytological and functional atlas of hemocyte cell types. Our scRNA-seq analyses identified 7 distinct transcriptomic populations and functional annotation revealed distinct populations with specific functions, including phagocytosis, oxidative burst, energetic metabolism, enhanced transcription, translation and cell division. Quantitative cytology enabled the identification of 7 morphologically distinct hemocyte cell types, which allowed us to reconcile molecular and cytological data. Density gradients were used to separate hemocyte cell types and qPCR or functional assay analyses were performed to validate cell type-specific markers. By employing

this integrated approach, we could identify 1 type of hyalinocyte, 2 types of blasts and 4 types of granular cells. Furthermore, we identified cell types that perform antimicrobial functions through phagocytosis, ROS production, copper accumulation, and expression of antimicrobial peptides. Finally, trajectory analysis of scRNA-seq data combined with functional analysis revealed distinct differentiation pathways that may control hemocyte ontology and differentiation processes. Based on these findings, we propose a more comprehensive and up-to-date classification of *C. gigas* hemocytes, with a more accurate description of the different cell types, their potential ontology and a precise description of their sub-functionalization.

Results

Single-cell RNA sequencing reveals 7 distinct transcriptomic clusters of circulating immune cells in oysters.

Oysters are known to exhibit a high degree of individual genetic polymorphism, including Copy Number Variation (CNV) and Presence Absence Variation (PAV) (22). To prevent misinterpretation of the single-cell transcriptomic data, and to characterize the hemocyte cell types and their heterogeneity, we sampled hemocytes from a unique pathogen-free animal (Ifremer Standardized Animal, 18-month-old) and applied single-cell drop-seq technology to 3,000 single hemocytes (**Fig. 1A**). The scRNA-seq library was generated and sequenced, resulting in 127,959,215 high-quality filtered reads available for single-cell analysis (ENA project accession number PRJEB74031). Primary bioinformatics analysis was performed using the STAR solo aligner software (23) against the *C. gigas* genome (Genbank reference GCA_902806645.1) from the Roslin Institute (24). Of the 127,959,215 reads, 97 % showed a valid barcode and 89.2 % were successfully mapped to the genome with a saturation of 75.6 %. A total of 2,937 cells were profiled, yielding a median of 1,578 genes and 4,412 unique molecular identifiers (UMIs) per cell among the 23,841 total genes detected, with a sequencing saturation of 75.6 % (**Supp. Table 1**). Secondary bioinformatic data processing was conducted using the Seurat R package (version 4.3.0) (25). The data set was filtered to remove data corresponding to empty droplets or cell doublets. Cells with a gene number between 750 and 4,000 and less than 5 % mitochondrial genes were retained. After quality control processing, 120 cells corresponding to empty droplets and cell doublets were removed, and 2,817 cells were processed for data normalization. Finally, we performed linear dimensional reduction and clustering on the 3,000 most variable genes from 2,817 cells (**Supp. Fig. S1**). Dimension reduction and clustering led to identifying 7 transcriptomic clusters, within which hemocytes

were distributed. These 7 different clusters represented 27.6, 23.1, 17.8, 16.9, 7, 4.6 and 3 % of the total cells (**Fig. 1B**). For each transcriptomic cluster, a pattern of over- and under-represented transcripts in each cell was identified (**Fig. 1C**). Average Log2FC values and percentage of expression in each cluster relative to all other clusters were calculated for the ten most differentially expressed genes (**Fig. 1D and Table 1**). Clear transcriptomic cell clusters were detected as well as specific gene markers for each cluster (**Supp. Data 1**). Only the transcriptomic signature of cluster 4 was less contrasting than that of the other clusters (**Fig. 1D**).

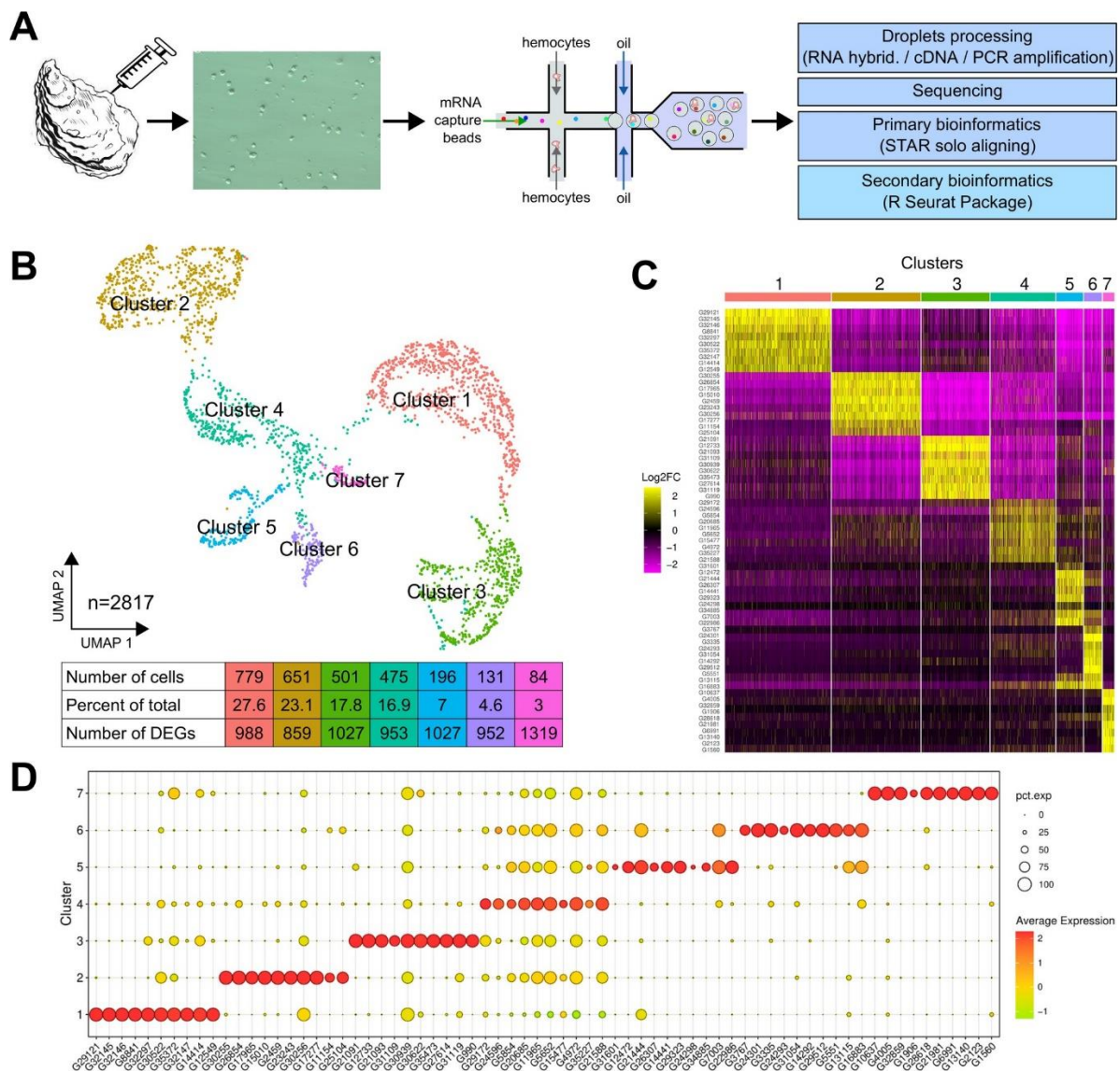


Fig. 1. scRNA-seq analysis of *C. gigas* circulating hemocytes reveals 7 transcriptomic cell clusters. (A) Schematic of the scRNA-seq 10X Genomics Chromium microfluidic technology and bioinformatics processing workflow used. Dissociated hemocytes were collected from a pathogen-free oyster and encapsulated in droplets for processing. After sequencing, the data

were processed bioinformatically. **(B)** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plot for dimensional reduction of the data set and summary of cells and the number of Differentially Expressed Genes (DEGs) in each cluster. The table shows the characteristics (number of cells, percentage of total cells and number of Differentially Expressed Genes in each cluster) of the seven clusters identified. **(C)** Heatmap showing the top 10 overexpressed genes in each cell per cluster as determined by FindAllMarkers() function in Seurat, corresponding to clusters in UMAP plots from Fig. 1B, ranked by log₂FC. **(D)** Dot plot representing the ten most enriched DEGs per cluster based on average expression (avg_log₂FC). The color gradient of the dot represents the expression level, while the size represents the percentage of cells expressing each gene per cluster.

Gene	log ₂ FC	Pct 1	Pct 2	Description	Cluster
Cluster 1					
G29121	4.31	1	0.099	L-galactono-gamma-lactone oxidase	
G32145	4.18	0.992	0.079	Angiotensin-1 receptor	
G32146	3.90	0.985	0.063	Angiotensin-1 receptor	
G8841	3.13	0.988	0.049	C-type lectin domain-containing protein	
G32297	2.88	0.99	0.232	PNPLA domain-containing protein	
G30522	2.76	1	0.516	Cytochrome P450 2D28	
G35372	2.69	1	0.483	60S ribosomal protein L26	
G32147	2.45	0.969	0.131	Angiotensin-1 receptor	
G14414	2.45	1	0.343	DUF4773 domain-containing protein	
G12549	2.38	0.974	0.132	Glutaredoxin domain-containing protein	
Cluster 2					
G30255	5.31	1	0.15	Metalloproteinase inhibitor 3	
G26854	4.24	1	0.16	Stanniocalcin	
G17965	4.21	0.94	0.04	Complement C1q-like protein 2	
G15010	3.99	0.99	0.17	Kyphoscoliosis peptidase	
G2459	3.82	1	0.21	Uncharacterized protein	
G23243	3.51	0.98	0.07	Fibronectin type-III domain-containing protein	
G30256	3.23	1	0.69	NTR domain-containing protein	
G17277	3.21	0.99	0.04	Putative modulator of levamisole receptor-1	
G11154	3.16	0.68	0.05	Collagen alpha-1(XII) chain	
G25104	3.1	0.84	0.08	C1q domain-containing protein	
Cluster 3					
G21091	5.51	0.99	0.13	X-box binding protein-like protein	
G12733	5.42	1	0.12	Galectin	
G21093	5.17	0.94	0.05	IoIG	
G31109	4.36	0.77	0.03	Cystatin domain-containing protein	
G30939	4.25	1	0.86	Peptide ABC transporter permease	
G30622	3.95	1	0.21	BHLH domain-containing protein	
G35473	3.86	0.96	0.04	Uncharacterized protein	
G27614	3.78	0.96	0.13	G Protein Receptor F1-2 domain-containing protein	
G31119	3.77	0.99	0.42	Arrestin C domain-containing protein	
G990	3.6	0.93	0.03	LITAF domain-containing protein	
Cluster 4					
G29172	3.09	0.78	0.49	G Protein Receptor F1-2 domain-containing protein	
G24596	2.37	0.78	0.25	High mobility group protein DSP1	
G5854	1.9	0.64	0.38	N-acetyltransferase domain-containing protein	
G20685	1.59	0.88	0.53	Ribosomal protein L22	
G11965	1.57	0.92	0.7	Ribosome L4 associated C domain-containing protein	
G5652	1.54	0.97	0.75	60S ribosomal protein L30	
G15477	1.52	0.55	0.3	Metalloendopeptidase	
G4972	1.49	0.96	0.8	60S ribosomal protein L12	
G35227	1.46	0.55	0.06	ML domain-containing protein	
G21588	1.42	0.94	0.69	60S ribosomal protein L13	
Cluster 5					
G31601	5.24	0.38	0.06	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	
G12472	3.99	0.85	0.03	Galectin	
G21444	3.58	1	0.41	Uncharacterized protein	
G26307	3.42	0.6	0.02	Uncharacterized protein	
G14441	3.35	0.84	0.08	CUBN	
G29323	3.21	0.9	0.01	GTPase IMAP family member 4	
G24298	3.18	0.29	0.05	Putative Transmembrane protease serine 9	
G34885	3.13	0.59	0.01	Gliding motility-associated C-terminal domain-containing protein	
G7003	2.55	0.99	0.16	ETS-related transcription factor Eif-4	
G22986	2.37	0.94	0.1	Metalloendopeptidase	
Cluster 6					
G3767	6.45	0.74	0.02	Natterin-1	
G24301	6.16	0.99	0.02	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	
G3335	5.19	1	0.16	ncRNA	
G24293	4.57	0.59	0.01	Uncharacterized protein	
G31054	3.56	1	0.13	GATA-binding factor 3	
G14292	3.29	0.87	0.03	Membrane-associated guanylate kinase inverted 3	
G29512	3.2	0.99	0	Caveolin	
G5551	2.93	0.97	0.02	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6	
G13115	2.73	0.83	0.26	ncRNA	
G16883	2.62	1	0.2	Allograft inflammatory factor	
Cluster 7					
G10637	4.21	0.99	0.03	BZIP domain-containing protein	
G4005	4.07	0.99	0.21	Ras-related protein Rab-20	
G32859	3.9	0.93	0.04	G Protein Receptor F1-2 domain-containing protein	
G1906	3.82	0.5	0.02	Glutathione peroxidase	
G28618	3.53	0.91	0.09	Sporozoite and liver stage asparagine-rich protein	
G21981	3.5	0.94	0.05	ncRNA	
G6991	3.4	0.85	0.01	Rho-GAP domain-containing protein	
G13140	3.12	1	0.03	DBH-like monooxygenase protein 1	
G2123	3.05	0.94	0.02	SPRY domain-containing SOCS box protein 3	
G1560	3.02	0.95	0.17	Glutathione peroxidase	

Table 1. Top 10 overexpressed genes identified in each transcriptomic cluster. The first column indicates the gene number according to the annotation. ‘log₂FC’ represents the log₂ fold change of the gene in the cluster compared to all other cells. ‘Pct1’ is the percentage of cells expressing the gene in the cluster and ‘Pct2’ is the fraction of cells expressing the gene in all other clusters. The description is the annotation of the expressed gene.

KEGG pathways and GO-terms analyses reveal functional diversity in *C. gigas* hemocytes.

The ScRNA-seq data demonstrated that specific functions are carried out by the hemocyte cell types that comprise the seven transcriptomic clusters. A preliminary overview of the functions over-represented in each cluster was obtained through a KEGG pathway analysis on the overrepresented transcripts ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.25$) using the *C. gigas* annotation provided by the DAVID consortium (26), thereby identifying pathways specifically enriched in each cluster. Cluster 1 demonstrated enrichment in viral processing and endocytosis (**Figure 2A and Supplemental Table S2**). Additionally, it demonstrated enrichment in pyruvate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis and the pentose phosphate pathways. Clusters 1 and 3 exhibited a distinctive enrichment in carbohydrate metabolism and endocytosis. In particular, cluster 3 exhibited enriched transcripts associated with glycolysis/gluconeogenesis and TCA cycle activities. Cluster 4 was enriched in protein synthesis, including transcription (spliceosome, ribosome, nucleocytoplasmic transport and mRNA surveillance pathway) folding, sorting and degradation of protein pathways. Clusters 2, 5 and 6 exhibited a shared signature of enrichment in ribosome-related genes. Cluster 2 demonstrated a specific enrichment in motor protein-coding genes responsible for cell motility and xenobiotic metabolism. Remarkably, clusters 1, 3, 4 and 5 exhibited enriched oxidative phosphorylation transcripts, whereas the transcripts of cluster 7 were enriched in vesicular trafficking and endo-lysosomal pathways (endocytosis, endosome, phagosome, lysosome, auto and mitophagy).

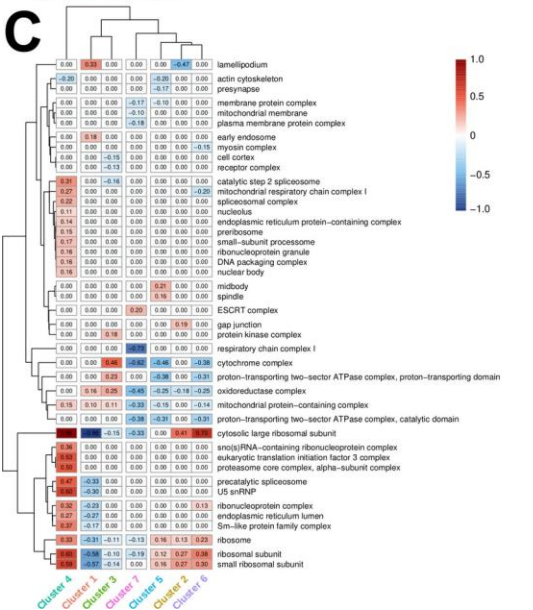
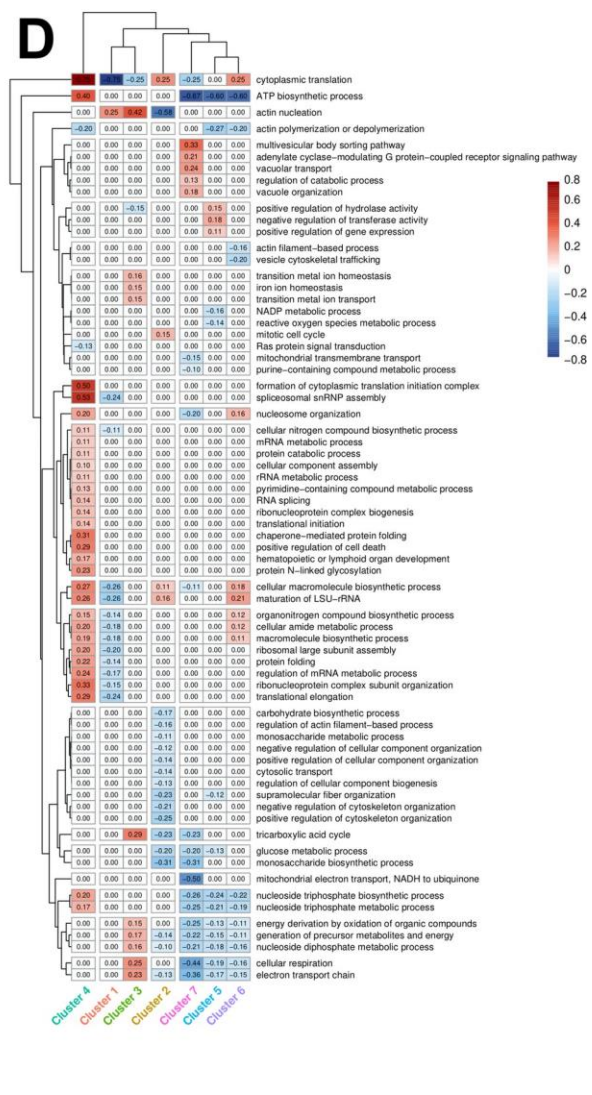
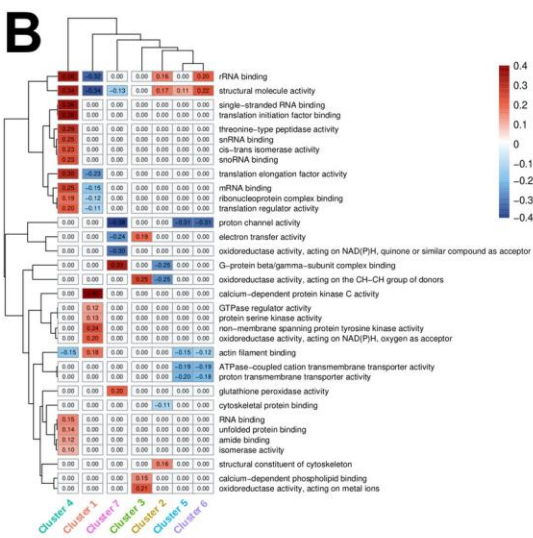
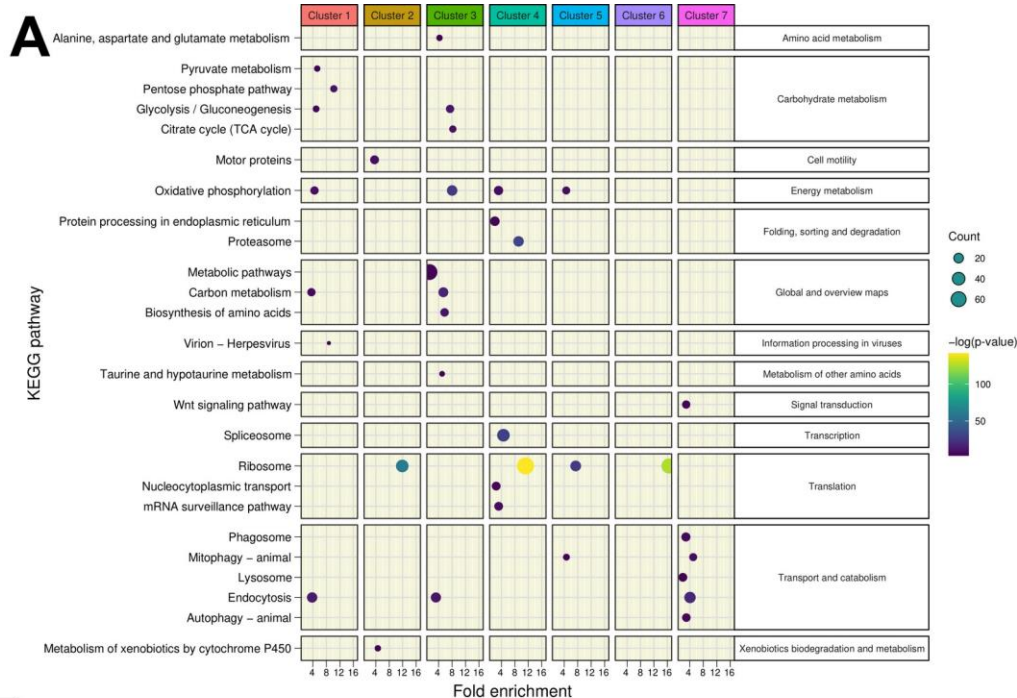


Fig. 2. KEGG and Gene Ontology analysis of the gene signature in each cluster. (A) A synthetic representation of the KEGG pathway analysis is shown. Colored columns represent the 7 transcriptomic clusters. Each row is a KEGG pathway, the colored dot represents the $-\log(p\text{-value})$ and the dot size represents the number (count) of enriched genes in each pathway category. The fold enrichment is shown on the x-axis. Panels (B), (C) and (D) show the results of Gene Ontology terms (GO-terms) for Biological Processes (BP), Cellular Components (CC) and Molecular Functions (MF) respectively, obtained with the overexpressed genes of each cluster (Absolute value $\text{Log}_2\text{FC} > 0.25$ and significant $p\text{-value} < 0.001$) using RBGOA analysis ($p\text{-value} \leq 0.001$) for three different ontology universes. Each panel corresponds to one ontology universe, and the analysis highlights over- and under-enriched terms. The number in the heatmap and the scale indicate the proportion of significant positive GO-terms. Positive values indicate over-enrichment and negative values indicate under-enrichment of the respective BP, CC and MF ontologies.

For a more detailed functional characterization of each transcriptomic cluster, we performed a re-annotation of the *C. gigas* genome using a combination of tools to enhance the GO term richness of the existing annotation prior to functional GO term analysis. To this end, we used the *C. gigas* genome (Genbank reference GCA_902806645.1) and the associated gff3 annotation file from the Roslin Institute (24). These files were used to extract and process the longest CDSs for GO-term annotation using the Orson pipeline (see Materials and Methods). Of the 30,724 extracted CDSs, 22,462 were annotated (GO-terms and sequence description), yielding an annotation percentage of 73.1 %. Of the 30,724 CDSs, 22,391 were annotated with Molecular Functions (MF), Biological Processes (BP), and Cellular Components (CC) GO-terms (Supp. Fig. S2 and Supp. Data 2). Using the GO-term annotation and the Log_2FC of genes calculated after scRNA-seq processing in each cluster, GO enrichment analysis was performed by rank-based gene ontology analysis (RBGOA) (27). RBGOA analysis was performed on the GO-terms identified in each cluster (Supp. Data 3). The results are presented in Figures 2B, C and D.

The scRNA-seq-based analysis identified seven distinct transcriptomic profiles for each cell cluster, thereby shedding light on greater heterogeneity and functional diversity of *C. gigas* hemocytes than previously described. Cluster 1, comprising 27.6 % of cells, is characterized by its morphology and capacity to remodel actin cytoskeleton, as well as oxidoreductase activity. This is evidenced by an enrichment in oxidoreductase activity acting on NAD(P)H and kinase activities BP, actin nucleation MF and lamellipodium and early endosomes CC. Cluster 2,

comprising 23.1 % of cells, has an increased translation activity, as indicated by enrichment in BP, MF and CC terms related to rRNA binding, cytoplasmic translation, maturation of LSU-rRNA, and ribosomes respectively. Cluster 3, representing 17.8 % of cells, shows enrichment in cellular oxidation and actin nucleation, as evidenced by an enrichment in BP and MF related to oxidoreductase activities acting on metal ions, electron transfer, cellular oxidation and actin nucleation, and CC related to cytochromes, oxidoreductase complex, and mitochondrial protein-containing complexes. Cluster 4, representing 16.9 % of cells, has transcriptomic signatures reminiscent of spliceosome assembly, rRNA maturation, and ATP biosynthesis (BP related to RNA binding, translation, and proteasome, MF related to spliceosome assembly, rRNA maturation, and ATP biosynthesis, and CC related to nuclear bodies and ribosomes). Cluster 5, comprising 7 % of cells, demonstrates enrichment in structural molecule activity, hydrolase regulation, and gene expression, as evidenced by its BP, F, and CC related to ribosome, midbody, and spindle localization. Cluster 6, comprising 4.6 % of cells, is characterized by a specific nucleosome organization, translation, and biosynthetic processes, with related BP, MF, and CC tied to ribosomes, ribonucleoprotein complex and rRNA binding. Cluster 7, representing a mere 3 % of cells, is characterized by multivesicular body sorting, vacuolar transport, vacuole organization, and G protein-coupled receptor signaling, with related BP, MF, and CC of the ESCRT machinery.

Seven morphologically distinct immune cell types are identified by quantitative cytology and transcriptomic markers.

Cytological studies were conducted using MCDH staining to better characterize the diversity of circulating hemocytes in *C. gigas*. Seven distinct hemocyte morphotypes were identified: 3 non-granular (acidophilic blasts, basophilic blasts and hyalinocytes) and 4 granular (small granule cells, big granule cells, vesicular cells and macrophage-like) (**Fig. 3 and Supp. Fig. S3**). Hyalinocytes (30 % of total hemocytes) are large cells with an irregular spreading membrane. They contain an azurophilic cytoplasm without granulations and their irregular nucleus varies in size (**Fig. 3A panel H**). Macrophage-like cells (19 % of the hemocytes) present an irregular membrane punctuated by rare pseudopodia with a polylobed nucleus and a basophilic cytoplasm where polychromatic inclusions of various sizes could be observed (**Fig 3A. panel ML**). Basophilic blasts characterized by a basophil cytoplasm (**Fig. 3A panel BBL**) and acidophilic blasts with acidophil cytoplasm (**Fig. 3A panel ABL**) accounted for 18 % and 15 %, respectively, of the total hemocytes. They are rounded cells without granulation, with a uniform

and regular dense nucleus and a high nucleo-cytoplasmic ratio. Small granule cells (12 % of total hemocytes) have an irregular membrane punctuated by rare pseudopodia, an acidophilic cytoplasm, and numerous homogeneous purple granules (**Fig. 3A panel SGC**). Big granule cells (4 % of total hemocytes) are rounded cells with a basophilic cytoplasm containing large, slightly dark purple to black vesicles of heterogeneous size (**Fig. 3A panel BGC**). Vesicular cells (2 % of total hemocytes) are rounded cells with acidophilic cytoplasm, rich in homogeneous transparent and fluorescent to UV light vesicles with an irregular nucleus (**Fig. 3A panel VC**). Only blasts (BBL, ABL) have a nucleo-cytoplasmic ratio less than 1, whereas the other hemocytes described have a nucleo-cytoplasmic ratio greater than 1. To gain further insight into the functional characterization of these diverse hemocyte morphotypes and to associate them with the transcriptomic clusters identified in the scRNA-seq, we enhanced an existing hemocyte fractionation approach using an isopycnic Percoll density gradient to sort the hemocytes (28). Cell sorting was performed using a discontinuous Percoll gradient with densities ranging from 1.0647 to 1.1049. Seven distinct density fractions were established (**Fig. 3B**) and the hemocyte composition was then characterized by cytological analysis of each fraction (**Fig. 3A**; see also **Supp. Fig. S4** for statistical significance). The uneven distribution of hemocyte morphotypes along the density gradient enabled a relative separation of the different cell populations (**Supp. Fig S4**). In summary, hyalinocytes were significantly enriched in the first fraction, while macrophage-like cells were significantly enriched in fraction 3 and fraction 4. Acidophilic blasts were significantly enriched in fraction 2. Basophilic blasts were significantly enriched in fractions 2 and 3. Vesicular cells were enriched in fraction 5, big granule cells were enriched in fraction 4 and small granule cells in fractions 6 and 7 (**Fig. 3C and Supp. Fig. S4**).

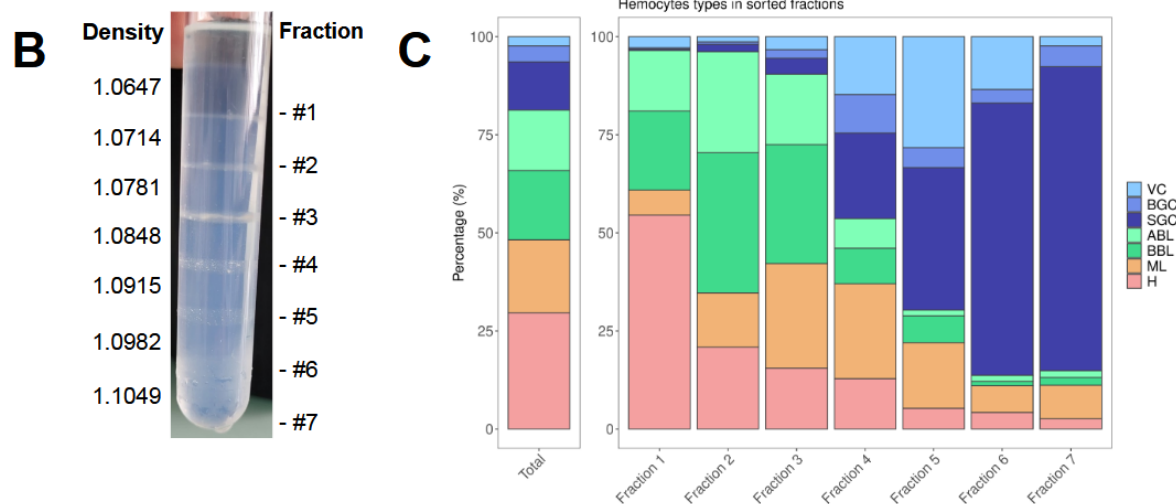
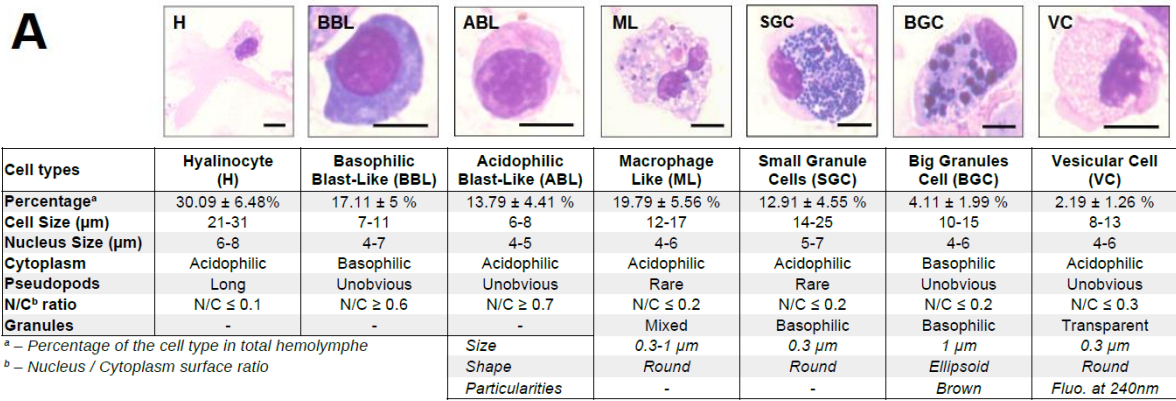


Fig 3. *C. gigas* naive hemocyte formula and Percoll gradient hemolymph fractionation (A) Morphology, percentages and characteristics of the 7 cell types identified by MCDH staining. **H** : Hyalinocyte, **ML** : Macrophage Like, **BBL** : Basophilic Blast Like cell, **ABL** : Acidophilic Blast Like cell, **SGC** : Small Granule Cell, **BGC** : Big Granule Cell, **VC** : Vesicular Cell. Scale bar : 5 µm. Hyalinocytes (54 %) and blast cells (ABL & BBL) (35 %) were predominant in the first fraction. The second fraction showed an increase in blasts (ABL 26 %, BBL 36 %) and a decrease in hyalinocytes (21 %). Fraction 3 had a mixed content with a decrease in hyalinocytes and blasts (15 %), and a majority of blasts and macrophage-like cells. Fraction 4 had an increase in granular cells (SGC 22 %, BGC 10 %, VC 15 %) and a decrease in blasts (ABL 8 %, BBL 9 %). Fraction 5 showed an increase in small granule cells (36 %) and vesicular cells (28 %), and a decrease in big granule cells (5%). Fraction 6 had fewer hyalinocytes, macrophage-like cells, and blast cells compared to small granule cells and vesicular cells. The last fraction consisted mainly of small granule cells (81 %). **(B)** Sorting of hemocytes on a discontinuous Percoll gradient. 7 fractions were identified along the gradient at the top of each density cushion (from d=1.0647 at #1 to d= 1.1049 at #7). **(C)** Representation of the average values (from 5

different fractionation experiments) of the different hemocyte types in the seven percoll gradient fractions compared to the average hemolymph composition of a naive oyster (Total). **VC** : Vesicular Cells, **BGC** : Big Granule Cells, **SGC** : Small Granule Cells, **ABL** : Acidophilic Blast Like cells, **BBL** : Basophilic Blast Like cells, **ML** : Macrophage Like cells and **H** : Hyalinocytes respectively. (Supp. Fig. S4 for statistics).

To identify the transcriptomic cell clusters corresponding to the different hemocyte morphotypes, we used RT-qPCR to detect the expression of different cluster-specific marker genes in the different hemocytes in the Percoll density fractions. The marker genes were selected without any a priori assumptions based solely on their expression levels (Log2FC) and their percentage of expression (Pct1 / Pct2 ratio) in the cluster of interest relative to all other cell clusters (**Table 2**). The expression level of each marker in the seven different clusters confirmed that the 14 selected marker genes were differentially expressed in each scRNA-seq transcriptomic cluster (**Supp. Fig. S5**).

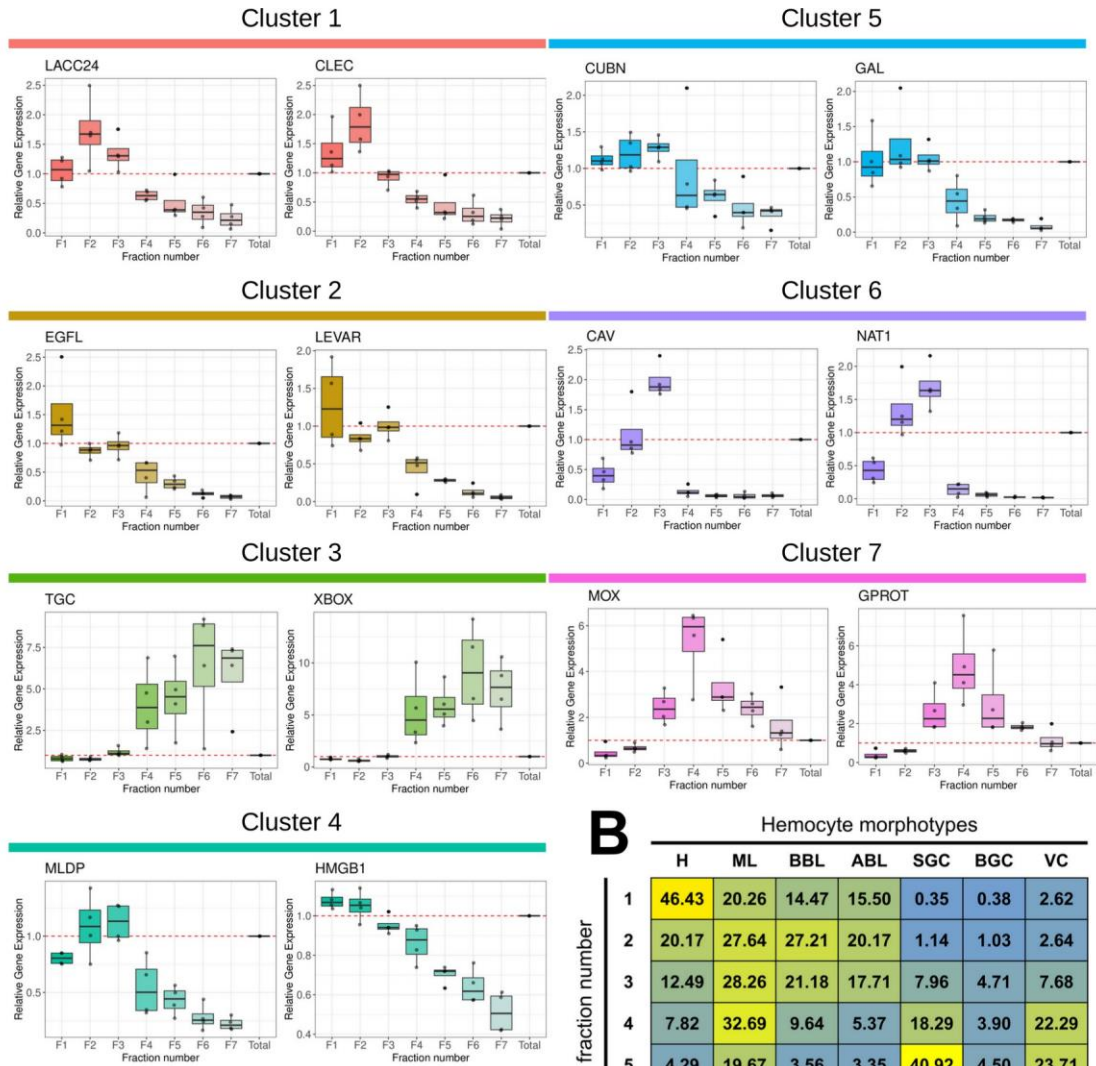
Gene Number	Avg. Log2FC	Pct.1/Pct.2 Ratio	Cluster	Description	Marker Name
G8994	2.05	38.20	1	Laccase-24	LACC24
G8841	3.13	20.16		C-type lectin domain-containing protein	CLEC
G24846	2.31	31.52	2	EGF-like domain-containing protein 8	EGFL
G17277	3.21	23.00		Putative modulator of levamisole receptor-1	LEVAR
G22387	3.16	16.76	3	TGc domain-containing protein	TGC
G21091	5.51	7.69		X-box binding protein-like protein	XBOX
G35227	1.46	9.98	4	ML domain-containing protein	MLDP
G31074	0.94	6.51		High mobility group protein B1	HMGB1
G14441	3.35	11.01	5	Cubilin	CUBN
G12472	3.99	24.91		Galectin	GAL
G29512	3.20	246.25	6	Caveolin	CAV
G3767	6.45	41.11		Natterin-1	NAT1
G13140	3.12	40.00	7	DBH-like monooxygenase protein 1	MOX
G32859	3.90	23.82		G protein receptor F1-2 domain-containing protein	GPROT

Table 2. Table of the 14 marker genes specific to the different transcriptomic clusters. Gene number, average Log2FC, pct1/pct2 ratio (percentage of cells expressing this transcript in the cluster divided by the percentage of all other cells expressing this transcript) and cluster number are reported. The description is taken from our annotation and the marker name is derived from the description.

RT-qPCR expression profiles in the hemocyte fractions obtained from the Percoll density gradient revealed distinct patterns according to the different transcriptomic cluster marker genes (**Fig. 4A**). Cluster 1 markers (LACC24 and CLEC) were overexpressed in fractions 1, 3 and underexpressed in the remaining fractions relative to total hemocytes. Cluster 2 markers (EGFL

and LEVAR) showed a decreasing pattern of expression from fraction 1 to fraction 7. Cluster 3 markers (TGC and XBOX) showed a significant increase in expression in fractions 4 to 7. Cluster 4 markers (MLDP and HMGB1) showed a gradually decreasing expression pattern from fraction 2 to fraction 7. Cluster 5 marker genes (GAL and CUBN) were underexpressed in fractions 4 to 7, but not differentially expressed in fractions 1 to 3 compared to total hemocytes. Cluster 6 marker genes (CAV and NAT1) were overexpressed in fraction 3, expressed similarly to total hemocytes in fraction 2, and underexpressed in fractions 1, and 4 to 7. Finally, cluster 7 marker genes (MOX and GPROT) were overexpressed only in fractions 3 to 7. Correlation analysis and statistical validation demonstrated a clear association between hemocyte morphotypes and 14 gene markers (**Fig. 4B, Fig. 4C and Supp. Table S4**). Cluster 3 marker genes (TGC and XBOX) correlated positively ($r = 0.74$ & 0.75) and specifically with small granule cells (SGC). Cluster 7 markers (MOX and GPROT) correlated ($r = 0.68$ and $r = 0.56$) with vesicular cells (VC). Cluster 2 markers (EGFL and LEVAR) correlated positively with hyalinocytes (H) ($r=0.85$ and $r=0.81$). No specific markers could be identified for blasts and macrophage-like cells.

A



B

Hemocyte morphotypes

	H	ML	BBL	ABL	SGC	BGC	VC
1	46.43	20.26	14.47	15.50	0.35	0.38	2.62
2	20.17	27.64	27.21	20.17	1.14	1.03	2.64
3	12.49	28.26	21.18	17.71	7.96	4.71	7.68
4	7.82	32.69	9.64	5.37	18.29	3.90	22.29
5	4.29	19.67	3.56	3.35	40.92	4.50	23.71
6	3.57	13.95	1.19	1.54	68.00	1.69	10.06
7	2.43	8.50	1.67	0.36	81.18	2.68	3.18

C

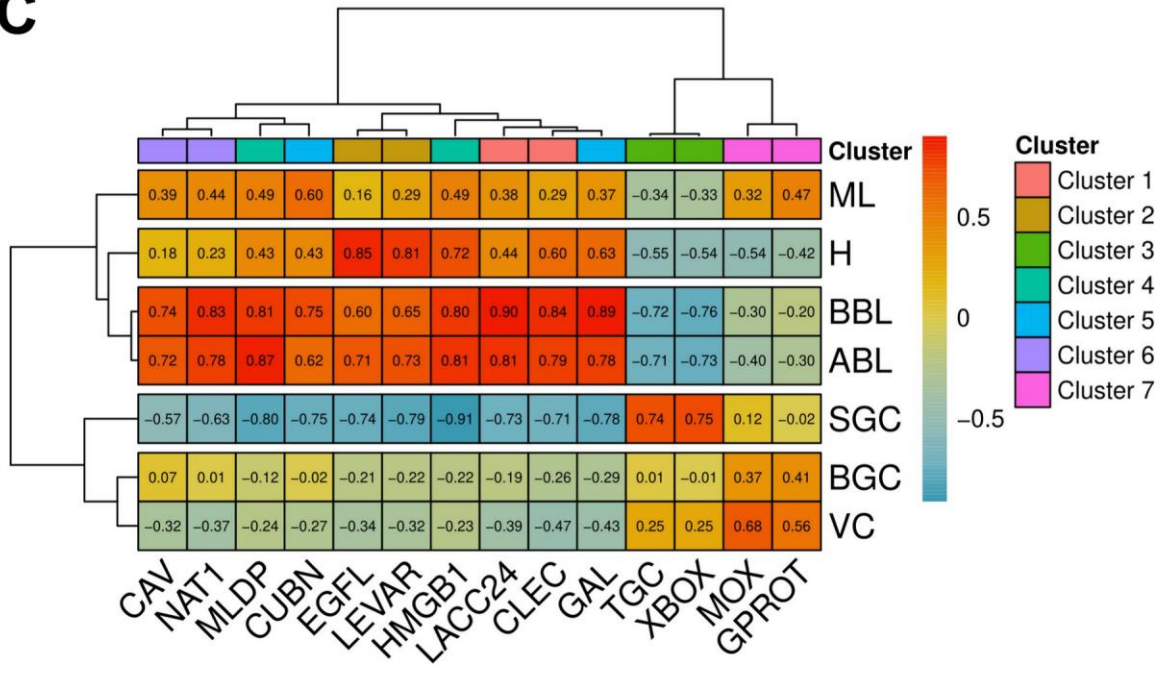


Fig 4. Characterization of molecular markers specific to the different hemocyte morphotypes. (A) Relative expression level of the 14 markers in the various fractions after gradient density sorting. The graphs show the relative expression of genes compared to their expression in total hemocytes in the various fractions (red dotted line). Standard deviations were calculated based on four independent experiments. (B) Average percentage of each hemocyte type in the 7 Percoll gradient fractions used to quantify marker gene expression by qPCR. (C) Correlation matrix between the relative gene expression of each marker gene in each fraction and the percentage of each hemocyte type in the same fractions. Values and color scale represent the Pearson correlation coefficient (r) ranging from -1 (inverse correlation) to +1 (full correlation). **H** : Hyalinocyte, **ML** : Macrophage Like, **BBL** : Basophilic Blast Like cell, **ABL** : Acidophilic Blast Like cell, **SGC** : Small Granule Cell, **BGC** : Big Granule Cell, **VC** : Vesicular Cell. **LACC24** : Laccase 24, **CLEC** : C-type lectin domain-containing protein, **EGFL** : EGF-like domain-containing protein 8, **LEVAR** : Putative regulator of levamisole receptor-1, **TGC** : TGC domain-containing protein, **XBOX** : X-box binding protein-like protein, **MLDP** : ML domain containing protein, **HMGB1** : High mobility group protein B1, **CUBN** : Cubilin, **GAL** : Galectin, **CAV** : Caveolin, **NAT1** : Natterin-1, **MOX** : DBH-like monooxygenase protein 1, **GPROT** : G protein receptor F1-2 domain-containing protein.

By employing RT-qPCR, cell sorting on Percoll gradients, and scRNA-seq analysis, we could identify cell types corresponding to three transcriptomic clusters. Cluster 3 corresponds to small granule cells (SGC), cluster 2 to hyalinocytes (H), and cluster 7 to vesicular cells (VC). Cluster 3, cluster 2 and cluster 7 represent 17.8 %, 23 % and 3 % of the total cells analyzed by scRNA-seq, respectively. This is consistent with cytological data, which indicated the presence of 12.5 % +/- 5 % Small Granule Cells, 30 % +/- 9.3 % Hyalinocytes and 2.3 % +/- 1.6 % Vesicular Cells (**Fig. 1B and Fig. 3A**). Furthermore, the molecular and cellular functions derived from GO-term and KEGG analyses (**Fig. 2**) were in alignment with the anticipated functions for these three cell types.

Only macrophage-like and small granule cells behave as professional phagocytes.

The hemocytes separated on the Percoll gradient were characterized functionally to gain further insight into their functional specialization. Two hemocyte functions, namely phagocytosis and production of Reactive Oxygen Species (ROS), are known to carry out major cellular antimicrobial activities. Granular cells have been suggested to be the professional phagocytes

specialized for these functions (29). Phagocytosis and oxidative burst were studied using cell response toward zymosan particles (30).

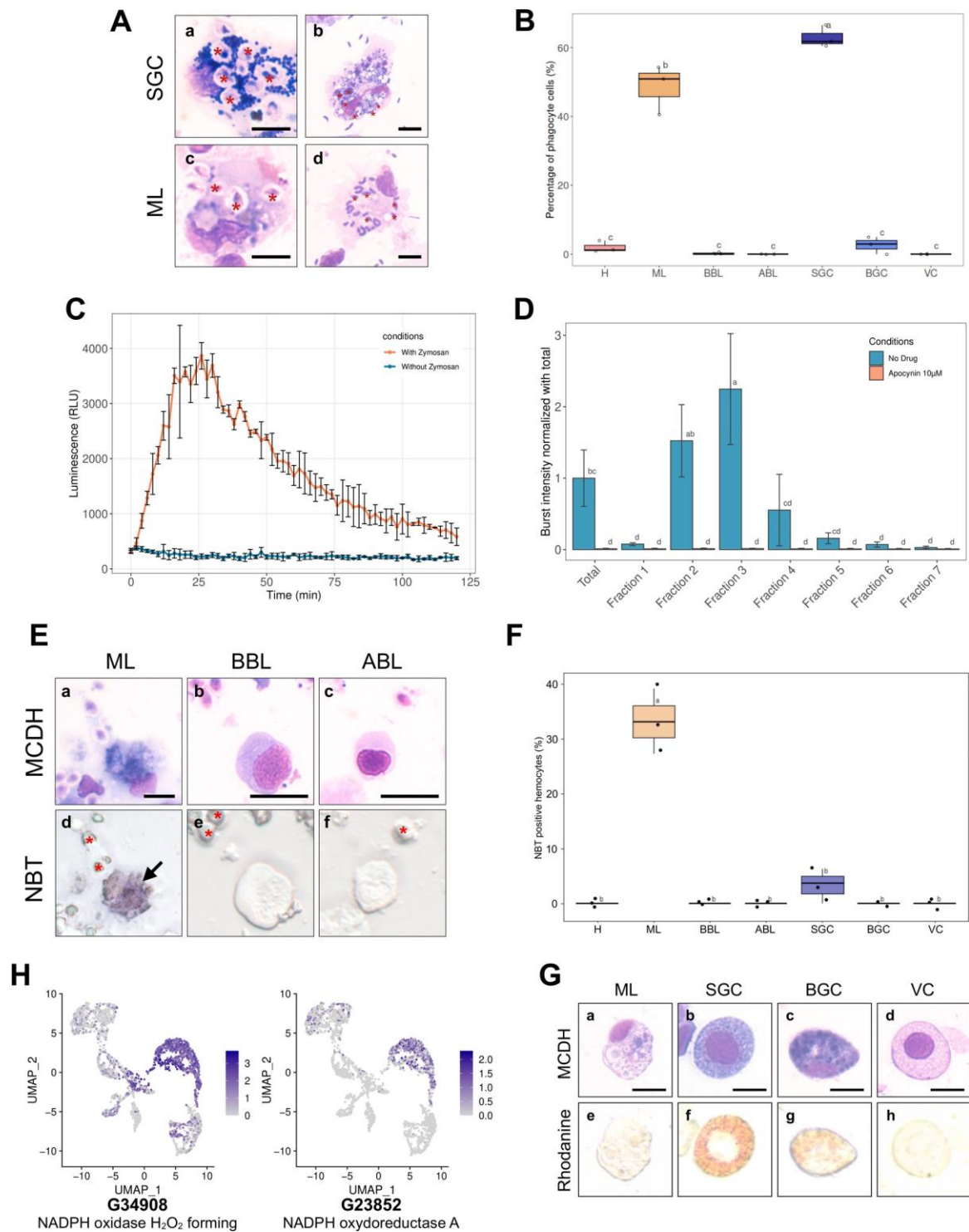


Fig 5. Phagocytosis, Reactive Oxygen Species production capacity and copper storage of hemocytes. (A) Images of small granule cells (SGC) and macrophage-like (ML) cells with phagocytosed zymosan particles (panels a & c - red stars) and *Vibrio tasmaniensis* LMG20012^T bacteria (panels b & d - red stars) from whole hemolymph sample. Scale bar : 5 μm . (B) Quantification of the phagocytic activity of zymosan particles by each cell type. The graph shows the result of 3 independent experiments. (C) Luminescence recording to detect the production of Reactive Oxygen Species (ROS). In orange, a biphasic curve was obtained on naive oyster hemolymph after zymosan addition at $t = 0$ min. In blue, the control condition corresponds to hemocytes without zymosan addition. (D) Graph showing the intensity of ROS production in each Percoll fraction. Normalized burst intensity was calculated from the luminescence peak obtained from each fraction. In blue, no drug was added to the experiment, in orange, ROS production was impaired by the addition of apocynin. (E) NBT (NitroBlueTetrazolium) staining of hemocytes exposed to zymosan particles. Hemocytes morphology after MCDH staining: Macrophage Like (a), Basophilic (b) and Acidophilic (c) Blast cells. NBT staining of the different types of hemocytes (d-f). Red stars show zymosan and bacteria particles. Black arrows indicate Macrophage-Like cells. Scale bar : 10 μm (F) Quantification of NBT-positive cells present in the total hemolymph of oysters exposed to zymosan. (H) UMAP plots showing cells expressing NADPH oxidase found in the scRNA-seq dataset and their expression level. (G) Labeling of intracellular copper stores in *C.gigas* hemocytes. MCDH (upper panels) and rhodanine (lower panels) staining of oyster hemocytes to reveal copper accumulation. Scale bar : 10 μm . For panels (B), (D) and (F) the alphabetic characters displayed above the data points in each plot represent statistically significant differences among the groups, as determined by Tukey's test following ANOVA. Groups denoted by different letters differ significantly at the $p < 0.05$ level of statistical significance. **H** : Hyalinocytes, **ABL** : Acidophilic Blast-Like cells, **BBL** : Basophilic Blast-Like cells, **ML** : Macrophage-Like cells, **SGC** : Small Granule Cells, **VC** : Vesicular Cells and **BGC** : Big Granule Cells.

The phagocytic activity of hemocytes was first tested on a sample of total oyster hemolymph. Cells were incubated for 1 hour with either zymosan particles or the bacterial strain *Vibrio tasmaniensis* LMG20012^T. Only the small granule cells and the macrophage-like cells exhibited efficient phagocytosis for both zymosan or vibrios, as observed after MCDH staining (Fig. 5A, Supp. Fig. 6 and Supp. Fig. 7A). Macrophage-like cells and small granule cells showed a

phagocytic activity of 49 % and 55 %, respectively, and a phagocytosis index of 3.5 and 5.2 particles per cell respectively (**Fig. 5B and Supp. Fig. 7B**), as confirmed in 3 independent experiments. Very limited phagocytic activity was observed for hyalinocytes (1.7%), basophilic blasts (0.18 %), and big granule cells (2.7 %) with a phagocytosis index of 2, 1 and 2.5 particles per cell, respectively (**Fig. 5B and Supp. Fig. 7B**). These results confirmed that only small granule cells and macrophage-like cells behave as professional phagocytes demonstrating robust phagocytic activity.

Only macrophage-like cells produce Reactive Oxygen Species.

The next step was to assess the capacity of *C. gigas* hemocytes in each Percoll fraction to produce Reactive Oxygen Species (ROS) upon stimulation by zymosan, utilizing the Luminol oxidation assay. Luminol luminescence peaked 25 minutes after exposure of hemocytes (isolated from total hemolymph) to zymosan, indicating a robust oxidative burst (**Fig. 5C**). The production of ROS was dependent on a NADPH oxidase, as it was completely inhibited by the NADPH oxidase-specific inhibitor apocynin (**Fig. 5C**). To ascertain which hemocyte types were involved in ROS production we tested Percoll density-sorted hemocytes for oxidative burst activity. Fractions 2 and 3 displayed higher oxidative burst activity than the other fractions. The burst intensity of fraction 3 was twice that of total hemocytes, and fraction 2 also exhibited significantly increased burst activity. In contrast, fraction 4 showed a significant decrease in oxidative burst, and no activity was observed for fractions 1, 6 and 7 (**Fig. 5D**). These results indicate that NADPH-dependent oxidative burst activity is carried out by fractions enriched in macrophage-like (ML) cells and blast-like cells (ABL and BBL). Previous studies have shown that granular cells can produce ROS (29). In contrast, we found that small granule cells collected in fraction 7 could not produce ROS through an oxidative burst. To identify which type of hemocyte from blast-like cells and macrophage-like cells produces ROS within a few minutes after exposure to zymosan, ROS production was investigated using NitroBlueTetrazolium (NBT) reduction to stain hemocytes directly. Correlative microscopic analysis using MCDH staining can then be conducted after the NBT reduction reaction. Macrophage-like cells were strongly and significantly stained by NBT reduction (33.2 %) (**Fig. 5E, panels a & d**). In contrast, some small granule cells were lightly stained by NBT reduction (**Fig. 5F**). Blast-like cells, big granule cells, vesicular cells, and hyalinocytes were never NBT stained, confirming that these cell types were not involved in ROS production (**Supp. Fig. S7**). Taken together, these observations demonstrate that small granule cells and macrophage-like cells are the two professional phagocytes among hemocytes. However, only macrophage-like cells are capable

of oxidative burst upon exposure to zymosan. In light of these new functional data, we further analyzed the expression level of NADPH-oxidase-related enzymes in the scRNA-seq dataset. The cells in cluster 1 predominantly expressed two NADPH oxidase isoforms (gene numbers G34908 and G23852) compared to other clusters (**Fig. 5H**). Furthermore, this cluster expresses macrophage-specific genes such as the angiopoietin receptor (**Table 1**), as well as maturation factors for dual oxidase, an enzyme involved in peroxide formation (**Supp. Fig. S8**). Collectively, these data indicated that cells of transcriptomic cluster 1 corresponded to macrophage-like cells.

Small granule cells and big granule cells accumulate intracellular copper.

The effects of copper on oyster hemocytes have been studied extensively due to its abundance in polluted marine environments (19). In addition, several studies have shown that *Vibrio* species pathogenic for *C. gigas* possess copper resistance genes, which are crucial for their survival within hemocytes (9). This prompted us to investigate which hemocyte types are involved in copper metabolism. To this end, total hemocytes were isolated from naive oysters and stained with rhodanine to reveal copper storage in cells. Rhodanine staining revealed that 33 % +/- 2 % of small granule cells and 30 % +/- 10 % of big granule cells exhibited a specific reddish/brown staining indicative of a high concentration of copper in their granules (**Fig. 5G and Supp. Fig. S9**). These results provide functional proof that SGC are specialized in metal homeostasis in addition to phagocytosis, as suggested by the scRNAseq data (Cluster 3).

Antimicrobial peptides are expressed by agranular cells, blasts and hyalinocytes.

Antimicrobial peptides (AMPs) have long been studied for their role in the invertebrate humoral immune response. They are expressed by hemocytes, including those in *C. gigas* (31). The aim was to ascertain whether different hemocyte cell types expressed distinct AMPs. However, due to the limited sequencing depth, the scRNA-seq analysis was not sensitive enough to reveal AMP expression. This limitation was addressed by investigating AMP expression through RT-qPCR on Percoll density-fractionated hemocytes. The results indicated that Cg-Bigdefs 1-2, Cg-BPI and hemocyte defensin were predominantly expressed by agranular cells, blasts and hyalinocytes (ABL, BBL and H) (**Fig. 6A, B and C**). The expression of these AMPs was associated with Blasts abundance, while the expression of Cg-BigDefs 1-2 was only associated with hyalinocytes (**Fig. 6D**). Granular cells (VC, ML, BGC and SGC) did not seem to express

any of the analyzed AMPs. These data suggest that some of the agranular cells are specialized in the production of humoral effectors.

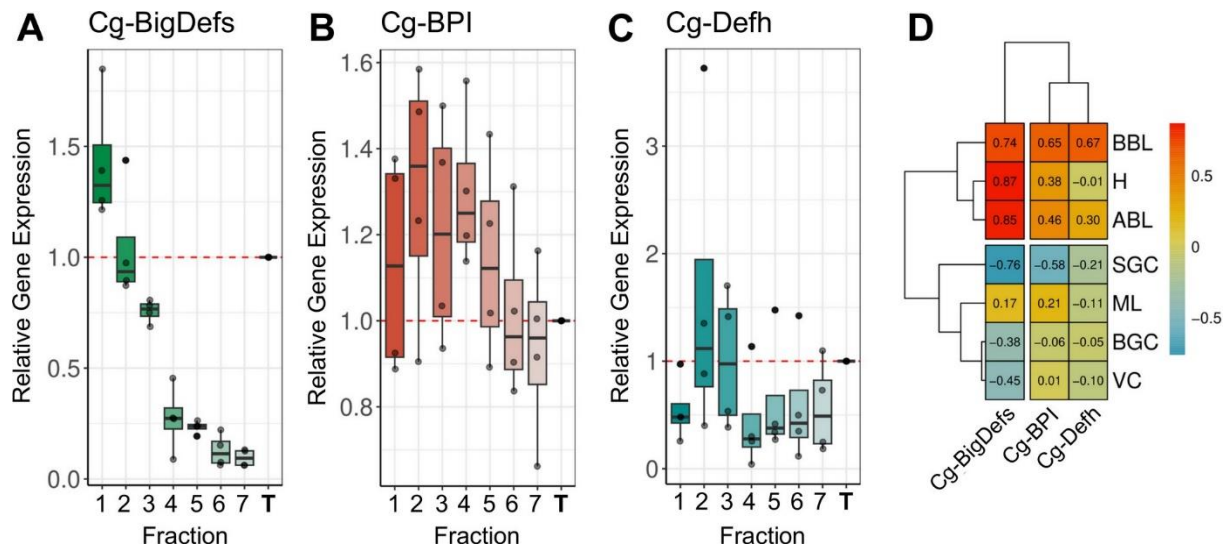


Fig 6. Hemocyte expression profiles of some antimicrobial peptides. (A) (B) and (C) Relative Gene Expression in the 7 Percoll hemocyte fractions of Big-Defensin1 & 2 (Cg-BigDefs), BPI (Cg-BPI) and hemocyte defensin (Cg-Defh), respectively, in comparison to the gene expression level in unfractionated hemolymph. (D) Correlation matrix between the relative gene expression of BigDefensin1 & 2, BPI and hemocyte defensin gene in each fraction and the percentage of each hemocyte type in each fraction (H : Hyalinocytes, ABL : Acidophilic Blast Like, BBL : Basophilic Blast Like, SGC : Small Granule Cell, ML : Macrophage Like, BGC : Big Granule Cell, VC : Vesicular Cell). Values and color scale represent the Pearson correlation coefficient (r) ranging from -1 (inverse correlation) to +1 (full correlation).

Tentative model of hemocyte lineages and differentiation pathways in *C. gigas*.

The ontogeny, lineage and differentiation pathways of bivalves remain largely unknown (32). However, there are some indications of circulating and proliferating hemocyte progenitors in the hemolymph of *C. gigas* (33). GO-terms analysis of the 7 transcriptomic clusters revealed different functional signatures, including the transcriptomic signature of cluster 4, which showed a high expression level of ribosomal proteins (Supp. Fig. S1J). This particularity has been observed in hematopoietic stem cells in vertebrates (34–36). Furthermore, scRNA-seq approaches can now be used to deduce differentiation pathways from mRNA splicing variant analysis using bioinformatic tools like Monocle3 (37). This revealed an overexpression of genes involved in the splicing, transcription and translation continuum in the same fourth cluster (Fig.

2), thereby reinforcing the hypothesis of a pool of quiescent or immature cells that can differentiate upon stimulation.

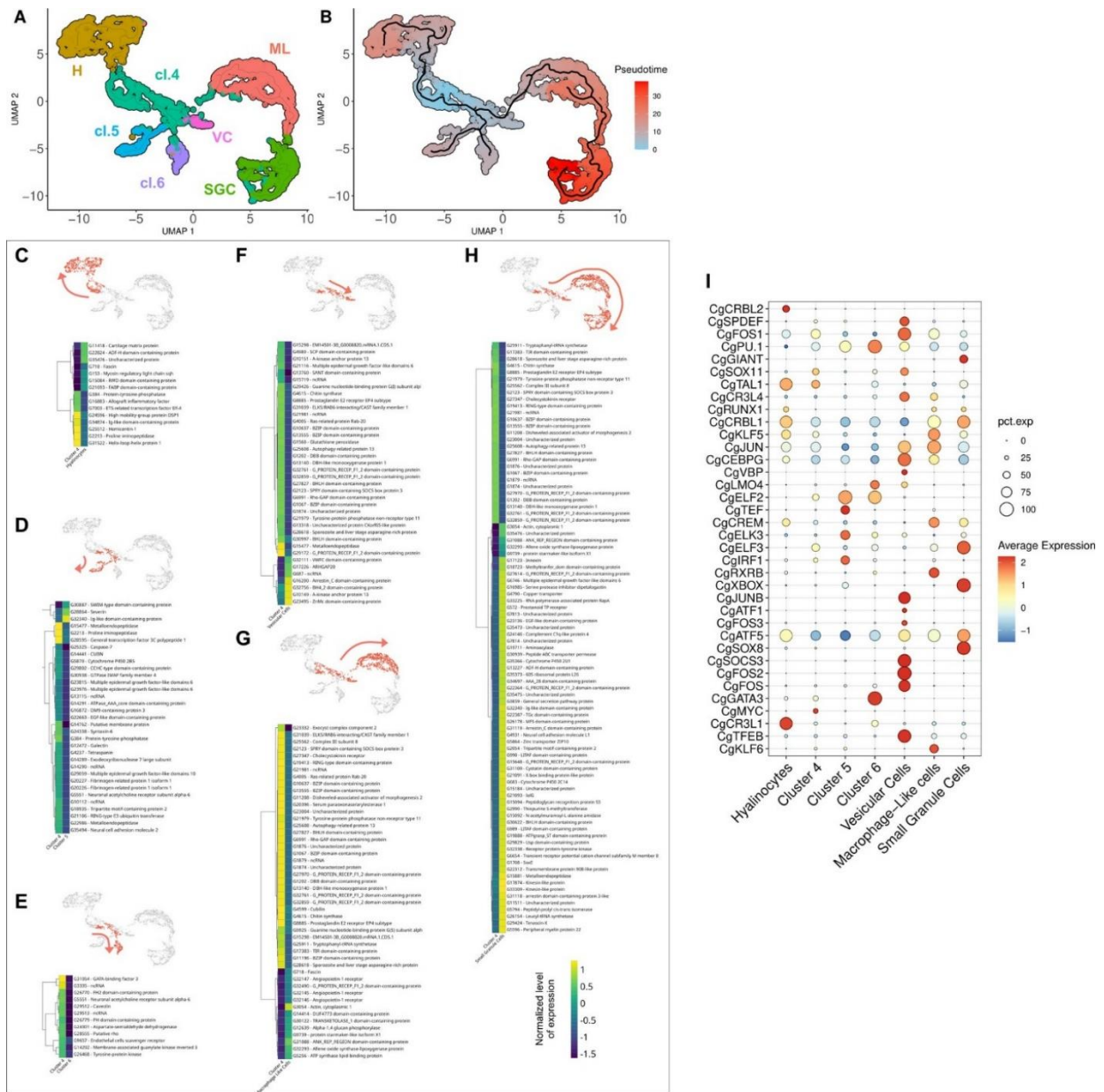


Figure 7. Pseudotime ordering of cells revealed 6 potential differentiation pathways of hemocytes. (A) UMAP plot of scRNA-seq analysis showing the 7 transcriptomic clusters used for pseudotime analysis. 4 clusters were identified cytologically (SGC for small granule cells - cluster 3, H for hyalinocytes - cluster 2, ML for Macrophage Like - cluster 1 and VC for vesicular cells - cluster 7), cl.4, cl.5, and cl.6 represent clusters 4, 5, and 6, respectively. (B) Graphical representation (UMAP projection) of the Monocle 3 pseudo-time order of the clustered cells. Cluster 4 (cl.4) was used as the origin for the pseudotime analysis. (C) (D) (E) (F) (G) and (H) show the gene expression level of selected marker genes obtained from the monocle3 trajectory analysis at the beginning and end of the modeled differentiation pathways

(in red on the UMAP plot) from cluster 4 to hyalinocytes, to cluster 5 cells, to cluster 6 cells, to Vesicular Cells (VC), to Macrophage-Like cells (ML) and to Small Granule cells (SGC) respectively. The color scale represents the normalized expression level of each gene. (I) Dot plot showing the average expression and the percentage of cells expressing identified transcripts encoding for transcription factors in the scRNA-seq dataset. Average expression is expressed in Log₂FC.

Cluster 4 was chosen to enroot the pseudotime analysis to deduce differentiation pathways and cell lineages using Monocle3. (**Fig. 7A**). By temporally ordering the 2817 cells analyzed by scRNA-seq, 5 cell lineages could be defined (**Fig. 7B**). Differentiation pathway 1 leads to hyalinocytes (H) (**Fig. 7C**). This transition is characterized by the downregulation of 8 genes, two of which are transcription factors (G7003 and G31522). The hyalinocyte cluster was also characterized by the overexpression of genes involved in cell contractility (G22824, G153 and G11418). Differentiation pathway 2 leads to cells of cluster 5 and is characterized by the downregulation of about 30 genes, and 3 genes related to Zn finger protein, actin cleavage and Ig-like domain proteins were specifically overexpressed (G30887, G28864 and G32340) (**Fig. 7D**). Differentiation pathway 3 leads to cells of cluster 6 and is characterized by the down-expression of 12 genes, and the upregulation of a GATA family transcription factor (G31054) (**Fig. 7E**). The pathways between clusters 4, 5 and 6 found by Monocle3 analysis were pseudo temporally short and few specific markers were identified, suggesting that they were transcriptionally close. Differentiation pathway 4 leads to vesicular cells (VC) (**Fig. 7F**) where a large number of genes were silenced to give rise to these cells. Seven genes were specifically overexpressed in VC (G32111, G17226, G687, G16200, G32756, G10149 and G23495). Interestingly, 6 genes encoding potential transcription factors were downregulated in this lineage (G30997, G10637, G1067, G13555, G2123 and G27827). Differentiation pathway 5 leads to macrophage-like cells (ML), and is characterized by the underexpression of 35 genes and the overexpression of 13 genes. Among the 35 genes, 6 are putative transcription factors (G2123, G10637, G13555, G27827, G1067 and G11196) (**Fig. 7G**). Finally, we can outline a lineage ending in small granule cells (SGC) (**Fig. 7H**). This pathway involved cluster 4 (immature cells), VC, ML and SGC and was characterized by the downregulation of 27 genes, including 5 potential transcription factors (G10637, G13555, G27827, G1067 and G2123). SGC showed a distinct transcriptomic signature with 61 overexpressed genes, including 3 transcription factors (G1708, G21091 and G30622). Based on these findings, we postulate that immature cluster 4

cells possess pluripotent potential and can give rise to four terminally differentiated cell types : cluster 5 and 6 cells, hyalinocytes and small granule cells, and two other transient hemocyte cell types : vesicular cells and macrophage-like cells. All data from the Monocle3 analyses are available as Supplementary Data (**Supp. Fig. S10**).

Differentiation pathway analysis thus revealed the over- or under-expression of various transcription factors in the identified pathways. Given the established role of transcription factors as master regulators of cell differentiation and their utility in delineating cell lineages, we investigated the combinatorial expression patterns of transcription factors among the different transcriptomic cell clusters. Based on GO-terms annotation, 28 different sequences corresponding to transcription factors were isolated from the scRNA-seq dataset. The transcription factor function was confirmed by manual annotation (**Supp. Table S5**) and **Figure 7I** shows the average expression profiles of these factors in the different clusters. **Supplementary Figure S11** illustrates their expression levels in single cells. Two transcription factors, CgATF5 and CgCRBL1, exhibited a contrasting expression profile with an increased average expression in macrophage-like cells, hyalinocytes and small granule cells versus a low expression profile in cells in clusters 4, 5, 6 and vesicular cells. We also identified transcription factors that were specifically expressed in the different transcriptomic clusters : CgSPDEF, CgSOCS3, CgFOS and CgTFEB were specific for vesicular cells, CgSOX8, CgXBOX and CgELF3 were specific for small granule cells, CgCR3L1 and CgTAL1 for hyalinocytes, and CgJUN, CgKLF5, CgKLF6 and CgCREM for macrophage-like cells. Eight additional transcription factors were specifically identified in cluster 6 (CgGATA3, CgPU.1 and CgELF2), cluster 5 (CgELF2, CgELK3 and CgIRF1) and cluster 4 (CgTAL1 and CgFOS1). These data potentially define four distinct hematopoietic lineages originating from one type of immature blast cells and give rise to hyalinocytes, SGC (via VC and ML), or two distinct differentiated blast-like cells. We also identified a combination of transcription factors specific to lineages and cell types that are potential master regulators of cell fate during hematopoiesis.

Discussion

The findings of our study represent a significant advancement in our understanding of the functional diversity and lineages of *C. gigas* hemocytes. Single-cell RNA-seq and cytology were combined to identify seven distinct hemocyte transcriptomic cell clusters and an equivalent number of morphotypes. These include four granular cell types (big granule cells, macrophage-like cells, small granule cells and vesicular cells), two distinct blast-like cells (basophilic and acidophilic blast-like cells), and one agranular epithelial-like cell type (hyalinocytes). A

significant challenge was to identify correlations between transcriptomic and cytological data to fully define each cytological cell type. This challenge was overcome by combining multiple approaches, including isopycnic Percoll density gradient fractionation combined with the analysis of transcriptomic markers expression, and functional assays including phagocytosis, oxidative burst, copper accumulation, AMP expression and finally pseudotime analysis of gene expression. These results confirmed the historical classification of the 3 main cell groups : blasts, hyalinocytes, and granular cells (15) and deepened our understanding of the functional specificities of poorly characterized cell types. In particular, we identified distinct transcriptional and functional subtypes among blasts and granular cells with complementary immune specialization and lineage relationships between cells.

One significant outcome of the present study is the identification of cell types involved in antimicrobial activities, including phagocytosis, intracellular copper accumulation, an oxidative burst and antimicrobial peptide production. These cell types have been extensively studied for their role in antibacterial and antiparasitic defenses, as they are found in the large majority of invertebrates (17). Nevertheless, there has been considerable debate surrounding the cell types specialized for these critical immune functions in bivalves, particularly oysters. Moreover, the involvement of the different hemocyte subpopulations in immune functions is not yet fully understood.

Our findings reveal that the macrophage-like (ML) cells and small granule cells (SGC) are the sole hemocyte cell types that function as professional phagocytes, as demonstrated against Zymosan or *Vibrio*. These two distinct cell types could be distinguished functionally. First, two distinct transcriptomic clusters were identified for each cell type (Cluster 1 for ML / BGC and Cluster 3 for SGC). Secondly, only ML induced a measurable oxidative burst. Thirdly, only SGC accumulated intracellular copper in specific granules. The two types of professional phagocytes belong to the same granular cell lineage, as determined by pseudotime analysis. The notion that ML could serve as a precursor for SGC may seem counterintuitive. However, this is not an isolated phenomenon among invertebrate hemocytes. For instance, in *Drosophila* larvae (38), some populations of professional phagocytes, the sessile plasmatocytes, give rise to crystal cells or lamellocytes that are morphologically and functionally distinct from plasmatocytes (39). Similarly, the existence of multiple professional phagocytes in the oyster is reminiscent of vertebrate macrophages, polynuclear neutrophils and dendritic cells, which possess distinct

functional specializations, including efferocytosis (40), oxidative burst, NETosis, or antigen presentation (41).

The characterization of professional phagocytes in oysters is of particular importance for a deeper understanding of oyster-*Vibrio* interactions during pathogenesis. Some of the most extensively studied oyster pathogens, including strains of *V. tasmaniensis* and *V. aestuarianus francensis*, harbor virulence traits that enable them to disrupt the phagocytic activity of hemocytes during pathogenesis. For instance, *V. tasmaniensis* behaves as a facultative intracellular pathogen with phagocytosis-dependent cytotoxicity (11). Additionally, both *V. tasmaniensis* and *V. aestuarianus* display resistance to copper toxicity through CopA and CusA/B transporters. This trait is essential for the survival and virulence of these pathogens in oysters (9, 42). Since SGCs have been demonstrated to be professional phagocytes with copper-rich granules, the cellular interactions between SGCs and these vibrios are likely to be critical during the antibacterial host response and pathogenesis. ML are phagocytes that possess a very potent NADPH-oxidase-dependent oxidative burst. The oxidative burst is a rapid and potent antimicrobial response observed in professional phagocytes, such as polynuclear neutrophils in mammals. It is worth noting that NADPH-dependent ETosis has been observed in *C. gigas* in a manner analogous to that observed in human neutrophils (43). This cell death is characterized by the projection of DNA extracellular traps that capture and kill some pathogens like *Vibrio* (43). Therefore, it is reasonable to hypothesize that ML may also be involved in ETosis.

The specialized functions of the two other types of granular cells, the BGCs and the VCs, remain unclear. Despite the difficulty in identifying a specific scRNAseq transcriptomic cluster for BGCs, the level of expression of laccase 24 was found to be higher in a particular subcluster among ML (**Supp. Fig. S8**) and pseudo-time analysis highlighted the same subcluster as an alternative differentiation state among ML (**Fig. 7B**). The enrichment of transcripts involved in oxido-reduction pathways, particularly laccase 24, aligns with their potential role in melanization and response to oxidative stress (44). While melanin-like deposits have been observed in some cases of infestation by the parasites *Martelia* or *Bonamia* in the Sydney rock oyster (45), this mechanism is not as robust as that described in arthropods, which perform melanization through a prophenoloxidase activation cascade (46, 47). In many marine invertebrates (44), a type of hemocyte known as Brown Cells could be related to the BGCs described here. When observed without any staining (as in **Fig. 5F**), their big granules with a yellow to dark brown content appear to align with the historical description of brown cells that

often infiltrate tissues (like gills) in animals exposed to polluted waters (44). It has therefore been theorized that these cells are involved in detoxification processes. Our pseudotime analysis indicates that they likely originate from ML, with limited phagocytosis activity and a specialized role in melanization and potentially heavy metal detoxification, as evidenced by rhodanine staining showing copper accumulation in some of their granules (**Fig. 5G**). Further studies are recommended to clarify the role of BGCs, particularly in the context of parasitic infestation or exposure to toxic stresses. Lastly, VC are granular cells that remain to be functionally characterized. Their transcriptomic profile suggests strong intracellular vesicular trafficking and autophagy activity. However, our functional assays did not reveal any particular immune-related function. Their clear granules appear auto-fluorescent when illuminated with UV light (**Supp. Fig. S11**) but the biochemical nature of the content of these granules remains to be characterized. As they also appear as cell intermediates along the granular cell differentiation pathway in pseudotime analysis, they could represent functionally immature precursors of the other three granular cell types, much like promyelocytes which possess specific azurophilic granules but are functionally immature precursors during granulocyte differentiation in humans. However, the enrichment of autophagy-related transcripts in VC calls for further investigation into a potential role in antiviral immunity, as autophagy has been suggested to play a role in the response to OsHV-1 virus (48).

Hyalinocytes are a homogenous cell type, with only one morphotype matching one transcriptomic cluster. It can be deduced from pseudotime analysis that they originate from a specific and very different differentiation pathway than the granular cells. According to the literature, hyalinocytes are involved in the early stages of inflammation and can infiltrate wounds and interact with foreign particles. In the flat oyster *Ostrea edulis*, they contribute to shell production and wound healing (49). In the Sydney rock oyster they play a role in cell aggregation (50), while in *C. virginica* (51) they contribute to encapsulation, reminiscent of lamellocytes in *Drosophila*. Our results suggest an important role of AMP expression in the immune response. Indeed, Cg-BigDefs, which participate in the control of oyster microbiota (52), were found to be expressed in both hyalinocytes and blast-like cells. Moreover, hyalinocytes from the oyster *O. edulis* have been shown to express the AMP Myticin C (53), which lends further support to this immune function. Among the AMPs, we also found that Cg-BPI and Cg-Defh, are more expressed in BBL, ABL than in other cell types. These results are somewhat unexpected, given the prevailing assumption that AMPs are stored in granules of granular cells, rather than agranular cells (16). These results highlight the necessity to reassess

the role of specific agranular cell types in the active production of humoral immune effectors. Our findings suggest that hyalinocytes and/or the blast-like cells may be a cellular target of the OsHV-1 virus, the causal agent of POMS, which dampens the expression of certain AMPs (7), thereby inducing bacterial dysbiosis. It is still unclear whether this is due to a decreased expression of AMPs and/or inhibition of immature blast cell differentiation involved in the renewal of agranular cell types.

It should be noted that the complexity of blast-like cells could not be fully elucidated in this study, as 3 clusters and only 2 morphotypes were identified. Cell fractionation using Percoll gradient failed to yield pure blast-enriched fractions (ABL and BBL), preventing precise functional characterization. The enrichment in transcripts of the transcription synthesis degradation continuum aligns with the definition of undifferentiated blast-type cells and with the basophilic staining obtained in MCDH for BBL cells, as immature blast cells are characterized by a basophilic cytoplasmic staining in humans. However, our results show that certain blast populations can produce AMPs, suggesting that these cells may also play a role in the production of humoral effectors. Ultimately, it remains unclear whether these circulating immature cells are indeed the stem cells from which all hemocytes originate.

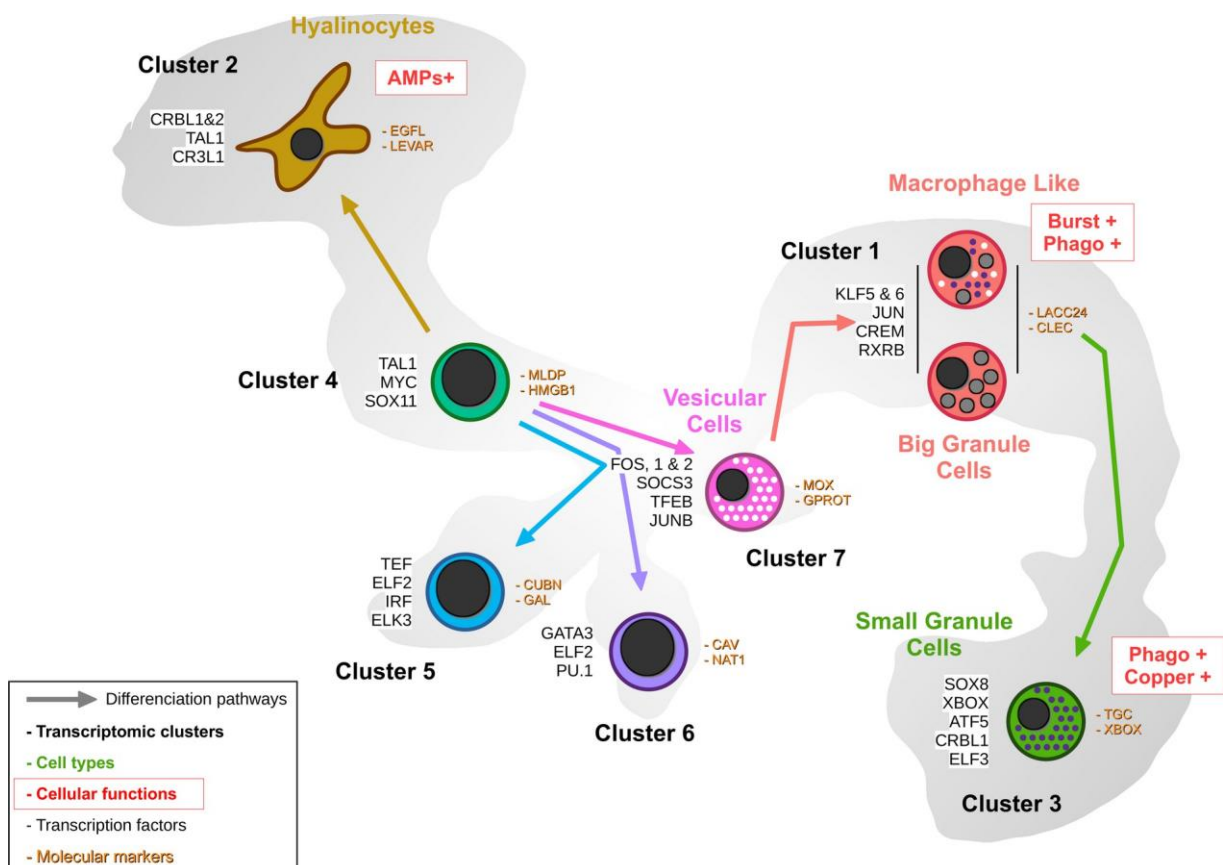


Figure 8. Proposed hemocyte ontology in *Crassostrea gigas* based on the transcriptomic, cytological and functional results obtained. Cells are colored according to the same color code as the transcriptomic clusters. Cluster numbers and cell types are indicated. To the left of the cells are the overexpressed transcription factors and to the right are the identified marker genes in each cluster. Functional characteristics of hyalinocytes, macrophage-like cells and small granule cells are marked in red. (**AMP** : AntiMicrobial Peptide, **Burst** : ROS production, **Phago** : phagocytosis).

In the animal kingdom, the innate immune system relies on specialized cells derived from pluripotent precursors through hematopoiesis. Transcription factors in particular have been found to exhibit a high degree of conservation throughout the animal kingdom, from invertebrates to vertebrates. However, the mechanisms underlying the functional differentiation of bivalves are only partially available or understood (54). Recent research has indicated the potential existence of hemocyte progenitors, also known as blast-like cells in several bivalve species. These include clams, mussels, scallops, marine mussels, freshwater mussels, oysters, pearl oysters, and wing shells (54). However, various models for hematopoiesis in bivalves have been proposed and extensively debated without a clear consensus or definitive proof. Single-cell RNA sequencing and pseudotime analysis have enabled us to propose a refined model of hematopoiesis at an unprecedented level of detail. In this model, the different types of hemocytes are likely produced through four differentiation pathways that originate from a common progenitor. One pathway results in the formation of agranular hyalinocytes, while another independent pathway gives rise to the granular cells, including VC, ML, BGC, and SGC. Furthermore, two additional differentiation pathways have been identified that may lead to terminally differentiated blast-like cells. The differentiation of mature hemocytes involves the establishment of lineage-specific gene expression profiles, which rely on transcription factors to modulate the expression of their target genes. Our study identified a combination of transcription factors that are differentially expressed during *C. gigas* hematopoiesis and are specific to differentiation stages and cell lineages, including many well-known hematopoietic transcription factors such as GATA, PU-1, TAL1 and SOX factors, which are positioned in this model of *C. gigas* hematopoiesis (55-57) (**Fig. 8**).

This study significantly advances our understanding of bivalve immunity, especially in comparison to arthropods. By introducing a standardized reference hemocytogram for oysters using MCDH staining, defining cell type-specific markers and key transcription factors likely involved in cell fate determination, as well as clarifying the functions of different hemocytes, we have paved the way for future in-depth studies. This will facilitate further studies of the oyster's immune response to various biotic and abiotic stress at the cellular level. Improved comprehension of antiviral and antibacterial responses in bivalves, along with an enhanced understanding of immune priming and immune memory at the cellular level in bivalves, will benefit health and population management practices for sustainable aquaculture production. These findings will also contribute to the broader field of evolutionary immunology by enabling comparative studies and elucidating the diversification of immune cells and immunity-related genes in a protostome.

Materials and Methods

Conservation of oysters

The work described here was performed using two different sources of oysters of the same species *Crassostrea (Magallana) gigas*. ISA (Ifremer Standardized Oysters - La tremblade - France) oysters for the scRNA-seq experiment and oysters provided by a local supplier (<https://www.huitres-bouzigues.com>). Animals were washed and kept in 10 L tanks containing seawater and a bubbler to oxygenate and homogenize the water. Water was changed daily and oyster health was monitored. All animals used in this study were 18 months of age.

Hemocyte collection and processing

Crassostrea gigas hemocytes were collected from live animals by puncture of the adductor muscle. The oyster shell was incised on the posterior side with forceps. Hemolymph was collected using a 23Gx1" needle mounted on a 5 mL syringe prefilled with 2 mL of ice-cold Alsever modified medium (20.8 g glucose – 8 g trisodium citrate - 22.5 g sodium chloride - 0.4 g BSA - pH=7.5). Samples were centrifuged for 4 minutes at 200 g – 4 °C and the supernatant was removed and replaced with 1 mL of fresh Alsever modified medium. Each hemocyte sample was thoroughly checked for quality, counted under a microscope using KOVA (Kova International, USA) slides, and stored on ice prior to processing. For scRNA-seq analysis, resuspended hemocytes were filtered on 30 µm filters, counted, the solution was adjusted to 1.10^6 cells per mL and stored on ice prior to 10X genomic library preparation.

C. gigas genome annotation

The *C. gigas* genome (Genbank GCA_905397895.1) (24) was used as a reference. Prior to annotation, the longest CDS sequences were extracted from the gff3 file. Annotation was realized using the ORSON script (<https://gitlab.ifremer.fr/bioinfo/workflows/orson>). ORSON combines cutting-edge tools for annotation processes within a Nextflow pipeline. The ORSON script performs a sequence similarity search with BLAST (58) against the Uniprot-Swissprot and Uniprot-trEMBL databases, and functional prediction with InterProScan (59) and eggNOG (60) orthogroup annotation. Interproscan analysis was performed against Pfam, Prosite, CDD, TIGR, SMART, SuperFamily, PRINTS and Hamap databases. Results were collected and processed using Blast2GO (61) for annotation mapping and validation.

Drop Seq-based scRNA-seq library generation

The 10X Genomics protocol, Single Cell 3' Reagent Kits v2 User Guide from the manufacturer (10X Genomics, USA) was followed to prepare gel in emulsion beads (GEM) containing single cells, hydrogel beads, and reverse transcription reagents, perform barcoded cDNA synthesis, and generate sequencing libraries from pooled cDNAs. The concentration of single-cell suspensions was approximately 1000 cells / μ L, as estimated by manual counting, and cells were loaded according to the 10X protocol to capture approximately 3000 cells per reaction. Library construction (after GEM digestion) was performed using 10X reagents according to the manufacturer's instructions. Libraries (paired-end reads 75 bp) were sequenced on an Illumina NovaSeq (Illumina, USA) using two sequencing lanes per sample.

scRNA-seq analysis

Reads were aligned to the *C. gigas* reference genome (Genbank GCA_905397895.1) (27) using STAR solo software (v 2.7.10) (23). Unique molecular identifiers (UMIs) were extracted and counted for each cell, and an expression matrix was generated for further analysis. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data analysis was performed using the R programming language (version 4.2.1) (R Core Team, 2018) and the Seurat package (version 4.3.0) (62). The data were then pre-processed to remove unwanted sources of variation and to normalize gene expression. Cells with small library sizes and a high proportion of mitochondrial genes were excluded. Data normalization was performed using the SCTransform method. After normalization, highly variable genes were identified using the FindVariableFeatures function and the top variable genes were selected for downstream analyses. Dimensionality reduction was performed using

Principal Component Analysis (PCA), followed by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) to visualize the data. Cell clustering was performed using the 'FindClusters' function, using the previously identified significant principal components (dims = 6) and a resolution parameter ($r = 0.1$) to define cluster granularity. Differential expression analysis was performed using the 'FindAllMarkers' function (pct.min = 0.25) to identify genes differentially expressed between clusters, with statistical significance determined using the Wilcoxon rank sum test. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes was performed using gene set enrichment analysis (RBGOA) (27).

KEGG pathway analysis

KEGG analysis was performed using DAVID Bioinformatics Resources (NIAID/NIH) (26). Gene lists of specifically overexpressed genes in each cluster were obtained after scRNA-seq processing (genes with $\text{Log}_2\text{FC} > 0.25$ and significant p-value < 0.001) and used for KEGG annotation. The *C. gigas* reference genome from the DAVID bioinformatics resource was used for this analysis, with thresholds of 2 for counts and 0.05 for EASE value (p-value). KEGG annotation results were post-processed and presented as a heatmap showing the KEGG pathway, fold enrichment, p-value significance and number of positive terms.

Rank-Based Gene Ontology Analysis

RBGOA first clusters GOs according to their representative genes to identify the most significant GOs, and then ranks the identified biological processes according to their average expression levels (over all representative genes). Finally, biological processes, molecular functions and cellular components significantly enriched in DEGs are identified by a Mann-Whitney rank test with a strict FDR correction. The files generated by the GO-MWU scripts (https://github.com/z0on/GO_MWU) were post-processed to extract the category names and the fraction indicating the number of "good candidates" relative to the total number of genes belonging to that category. The "good candidates" were the genes that exceeded an arbitrary 'absValue' cutoff (defined as 0.001) in their significance measure. The results were presented as a heatmap.

Percoll Density Gradient Separation of Hemocytes

A concentration series of Percoll (Cytiva, Sweden) diluted in Alsever modified medium was prepared as follows: 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 % (vol/vol). Discontinuous density gradients

(from 10 % Percoll with a density of 1.0647 to 70 % Percoll with $d=1.1049$) were made using 1.5 mL of each concentration and loaded with 1 mL of the hemocyte suspension corresponding to approximately 2.10^7 cells. Centrifugation was performed (30 min, 800 g, 4 °C) in a swinging bucket on a Beckman Coulter JS-13.1 rotor (Beckman Coulter, USA). Hemocytes concentrated at each density interface were collected separately with a 70 mm long 20Gx2.75" needle mounted on a 1 mL syringe. The hemocytes were then washed from the Percoll by adding 10 mL of ice-cold Alsever modified medium, pelleted by centrifugation (10 min, 200 g, 4°C) and resuspended in Alsever modified medium or filtered seawater.

Cytological description of the hemocyte populations

200,000 fresh hemocytes were seeded onto a slide using a Cytospin 4 centrifuge (Thermo Scientific, USA). The samples were then stained using the panoptic MCDH (Micro Chromatic Detection for Hematology) (Cellviation, Sweden) staining protocol. This protocol produces purple hues typical of Romanowsky-Giemsa staining results. After staining, the samples were observed using a LEICA DMR (Leica AG, Germany) transmitted light microscope with a 40x magnification objective. Each slide was imaged and the hemocytes were counted and characterized based on their morphology.

Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, the Netherlands) and cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the Superscript IV kit (ThermoFisher Scientific, USA) with oligo(dT) primers. RT-PCR was performed on LightCycler© 480 thermocycler using the SYBR Green 1 Master kit (Roche, Switzerland). Primers were used at 200 nM. Primer sequences are listed in **Supplementary Table S3**. Expression was normalized to *Cg-rps6* reference gene. The standard cycling conditions were 95°C pre-incubation for 3 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds, and 72°C for 25 seconds. Each pair of primers was first tested and validated on a total hemocyte RNA preparation to control melting curves and establish calibration lines.

Oxidative Burst Assay

The production of reactive oxygen species was quantified by luminescence assay. Briefly, hemocytes from hemolymph puncture or Percoll density gradient were washed once with filtered sterile water. 50 µL of hemocytes were plated in triplicate on a 96-well plate (3.10^5

cells/cm²). 50 µL of 40 mM luminol (Merck and Co, USA) was added to each well. After 45 minutes of incubation at room temperature, the oxidative burst was induced by adding 100 µL of zymosan (Merck and Co, USA) at a multiplicity of infection (MOI) of 50:1. The plate was immediately placed in a Berthold Centro XS3 LB 960 luminescence microplate reader (Berthold GmbH, Germany) to measure luminescence emission every 2 minutes for 2 hours.

Phagocytosis assay

400 µL of filtered, sterile water-washed hemocytes were seeded in a 24-well plate at a concentration of $3 \cdot 10^5$ cells/cm². After 15 minutes, 50 µL of zymosan was added to the fractions at an MOI of 20:1. For LMG20012^T Vibrio, 50 µL of bacteria was added to a total hemolymph at an MOI of 5:1. After 1 hour of contact at room temperature, the cells were resuspended and 200 µL of the suspension was applied to a microscope slide using a Cytospin centrifuge. The slides were then stained with MCDH and observed under a LEICA DMR transmitted light microscope with a 40x magnification objective (Leica AG, Germany) to count phagocytic cells.

NitroBlue Tetrazolium (NBT) staining

ROS production was measured using NitroBlue Tetrazolium reduction after zymosan stimulation. Briefly, 1 mL ($1 \cdot 10^6$ cells) of hemocyte solution was mixed with 50 µL of filtered NBT solution (15 mg/mL in water). Zymosan was added at a 4:1 MOI and the mixture was incubated at room temperature for 10 minutes on a rocking shaker. Then, 50 µL of each sample was plated onto glass coverslips and observed under a transmitted light microscope LEICA DMR with a 40x magnification objective (Leica AG, Germany) to count NBT-positive cells. The positions of positive NBT cells were recorded prior to MCDH staining to identify hemocyte types.

Rhodanine copper staining of hemocytes

The storage of copper by hemocytes was examined by Rhodanine staining. Briefly, $1 \cdot 10^5$ hemocytes were plated on Superfrost slides using a cytopsin and circled with a hydrophobic pen to retain the staining solution. The Copper Stain Kit (SkyTek, USA) was used to stain the hemocytes. As described by the kit manufacturer, one drop of Rhodanine solution was added to 9 drops of acetate to form the working solution. Five drops were placed on the cytopsin cells and a 5 mL Eppendorf tube with the cap removed was placed over the cells to prevent evaporation of the working solution. The slide and the balanced Eppendorf tube were placed in a beaker of boiling distilled water for 20 minutes. The slide was then washed with 5 drops of

acetate and 3 drops of hematoxylin were placed on the slide for 1 minute at room temperature. The slides were then washed a final time with acetate and observed under a LEICA DMR transmitted light microscope with a 40x magnification objective (Leica AG, Germany) to count rhodanine-positive cells. The positions of rhodanine-positive cells were recorded prior to MCDH staining to identify hemocyte types.

Pseudotemporal ordering of cells with Monocle3

Cells from the *C. gigas* dataset were analyzed using Monocle3 (<https://github.com/cole-trapnell-lab/monocle3>) (37). The Monocle3 analysis was performed on the Seurat object following the aforementioned processing steps. Clustering information (features, genes, partitions, clusters and UMAP coordinates) was transferred to a CDS object. The cell trajectory was calculated using the *learn_graph* function. The *choose_graph_segments* function was used to select three lineages. The gene expression along pseudotime data was extracted from the result. Then, the data were used to plot genes along pseudotime in three lineages using ggplot2 v3.4.4 R package and the heatmap was generated using the pheatmap v1.0.12 R package.

Statistical Analysis

To evaluate differences between samples, a statistical analysis was performed using (version 4.2.1) (R Core Team, 2018) and appropriate packages. All data were examined for normality, and statistical tests were selected accordingly. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for normally distributed data. Seven different hemolymph samples were used for cytological analysis. Oysters were provided by our local supplier) and approximately 300 hemocytes were counted per sample. Seven independent experiments were performed for Percoll density gradient separation. A Tukey test was used to evaluate the statistical difference between the proportions of hemocyte types. The phagocytic capacity of hemocytes was tested in three independent experiments and statistical differences were evaluated using the Tukey test for both the phagocytic capacity between hemocyte types and the number of particles per phagocyte. Finally, oxidative burst capacity was tested 3 times on Percoll-separated hemocytes. The Tukey test was also used to assess statistical differences between conditions. The null hypothesis was rejected at a significance level of $p = 0.05$.

References

1. Y. M. Bar-On, R. Phillips, R. Milo, The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 6506–6511 (2018).

2. B. Leicester Bayne, *Biology of Oysters* (Academic Press, 1st Edition., 2017) vol. 41.
3. G. Zhang, L. Li, J. Meng, H. Qi, T. Qu, F. Xu, L. Zhang, Molecular Basis for Adaptation of Oysters to Stressful Marine Intertidal Environments. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**, 357–381 (2016).
4. FAO, Global aquaculture production. Fisheries and aquaculture division (2023).
5. F. Pernet, C. Lupo, C. Bacher, R. J. Whittington, Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**, 20150213 (2016).
6. A. Alfjorden, M. Areskog, D. Bruno, R. Carnegie, D. Cheslett, S. Feist, S. Ford, S. Jones, A. Lillehaug, L. Madsen, T. Renault, N. Ruane, P. Vennerstrom, New Trends in Important Diseases Affecting the Culture of Fish and Molluscs in the ICES Area 2002– 2015. *ICES cooperative research report*, doi: 10.17895/ices.pub.2800 (2017).
7. J. de Lorgeril, A. Lucasson, B. Petton, E. Toulza, C. Montagnani, C. Clerissi, J. Vidal-Dupiol, C. Chaparro, R. Galinier, J.-M. Escoubas, P. Haffner, L. Dégremont, G. M. Charrière, M. Lafont, A. Delort, Vergnes, M. Chiarello, N. Faury, T. Rubio, M. A. Leroy, A. Pérignon, D. Régler, B. Morga, M. Alunno-Bruscia, P. Boudry, F. Le Roux, D. Destoumieux-Garzón, Y. Gueguen, G. Mitta, Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* **9**, 4215 (2018).
8. N. M. Coyle, C. O’Toole, J. C. L. Thomas, D. Ryder, E. J. Feil, M. Geary, T. P. Bean, A. W. Joseph, A. Waine, D. Cheslett, D. W. Verner-Jeffreys, *Vibrio aestuarianus* clade A and clade B isolates are associated with Pacific oyster (*Magallana gigas*) disease outbreaks across Ireland. *Microbial Genomics* **9**, 001078 (2023).
9. A. Mesnil, M. Jacquot, C. Garcia, D. Tourbiez, L. Canier, A. Bidois, L. Dégremont, D. Cheslett, M. Geary, Vetri, A. Roque, D. Furones, A. Garden, P. Orozova, I. Arzul, M. Sicard, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, M.-A. Travers, Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oysters in Europe. *Molecular Ecology* **32**, 2869–2883 (2023).
10. D. Oyanedel, A. Lagorce, M. Bruto, P. Haffner, A. Morot, Y. Labreuche, Y. Dorant, S. de La Forest Divonne, F. Delavat, N. Inguibert, C. Montagnani, B. Morga, E. Toulza, C. Chaparro, J.-M. Escoubas, Y. Gueguen, J. Vidal-Dupiol, J. de Lorgeril, B. Petton, L. Degremont, D. Tourbiez, L.-L. Pimparé, M. Leroy, O. Romatif, J. Pouzadoux, G. Mitta, F. Le Roux, G. M. Charrière, M.-A. Travers, D. Destoumieux-Garzón, Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**, e2305195120 (2023).
11. T. Rubio, D. Oyanedel, Y. Labreuche, E. Toulza, X. Luo, M. Bruto, C. Chaparro, M. Torres, J. de Lorgeril, P. Haffner, J. Vidal-Dupiol, A. Lagorce, B. Petton, G. Mitta, A. Jacq, F. Le Roux, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 14238– 14247 (2019).
12. Y. Labreuche, F. Le Roux, J. Henry, C. Zatylny, A. Huvet, C. Lambert, P. Soudant, D. Mazel, J.-L. Nicolas, *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* **29**, 753–758 (2010).
13. M. Lafont, A. Vergnes, J. Vidal-Dupiol, J. de Lorgeril, Y. Gueguen, P. Haffner, B. Petton, C. Chaparro, C. Barrachina, D. Destoumieux-Garzon, G. Mitta, B. Gourbal, C. Montagnani, A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *mBio* **11**, 10.1128/mbio.02777-19 (2020).
14. M. Fallet, C. Montagnani, B. Petton, L. Dantan, J. de Lorgeril, S. Comarmond, C. Chaparro, E. Toulza, S. Boitard, J.-M. Escoubas, A. Vergnes, J. Le Grand, I. Bulla, Y. Gueguen, J. Vidal-Dupiol, C. Grunau,

- G. Mitta, C. Cosseau, Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome* **10**, 85 (2022).
15. N. R. de la Ballina, F. Maresca, A. Cao, A. Villalba, Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review. *Front. Immunol.* **13**, 826255 (2022).
 16. E. Bachère, R. D. Rosa, P. Schmitt, A. C. Poirier, N. Merou, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish & Shellfish Immunology* **46**, 50–64 (2015).
 17. J.-M. Escoubas, B. Gourbal, D. Duval, T. J. Green, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, C. Montagnani, “Immunity in Molluscs” in *Encyclopedia of Immunobiology*, M. J. H. Ratcliffe, Ed. (Academic Press, Oxford, 2016; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123742797120041>), pp. 417–436.
 18. A. S. Mount, A. P. Wheeler, R. P. Paradkar, D. Snider, Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. *Science* **304**, 297–300 (2004).
 19. W. S. S. Fischer, “Environmental influence on bivalve hemocyte function” in *Am Fish Soc Symp* (1988)vol. 18, pp. 225–237.
 20. T. V. Nguyen, A. C. Alfaro, F. Merien, Omics approaches to investigate host–pathogen interactions in mass mortality outbreaks of *Crassostrea gigas*. *Reviews in Aquaculture* **11**, 1308–1324 (2019).
 21. J. Meng, G. Zhang, W.-X. Wang, Functional heterogeneity of immune defenses in molluscan oysters *Crassostrea hongkongensis* revealed by high-throughput single-cell transcriptome. *Fish & Shellfish Immunology* **120**, 202–213 (2022).
 22. R. D. Rosa, P. Alonso, A. Santini, A. Vergnes, E. Bachère, High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence–absence gene variability (PAV) in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* **49**, 231–238 (2015).
 23. B. Kaminow, D. Yunusov, A. Dobin, STARsolo: accurate, fast and versatile mapping/quantification of single-cell and single-nucleus RNA-seq data. bioRxiv [Preprint] (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.05.05.442755>.
 24. C. Peñaloza, A. P. Gutierrez, L. Eöry, S. Wang, X. Guo, A. L. Archibald, T. P. Bean, R. D. Houston, A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *GigaScience* **10** (2021).
 25. R. Satija, J. A. Farrell, D. Gennert, A. F. Schier, A. Regev, Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* **33**, 495–502 (2015).
 26. B. T. Sherman, M. Hao, J. Qiu, X. Jiao, M. W. Baseler, H. C. Lane, T. Imamichi, W. Chang, DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* **50**, W216–W221 (2022).
 27. R. M. Wright, G. V. Aglyamova, E. Meyer, M. V. Matz, Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus*. *BMC Genomics* **16**, 371 (2015).
 28. E. Bachère, D. Chagot, H. Grizel, Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental & Comparative Immunology* **12**, 549–559 (1988).
 29. W. Wang, M. Li, L. Wang, H. Chen, Z. Liu, Z. Jia, L. Qiu, L. Song, The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* **67**, 221–228 (2017).
 30. C. Lambert, P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 225–240 (2003).
 31. P. Schmitt, R. Rosa, M. Duperthuy, J. de Lorgeril, E. Bachère, D. Destoumieux-Garzon, The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Frontiers in Microbiology* **3** (2012).
 32. G. Vogt, Hidden Treasures in Stem Cells of Indeterminately Growing Bilaterian Invertebrates. *Stem*

Cell Rev and Rep **8**, 305–317 (2012).

33. M. Jemaà, N. Morin, P. Cavelier, J. Cau, J.-M. Strub, C. Delsert, Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster. *Journal of Experimental Biology*, jeb.106575 (2014).
34. S. P. Fahl, M. Wang, Y. Zhang, A.-C. E. Duc, D. L. Wiest, Regulatory Roles of Rpl22 in Hematopoiesis: An Old Dog with New Tricks. *Crit Rev Immunol* **35**, 379–400 (2015).
35. M. Rehn, A. Wenzel, A.-K. Frank, M. B. Schuster, S. Pundhir, N. Jørgensen, K. Vitting-Seerup, Y. Ge, J. Jendholm, M. Michaut, E. M. Schoof, T. L. Jensen, N. Rapin, R. T. Sapio, K. L. Andersen, A. H. Lund, M. Solimena, M. Holzenberger, D. G. Pestov, B. T. Porse, PTBP1 promotes hematopoietic stem cell maintenance and red blood cell development by ensuring sufficient availability of ribosomal constituents. *Cell Reports* **39**, 110793 (2022).
36. E. I. Athanasiadis, J. G. Botthof, H. Andres, L. Ferreira, P. Lio, A. Cvejic, Single-cell RNA-sequencing uncovers transcriptional states and fate decisions in haematopoiesis. *Nat Commun* **8**, 2045 (2017).
37. J. Cao, M. Spielmann, X. Qiu, X. Huang, D. M. Ibrahim, A. J. Hill, F. Zhang, S. Mundlos, L. Christiansen, F. J. Steemers, C. Trapnell, J. Shendure, The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* **566**, 496–502 (2019).
38. D. Hultmark, I. Andó, Hematopoietic plasticity mapped in *Drosophila* and other insects. *eLife* **11**, e78906 (2022).
39. U. Banerjee, J. R. Girard, L. M. Goins, C. M. Spratford, *Drosophila* as a Genetic Model for Hematopoiesis. *Genetics* **211**, 367–417 (2019).
40. E. Boada-Romero, J. Martinez, B. L. Heckmann, D. R. Green, The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 398–414 (2020).
41. D. C. Dale, L. Boxer, W. C. Liles, The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935–945 (2008).
42. A. S. Vanhove, T. P. Rubio, A. N. Nguyen, A. Lemire, D. Roche, J. Nicod, A. Vergnes, A. C. Poirier, E. Disconzi, E. Bachère, F. Le Roux, A. Jacq, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environmental Microbiology* **18**, 875–888 (2016).
43. A. C. Poirier, P. Schmitt, R. D. Rosa, A. S. Vanhove, S. Kieffer-Jaquinod, T. P. Rubio, G. M. Charrière, D. Destoumieux-Garzón, Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 24821–24831 (2014).
44. G. Zaroogian, P. Yevich, Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. *Environmental Pollution* **79**, 191–197 (1993).
45. B. Allam, D. Raftos, Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**, 121–136 (2015).
46. J. Nakhleh, L. El Moussawi, M. A. Osta, “Chapter Three - The Melanization Response in Insect Immunity” in *Advances in Insect Physiology*, P. Ligoxygakis, Ed. (Academic Press, 2017) vol. 52 of *Insect Immunity*, pp. 83–109.
47. P. Amparyup, W. Charoensapsri, A. Tassanakajon, Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* **34**, 990–1001 (2013).
48. S. Picot, N. Faury, C. Pelletier, I. Arzul, B. Chollet, L. Dégremont, T. Renault, B. Morga, Monitoring Autophagy at Cellular and Molecular Level in *Crassostrea gigas* During an Experimental Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12** (2022).
49. N. R. de la Ballina, A. Villalba, A. Cao, Differences in proteomic profile between two haemocyte types, granulocytes and hyalinocytes, of the flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* **100**, 456–466 (2020).
50. S. Aladaileh, S. V. Nair, D. Birch, D. A. Raftos, Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 48–63 (2007).

51. E. Rifkin, T. C. Cheng, H. R. Hohl, An electron-microscope study of the constituents of encapsulating cysts in the American oyster, *Crassostrea virginica*, formed in response to *Tylocephalum* metacestodes. *Journal of Invertebrate Pathology* **14**, 211–226 (1969).
52. N. De San Nicolas, A. Asokan, R. D. Rosa, S. N. Voisin, M.-A. Travers, G. Rocha, L. Dantan, Y. Dorant, G. Mitta, B. Petton, G. M. Charrière, J.-M. Escoubas, V. Boulo, J. Pouzadoux, H. Meudal, K. Loth, V. Aucagne, A. F. Delmas, P. Bulet, C. Montagnani, D. Destoumieux-Garzón, Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. *Marine Drugs* **20**, 745 (2022).
53. N. R. de la Ballina, A. Villalba, A. Cao, Shotgun analysis to identify differences in protein expression between granulocytes and hyalinocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol* **119**, 678–691 (2021).
54. E. A. Pila, J. T. Sullivan, X. Z. Wu, J. Fang, S. P. Rudko, M. A. Gordy, P. C. Hanington, Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Developmental & Comparative Immunology* **58**, 119–128 (2016).
55. M. de Bruijn, E. Dzierzak, Runx transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood* **129**, 2061–2069 (2017).
56. E. W. Scott, M. C. Simon, J. Anastasi, H. Singh, Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573–1577 (1994).
57. I. Bergiers, T. Andrews, Ö. Vargel Bölükbaşı, A. Buness, E. Janosz, N. Lopez-Anguita, K. Ganter, K. Kosim, C. Celen, G. Itr Perçin, P. Collier, B. Baying, V. Benes, M. Hemberg, C. Lancrin, Single-cell transcriptomics reveals a new dynamical function of transcription factors during embryonic hematopoiesis. *eLife* **7**, e29312 (2018).
58. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410 (1990).
59. P. Jones, D. Binns, H.-Y. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, H. McWilliam, J. Maslen, A. Mitchell, G. Nuka, S. Pesseat, A. F. Quinn, A. Sangrador-Vegas, M. Scheremetjew, S.-Y. Yong, R. Lopez, S. Hunter, InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**, 1236–1240 (2014).
60. C. P. Cantalapiedra, A. Hernández-Plaza, I. Letunic, P. Bork, J. Huerta-Cepas, eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 5825–5829 (2021).
61. S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, M. Robles, M. Talón, J. Dopazo, A. Conesa, High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* **36**, 3420–3435 (2008).
62. Y. Hao, S. Hao, E. Andersen-Nissen, W. M. Mauck, S. Zheng, A. Butler, M. J. Lee, A. J. Wilk, C. Darby, M. Zager, P. Hoffman, M. Stoeckius, E. Papalexi, E. P. Mimitou, J. Jain, A. Srivastava, T. Stuart, L. M. Fleming, B. Yeung, A. J. Rogers, J. M. McElrath, C. A. Blish, R. Gottardo, P. Smibert, R. Satija, Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573-3587.e29 (2021).

Acknowledgments

We are grateful to the staff of the Ifremer platform of “La Tremblade” for technical support in animal housing. scRNA-seq data generated and used in this work were produced through the MGX platform (University of Montpellier, CNRS ,INSERM). We thank the bioinformatic service of Ifremer (SEBIMER) for their help in bioinformatics and the qPCR platform GenSeq

(University of Montpellier). We would like to thank Viviane Boulo and Danielle Mello for their enriching discussions, as well as all the members of the 2MAP laboratory team for the fruitful discussions throughout this project.

Ethics

This work did not require ethical approval from a human subject or animal welfare committee.

Funding

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (MOSAR-DEF, ANR-19-CE18-0025; DECIComp, ANR-19-CE20-0004 and TRANSCAN ANR-18-CE35-0009), the University of Montpellier, iSite MUSE and the “GT-Huître” initiative from Ifremer. This study falls within the framework of the “Laboratoires d’Excellence (LABEX)” Tulip (ANR-10-LABX-41). Sébastien De La Forest Divonne was awarded a PhD grant from the Region Occitanie (HemoFight project) and the University of Perpignan Via Domitia graduate school ED305.

Author contributions

Conceptualization: G.M., D.D.-G., B.G., G.M.C. and E.V.

Methodology: S.d.L.F.D., J.P., G.M., D.D.-G., B.G., G.M.C. and E.V.

Investigation: S.d.L.F.D., J.P., G.M.C. and E.V.

Supervision: G.M.C. and E.V.

Writing (original draft): S.d.L.F.D. and E.V.

Writing (review and editing): all authors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Declaration of AI use

We have not used AI-assisted technologies in creating this article.

Data and materials availability

All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Raw reads are available at ENA under the project accession number PRJEB74031.

Supplementary Materials for

Diversity and functional specialization of oyster immune cells uncovered by integrative single cell level investigations

Sébastien de la Forest Divonne *et al.*

*Corresponding author. Email: emmanuel.vignal@umontpellier.fr

This PDF file includes:

Data S1 to S3

Tables S1 to S5

Figs. S1 to S12

Data S1. Single-cell RNA-seq analysis result file. CSV file containing the scRNA-seq analysis results with cluster number (<cluster>), gene number (<gene>), chromosome reference where the gene is located (<chromosome>), average expression level (<avg_log2FC>), percentage in the cluster (<pct1>) and in other clusters (<pct2>), pct1 / pct2 ratio (<pct. ratio>), adjusted p-val and p-val values (<p-val> and <p_val_adj>), and gene description (<description>).

Data S2. Annotation file of CDS extracted from the *Crassostrea gigas* genome file. CSV file containing the annotation results collected and processed using Blast2GO for annotation mapping and validation.

Data S3. Compilation file for RBGOA results. CSV file containing concatenated results of all RBGOA tests used to draw gene ontology analysis heatmaps with cluster number (<cluster_number>), GO term universe (<goterm_universe>), number of good gene candidates (<number_of_good_candidates>), total number of genes in this GO term category (<total_number_of_genes_of_this_category>), GO term name (<goterm_name>), adjusted p value (<pval-adj>) and GO term name variation (<variation>).

Number of Reads	127,959,215
Reads With Valid Barcodes	97.03 %
Sequencing Saturation	75.63 %
Q30 Bases in CB+UMI	96.14 %
Q30 Bases in RNA read	93.62 %
Reads Mapped to Genome: Unique+Multiple	89.22 %
Reads Mapped to Genome: Unique	82.01 %
Reads Mapped to Gene: Unique+Multiple Gene	72.26 %
Reads Mapped to Gene: Unique Gene	72.26 %
Estimated Number of Cells	2937
Unique Reads in Cells Mapped to Gene	67,950,796
Fraction of Unique Reads in Cells	73.48 %
Mean Reads per Cell	23,136
Median Reads per Cell	18,145
UMIs in Cells	16,306,374
Mean UMI per Cell	5552
Median UMI per Cell	4412
Mean Gene per Cell	1578
Median Gene per Cell	1434
Total Gene Detected	23,841

Table S1. STARsolo summary metrics report. Metrics dashboard obtained after the STARsolo step, describing the quality of the sequencing and the various characteristics of the cells detected after aligning the reads to the *C. gigas* genome from the Roslin Institute.

Cluster	KEGG Prefix	KEGG Number	KEGG Pathway	Fold Enrichment	P-value (<0.05)	Genes
1	crq	04144	Endocytosis	3.75	1.77E-06	G32465, G28245, G29411, G28554, G23342, G27546, G4677, G4248, G23299, G4679, G29017, G27834, G23983, G29650, G11765, G2151, G15227, G11863, G17437, G30122, G34645, G20982, G31268, G25073, G11958, G12723
1	crq	00030	Pentose phosphate pathway	10.19	4.25E-05	G20983, G16716, COX2, COX1, ND1, CYTB, G2226, G3525, G3658, ND5, G30122, G18442, G34645, G20982, G31268, G16805, G25073, G11958, G17273, G7839
1	crq	01200	Carbon metabolism	3.54	1.77E-03	G34645, G20982, G11958, G23780, G7839, G13028
1	crq	00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	4.94	6.58E-03	G18442, G22426, G22427, G23780, G7839
1	crq	00620	Pyruvate metabolism	5.26	1.38E-02	G22034, G32778, G32842
1	crq	03266	Varion - Herpesvirus	8.74	4.39E-02	G5571, G25192, G5077, G3494, G33210, G26985, G26901, G23358, G1703, G1900, G1543, G2172, G12279, G5185, G26391, G10525, G4452, G11817, G25420, G2853, G4635, G3304, G25620, G5649, G3526, G740, G24712, G26976, G25626, G15236, G34618, G34615, G18702
2	crq	03010	Ribosome	11.87	5.45E-27	G32475, G24506, G4572, G3088, G1531, G15286, G1299, G153, G22991, G1471, G10110, G1470
2	crq	04814	Motor proteins	3.64	3.62E-04	G5106, G26659, G18623, G18624, G14458
2	crq	00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4.61	2.17E-02	G31970, G3073, G5034, G3298, G5653, G27276, G25266, G650, G331, G23645, G1779, G16296, G23701, G13193, G27816, G10181, G15131, G21371, G2133, G34736, G26194, G5034, G4037, G3500, G20764, G16296, G23701, G14096, G22912, G15171, G27816, G21794, G19054, G15078, G16455, G34649, G9692
3	crq	00190	Oxidative phosphorylation	8.03	1.47E-12	G26194, G14096, G22912, G21794, G19054, G15078, G4037, G3500, G34649, G12763, G28194, G14096, G22912, G21794, G4037, G25300, G34649, G7042, G25304, G9692, G20764
3	crq	01200	Carbon metabolism	5.42	4.82E-08	G10612, G34830, G4232, G31680, G28015, G28554, G2650, G35288, G23530, G22892, G3216, G2800, G22524, G25627, G21676, G20683, G1765, G11863
3	crq	01230	Biosynthesis of amino acids	5.77	1.41E-05	G16296, G23701, G5034, G15171, G27816, G19054, G16455
3	crq	04144	Endocytosis	3.2	3.22E-05	G13605, G5034, G3012, G3298, G650, G331, G22961, G5758, G14096, G27816, G13000, G2033, G4037, G3500, G34394, G23387, G25763, G20764, G1779, G23701, G13193, G21533, G15171, G19054, G15131, G1375, G21371, G12861, G9692, G3073, G8883, G31970, G30520, G25177, G27276, G5653, G16296, G2133, G16455, G34649, G7042, G9342, G26194, G23482, G6556, G23164, G5106, G25300, G25266, G25304, G23645, G25904, G22912, G21794, G15078, G10181, G22919, G16488, G34736, G12763, G2280
3	crq	00020	Citrate cycle (TCA cycle)	8.23	1.48E-04	G23164, G25300, G25763, G25304, G20764
3	crq	01100	Metabolic pathways	1.27	1.48E-02	G23482, G34394, G25763, G9342
3	crq	00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4.26	2.79E-02	G32202, G25192, G4582, G5077, G3494, G33210, G33255, G5115, G5555, G11948, G31071, G23694, G4502, G732, G1703, G1900, G21588, G18212, G1543, G28190, G12279, G13687, G28274, G10525, G7023, G27586, G3387, G11817, G26894, G4635, G3304, G2853, G24036, G5649, G24712, G26976, G1172, G12546, G27592, G11965, G5571, G4085, G5375, G5652, G23471, G32582, G26985, G26901, G23358, G18432, G16773, G21360, G10473, G2172, G35349, G5185, G26391, G4452, G4972, G3885, G25420, G25620, G3526, G740, G2636, G25626, G16242, G15236, G34618, G1350, G34615, G18702
3	crq	00430	Taurine and hypotaurine metabolism	5.05	4.23E-02	G11447, G11879, G9178, G28086, G6441, G27078, G6503, G27105, G4954, G21626, G1867, G22517, G11085, G13469, G32646, G1140, G29381, G12565, G30766, G34613, G30069, G23072, G3035, G27237, G4644, G67, G3357, G28826, G21225, G22448, G21463, G20152, G31177, G12256, G16599, G2099, G11614, G11265, G19821, G5284, G4177, G23063, G3388, G35242, G23100, G2896, G5803, G21555, G22119, G18742, G13575, G14401, G10466
4	crq	03010	Ribosome	11.18	2.38E-62	G31970, G3077, G3298, G26024, G34551, G11926, G27610, G650, G2799, G17080, G1779, G1500, ND3, G31998
4	crq	03050	Proteasome	9.09	3.16E-14	G21555, G1768, G21245, G23072, G3035, G1892, G27237, G22452, G12561, G11265, G19821, G15119
4	crq	03040	Spliceosome	4.6	1.62E-13	G21555, G1768, G23072, G4818, G3035, G2485, G31807, G27237, G12561, G11265, G19821, G27008
4	crq	00190	Oxidative phosphorylation	3.14	3.88E-04	G11932, G29430, G10911, G22082, G26491, G29962, G2451, G2694, G6732, G4985, G20713, G204, G20332, G2609, G10984
4	crq	03015	mRNA surveillance pathway	3.18	1.10E-03	G27592, G32202, G5185, G5375, G33210, G27586, G11948, G26985, G3885, G26894, G3304, G2853, G18212, G18432, G16773, G1543, G16242, G21360, G13687, G2172, G12279
4	crq	03013	Nucleocytoplasmic transport	2.44	9.12E-03	G3430, COX2, COX1, ND1, CYTB, ND3, ND2, ND5, ND4
4	crq	04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	2.06	1.28E-02	G30487, G25784, G29415, G3710, G22696, G12500
5	crq	03010	Ribosome	7.41	1.68E-12	G32202, G25192, G4582, G3494, G5115, G5555, G11948, G4502, G732, G1703, G21588, G18212, G1543, G26190, G12279, G13687, G10525, G7023, G27586, G3387, G11817, G26894, G4635, G3304, G2853, G24036, G5649, G24712, G26976, G1172, G12546, G27592, G11965, G5571, G4085, G5652, G26985, G26901, G23358, G18432, G16773, G21360, G10473, G2172, G5185, G26391, G3885, G25420, G25620, G740, G2636, G25626, G16242, G15236, G34618, G34615, G18702
5	crq	00190	Oxidative phosphorylation	4.59	6.31E-04	G10612, G23299, G27538, G22524, G12273, G16951, G2151, G3185, G6211, G13317, G2450, G31680, G4232, G28015, G2650, G35288, G23342, G20567, G17254, G18762, G19412, G21991, G1774, G1993, G30759
5	crq	04137	Mitophagy - animal	4.65	8.54E-03	G18587, G25784, G11088, G2334, G30759, G3710, G27737, G30997, G12500
6	crq	03010	Ribosome	16.48	2.26E-55	G3185, G22181, G3430, G28015, G24310, G17795, G14056, G2026, G1780, G30759, G32778, G32842, G90
7	crq	04144	Endocytosis	4.04	4.91E-09	G20344, G5397, G25608, G25784, G11385, G2024, G11088, G30759, G10907, G21965, G12500
7	crq	04137	Mitophagy - animal	4.99	3.50E-04	G24405, G23180, G11208, G35235, G16231
7	crq	04145	Phagosome	2.82	1.88E-03	G2024, G14136, G2334, G1780, G2797
7	crq	04140	Autophagy - animal	2.97	3.47E-03	G11645, G5397, G22181, G3430, G2026, G27524, G18705, G26324, G16202, G2976, G27526, G23337
7	crq	04310	Wnt signaling pathway	2.9	6.82E-03	
7	crq	04142	Lysosome	1.92	4.51E-02	

Table S2. Table presenting the result of KEGG analysis performed using DAVID Bioinformatics Resources. GO term enrichment analysis was conducted on specifically overexpressed genes in each cluster obtained after scRNA-seq processing (genes with Log2FC > 0.25 and significant p-value < 0.001) to highlight the most relevant GO terms associated with a given gene list. The visualization of the different pathways can be obtained from the KEGG website using the KEGG prefix and KEGG number (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

Target	Primer name	Sequence
Laccase 24	LACC24-F	CCT-TGA-TTC-TTC-TTG-CCA-TCC-G
	LACC24-R	AAA-GCT-TGC-GAT-CTT-TGG-CAA
C-type lectin domain-containing protein	CLEC-F	ATC-GGC-TTC-TAC-ATG-GAC-TGA-C
	CLEC-R	GTG-TCT-AAA-GCT-GCG-CCG-AT
Putative modulator of levamisole receptor-1	LEVAR-F	GTG-ACA-GAC-TTC-CCT-CAC-CCT
	LEVAR-R	GCA-CTG-AGT-CGA-GTC-GTA-TGT
EGF-like domain-containing protein 8	EGFL-F	GAG-TGT-TTG-ACA-GGA-CGA-AGC
	EGFL-R	CAT-CAT-CGT-TTC-CAA-CTG-AGG-C
X-Box binding protein-like domain	XBOX-F	GGG-TCA-ACA-GTG-CTA-GGC-AAT
	XBOX-R	GTA-AGC-CAC-CAT-CCC-TAC-CAC
Transglutaminase-like domain containing protein	TGC-F	CTA-CAA-GCT-GGA-CAC-CAC-CAA
	TGC-R	GCA-TTG-ACC-AGT-GAC-ACA-GTC
MD-2-related lipid-recognition domain containing protein	MLDP-F	CTT-GGA-CCT-CGT-TAT-CTT-CGC
	MLDP-R	CTC-CCT-CTG-GTC-CAC-AAA-CAA
High mobility group protein B1	HMGB1	GCC-CAC-GCT-GAA-CTA-TAC-AAG
	HMGB1	CAC-CTT-GTA-GTC-CCT-GAG-TGG
Galectin	GAL-F	CCA-CAG-TAT-CAA-CGA-CCC-TCC
	GAL-R	TCA-CTA-CCG-TCA-TAG-GGA-CCG
Cubilin	CUBN-F	TAA-GTT-CAC-TCT-GGC-CCA-AGG
	CUBN-R	GCT-CAT-GAT-CGT-AGT-GGT-GCT
Natterin-1	NAT1-F	CCG-TAC-GAT-GGT-GAG-GAG-AAA
	NAT1-R	CCG-TCC-CAC-ATA-CTT-GTC-GTT
Caveolin	CAV-F	TCC-AAA-TGA-CCA-TGA-CCC-AGA
	CAV-R	ACT-CTA-TTC-TTG-GTC-GCC-TGG
G Protein receptor F1-2 domain-containing protein	GPROT-F	CGA-ACG-CCT-GCT-TCT-GAT-ATG
	GPROT-R	TCC-ACA-TCG-AAT-GCT-CTG-TCT
DBH-like monooxygenase protein 1	MOX-F	CCT-CCG-CAG-CAA-GAA-GAA-GTA
	MOX-R	TTC-TGT-TTC-GTC-CTC-TCC-ACG
Ribosomal protein S6	RPS6-F	CAG-AAG-TGC-CAG-CTG-ACA-GTC
	RPS6-R	AGA-AGC-AAT-CTC-ACA-CGG-AC
Big Defensin 1&2	BigDef1-2-F	TTC-GCC-TGC-TTC-CAT-ACT-GG
	BigDef1-2-R	GTC-ATG-GTC-ACT-CCT-TAT-TC
Hemocyte defensin	HemDef-F	CTA-CCA-GTT-GTT-CAT-ACA-GAG
	HemDef-R	TCT-TGG-TCA-GAT-TCA-GTC-TGG
Bactericidal Permeability Increasing Protein	BPI	GGA-GGC-GGA-AAT-GGA-TTA-CT
	BPI	TGG-TTG-ACA-TCG-TTG-CTG-AC

Table S3. Sequences of primers used in this study. Name of the transcript targeted by the primer pair, name of the primer used in this study and nucleotide sequence of each primer.

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
1	H	46.43	9.47	4.73	37.50	59.63
1	ML	20.26	9.09	4.55	7.34	28.38
1	BBL	14.47	2.29	1.15	12.16	16.50
1	ABL	15.50	4.94	2.47	8.11	18.35
1	G	0.35	0.44	0.22	0.00	0.92
1	BGC	0.38	0.75	0.38	0.00	1.50
1	VC	2.62	1.97	0.98	0.92	5.41

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
2	H	20.17	5.26	2.63	14.10	26.56
2	ML	27.64	4.48	2.24	22.79	33.33
2	BBL	27.21	9.94	4.97	16.22	39.71
2	ABL	20.17	2.36	1.18	16.91	22.52
2	G	1.14	0.79	0.39	0.00	1.80
2	BGC	1.03	1.26	0.63	0.00	2.56
2	VC	2.64	1.56	0.78	0.74	4.50

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
3	H	12.49	3.78	1.89	10.08	18.04
3	ML	28.26	8.90	4.45	17.12	38.66
3	BBL	21.18	3.11	1.55	16.89	24.32
3	ABL	17.71	5.78	2.89	11.86	25.21
3	G	7.96	5.30	2.65	3.09	14.41
3	BGC	4.71	4.16	2.08	0.00	10.14
3	VC	7.68	2.87	1.43	4.20	10.81

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
4	H	7.82	5.97	2.99	2.20	14.29
4	ML	32.69	13.33	6.66	19.34	50.82
4	BBL	9.64	3.40	1.70	4.76	12.30
4	ABL	5.37	0.97	0.48	4.42	6.67
4	G	18.29	10.39	5.19	5.74	30.94
4	BGC	3.90	1.51	0.76	2.20	5.71
4	VC	22.29	8.25	4.12	11.48	30.77

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
5	H	4.29	4.41	2.21	0.76	10.45
5	ML	19.67	12.04	6.02	3.03	30.88
5	BBL	3.56	1.91	0.95	1.49	6.06
5	ABL	3.35	2.12	1.06	0.75	5.88
5	G	40.92	7.31	3.66	33.82	49.24
5	BGC	4.50	2.98	1.49	1.47	8.33
5	VC	23.71	4.48	2.24	17.91	28.79

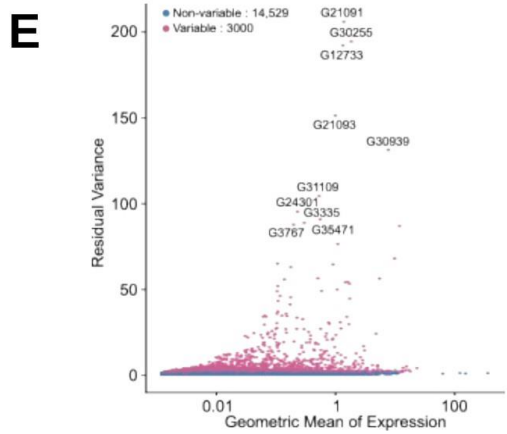
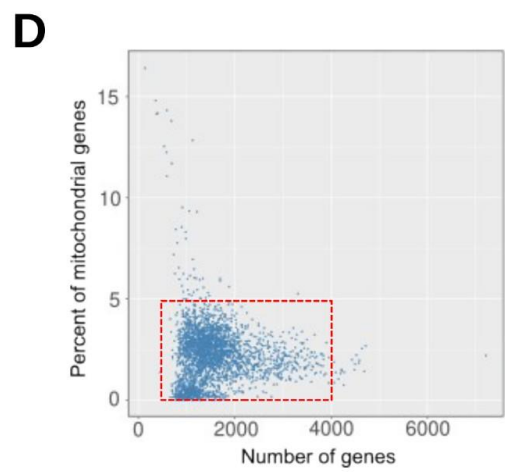
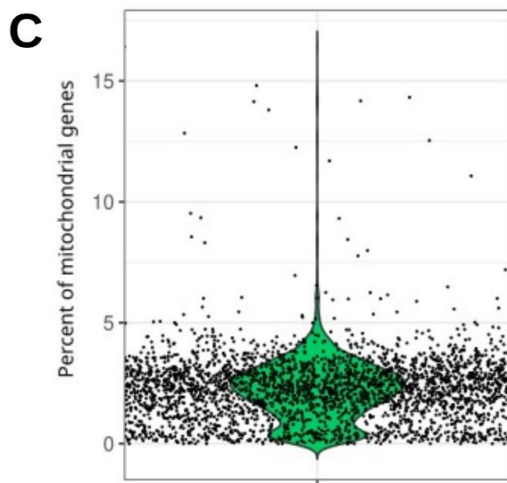
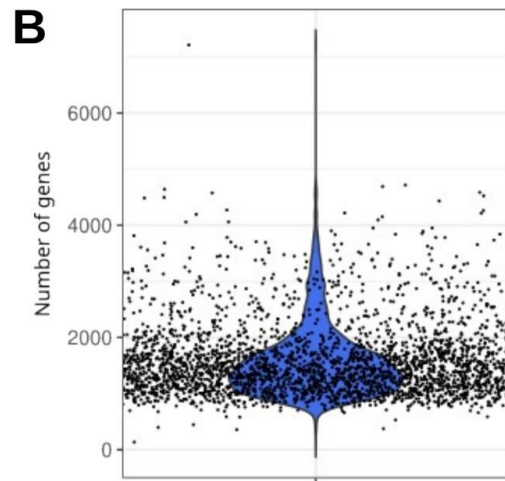
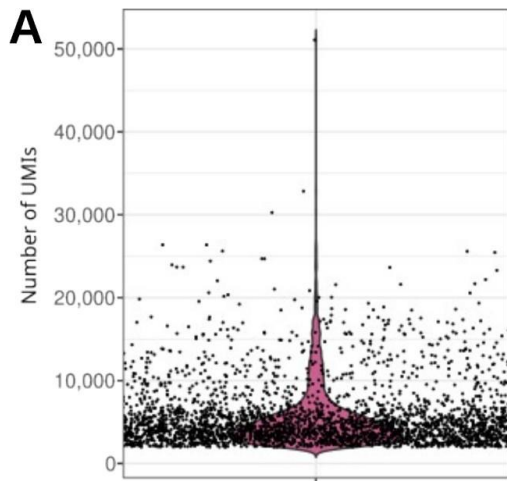
Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
6	H	3.57	3.82	1.91	0.65	9.09
6	ML	13.95	4.91	2.45	7.10	18.18
6	BBL	1.19	1.38	0.69	0.00	2.58
6	ABL	1.54	0.65	0.33	0.65	2.17
6	G	68.00	10.11	5.06	58.70	78.46
6	BGC	1.69	1.99	1.00	0.00	3.87
6	VC	10.06	5.30	2.65	3.08	15.94

Fraction	Cells	Average	Std.Dev.	Std.Error	Min	Max
7	H	2.43	3.04	1.52	0.00	6.31
7	ML	8.50	6.35	3.18	1.93	17.05
7	BBL	1.67	1.51	0.75	0.00	3.38
7	ABL	0.36	0.72	0.36	0.00	1.45
7	G	81.18	8.99	4.49	68.18	88.41
7	BGC	2.68	1.50	0.75	0.90	4.55
7	VC	3.18	2.92	1.46	0.00	6.82

Table S4. Hemocyte composition of the 7 Percoll fractions used for qPCR analysis. For each cell type in each fraction, the table presents the average percentage, standard deviation, standard error, minimum, maximum, and median count values.

Blast alignment results										Homo sapiens Homologs	
Gene Number	Annotation Name	TF Name	Best Hit Blast Name	Specie	Accession number	Bit Score	Percentage Identity	Coverage	Name	Uniprot Number	
G29966	Krüppel-like factor 15	CgKLF6	Krüppel-like factor 6	C.gigas	XP_011428991	659.448	100	100	HsKLF6	Q95600	
G30997	BHLH domain-containing protein	CgTFEB	Transcription factor EC isoform X1	C.gigas	XP_011447558	1089.72	100	100	HsTFEB	P19484	
G17147	BZIP domain-containing protein	CgCR3L1	cAMP-responsive element-binding protein 3-like protein 1 isoform 1	H.sapiens	NP_443096	1060.06	100	100	HsCR3L2	Q70SY1	
G3043	Transcriptional regulator	CgMYC	Transcriptional regulator Myc-A-like	C.angulata	XP_052688275	548.128	100	100	HsMYC	P01106	
G31054	GATA-binding factor 3	CgGATA3	Transcription factor GATA-3 isoform X1	C.gigas	XP_011412780	966.066	100	100	HsGATA2	P23769	
G11196	BZIP domain-containing protein	CgFOS	Proto-oncogene c-Fos	C.gigas	XP_011446784	664.84	100	100	HsATF3	P18847	
G10637	BZIP domain-containing protein	CgFOS2	Fos-related antigen 2	C.gigas	XP_011439871	271.937	100	100	HsATF4	P18848	
G2123	SPRY domain-containing SOCS box protein 3	CgSOCS3	SPRY domain-containing SOCS box protein 3	C.gigas	XP_011413771	488.804	100	100	HsSPSB4	Q26844	
G1708	SoxE	CgSOX8	Transcription factor Sox-8-like	C.gigas	NP_001295801	947.192	99.9	100	HsSOX9	P48436	
G3506	BZIP domain-containing protein	CgATF5	cAMP-dependent transcription factor ATF-4	C.gigas	XP_011439092	566.614	85.9	100	HsATF5	Q9Y2D1	
G11198	BZIP domain-containing protein	CgFOS3	Fos-related antigen 1	C.gigas	XP_034323853	456.062	100	99.62	none	none	
G10636	BZIP domain-containing protein	CgATF1	Basic leucine zipper transcription factor ATF-like isoform X1	C.gigas	XP_011439867	270.011	100	99.41	none	none	
G13535	BZIP domain-containing protein	CgJUNB	Transcription factor jun-B isoform X1	C.gigas	XP_011440861	224.557	100	99.33	none	none	
G21091	X-box binding protein like protein	CgXBOX	X-box binding protein-like protein	C.sakensis	AEF33390	375.491	80.5	99.12	none	none	
G12164	Estrogen receptor	CgRXRB	Estrogen receptor beta	C.gigas	XP_011424805	1395.56	100	98.79	HsRXRA	P19793	
G748	Interferon regulatory factor	CgIRF1	Interferon regulatory factor 1 isoform X1	C.gigas	XP_011449592	802.742	100	95.51	HsIRF1	P10914	
G5204	ETS-related transcription factor Eif-3	CgELF3	ETS homologous factor isoform X1	C.gigas	XP_034310128	883.248	100	95.25	HsELF3	P78545	
G26398	ETS domain-containing protein	CgELK3	ETS domain-containing protein Elk-3 isoform X1	C.gigas	XP_011421195	753.051	100	93.91	HsELK3	P41970	
G35512	cAMP-responsive element modulator	CgCREM	cAMP-responsive element modulator isoform X2	C.gigas	XP_011448206	572.778	100	92.79	HsCREB1	P16220	
G11013	BZIP domain-containing protein	CgTEF	Thyrotroph embryonic factor-like	C.virginica	XP_022332233	570.466	86.4	85.1	HsTEF	Q10587	
G7003	ETS-related transcription factor Eif-4	CgELF2	ETS-related transcription factor Eif-2	C.gigas	XP_011447491	523.857	99.6	84.54	HsELF1	P32519	
G27920	LIM domain transcription factor LMO4.1	CgLMO4	LIM domain transcription factor LMO4.1 isoform X2	C.gigas	XP_011443581	319.316	96.2	81.86	HsLMO4	P61968	
G10865	BZIP domain-containing protein	CgVBP	Transcription factor VBP	C.gigas	XP_011457057	438.343	100	77.95	HsVBP	Q16534	
G35439	BZIP domain-containing protein	CgCEBPg	CCAAT/enhancer-binding protein beta	C.gigas	XP_011452433	442.195	100	75.61	HsCEBPg	P53567	
G2334	Proto-oncogene c-Jun	CgJUN	Transcription factor AP-1	C.gigas	XP_034313954	429.098	100	58.31	HsJUN	P06627	
G26127	Krüppel-like factor 5	CgKLF5	Krüppel-like factor 5 isoform X1	C.gigas	XP_011421316	905.975	100	57.28	HsKLF7	O75840	
G20682	cAMP-responsive element-binding protein-like 2	CgCRBL1	cAMP responsive element binding protein-like, partial	C.gigas	AAU93879	318.546	96.4	56.83	HsCRBL2	O60519	
G17294	Runt-related transcription factor 1	CgRUX1	Runt-related transcription factor 1-like isoform X5	C.angulata	XP_052711215	1085.86	100	56.68	HsRUX3	Q13761	
G10077	BZIP domain-containing protein	CgCR3L4	Clumping factor A isoform X1	C.gigas	XP_011425092	775.393	100	56.11	HsCR3L3	Q68CJ9	
G2021	BHLH domain-containing protein	CgTAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1-like isoform X1	C.gigas	XP_011439324	394.045	100	49.23	HsTAL2	Q16559	
G2933	Putative transcription factor SOX-14	CgSOX11	Transcription factor Sox-11	C.gigas	XP_011445203	424.091	100	43.97	HsSOX12	O15370	
G11358	BZIP domain-containing protein	CgGIANT	Protein giant	C.gigas	XP_011417277	486.108	100	38.41	HsTEF	Q10587	
G6354	ETS domain-containing protein	CgPU1	ETS-related transcription factor Eif-3	C.gigas	XP_034320185	189.119	100	36	HsPU1	P17947	
G10633	BZIP domain-containing protein	CgFOS1	Fos-related antigen 1	C.gigas	XP_019918193	371.719	99.5	31.4	HsFOSL1	P15407	
G6394	ETS domain-containing protein	CgSPDEF	SAM pointed domain-containing Ets transcription factor-like isoform X2	C.gigas	XP_052697855	356.681	99.4	30.12	HsSPDEF	Q95238	
G32716	cAMP-responsive element-binding protein-like 2	CgCRBL2	cAMP-responsive element-binding protein-like 2 isoform X1	C.gigas	XP_034309865	297.745	83.4	26.7	HsCRBL2	O60519	

Table S5. Transcription factors identified in the scRNA-seq dataset of *Crassostrea gigas* hemocytes. Transcription factors identified in the scRNA-seq dataset and their homology with human proteins, as indicated by the blast alignment results. Each entry includes the gene identifier, the protein it represents in *C.gigas*, and its human counterpart. The bit score and coverage indicate the strength and extent of the alignment, respectively.



F

Number of cells before filtering	2937
Average number of genes detected by cell	1578 ± 643
Average number of UMIs detected by cell	5552 ± 3848
Filtering parameters	
Cells with gene between 750 and 4000	
Cells with less than 5 % of mitochondrial genes	
Number of cells after filtering	2817
Average number of genes detected by cell	1568 ± 590
Average number of UMIs detected by cell	5432 ± 3462

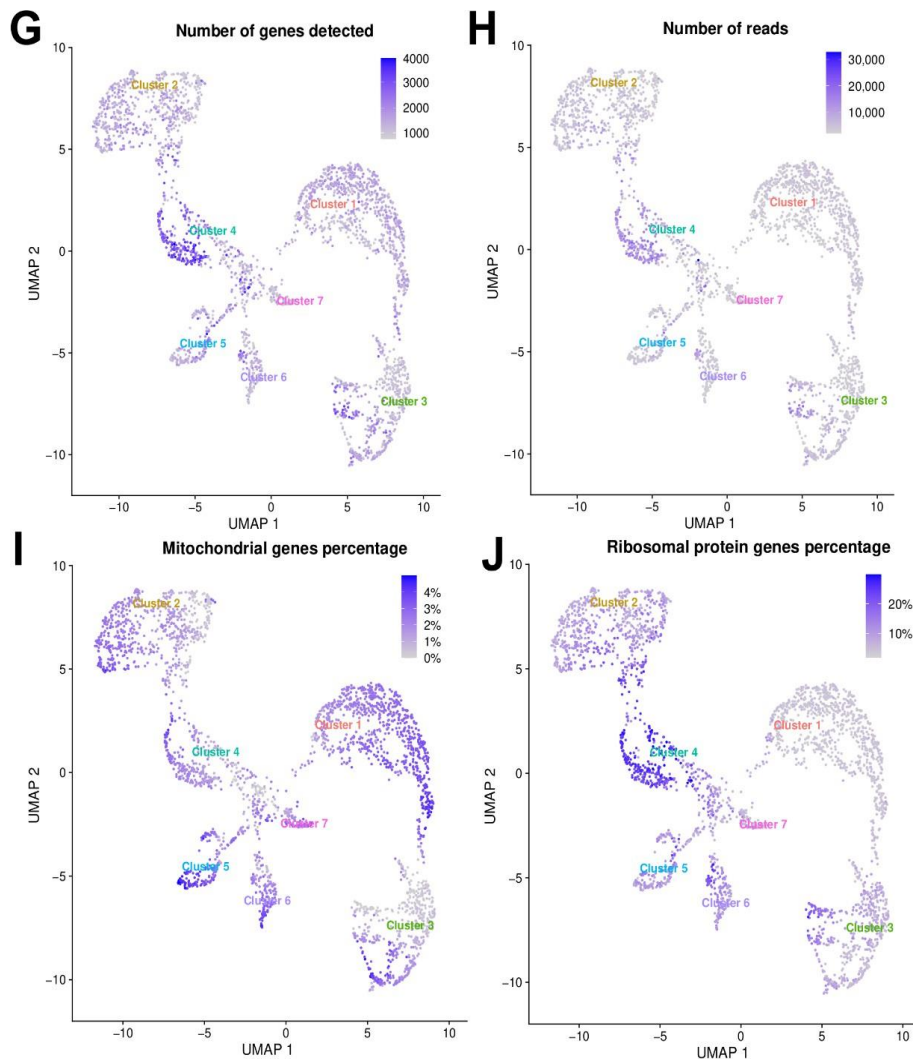


Figure S1. ScRNA-seq quality control metrics. Distribution of **A)** unique molecular identifiers (UMIs), **B)** genes and **C)** percentage of mitochondrial genes detected per cell. Each dot represents one cell. **D)** Plot of the percentage of mitochondrial genes versus the number of genes detected in each cell. The red box represents the cells selected for further analysis (number of genes detected between 750 and 4000 and with a percentage of mitochondrial genes less than 5%) **E)** The *FindVariableFeatures()* function was used to identify features with high cell-to-cell variation in the dataset to highlight the biological signal in the single cell dataset. **F)** Table summarizing some quality control metrics. The table shows the thresholds to remove poor quality cells (doublets or empty droplets). The number of cells, UMIs and genes before and after filtering are shown. **G)** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plot of the cells with the number of expressed genes. **H)** UMAP plot of the number of reads per cell. **I)** UMAP plot of the percentage of mitochondrial genes in each cell. **J)** UMAP graph of the percentage of ribosomal protein transcripts in each cell.

A

Stage	Number of CDS	% of CDS
Input	30,724	100
Database querying		
Blast annotated	30,511	99.3
Interpro annotated	30,718	99.9
EggNogg annotated	12,630	41.1
Blast2Go		
Mapped	28,570	92.9
Annotated	22,462	73.1

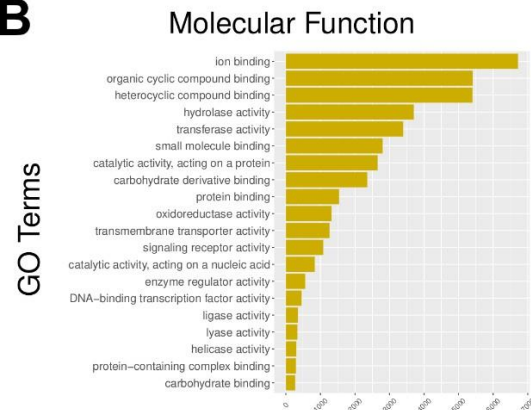
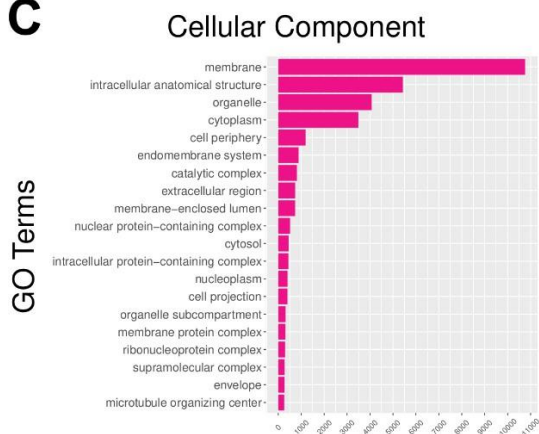
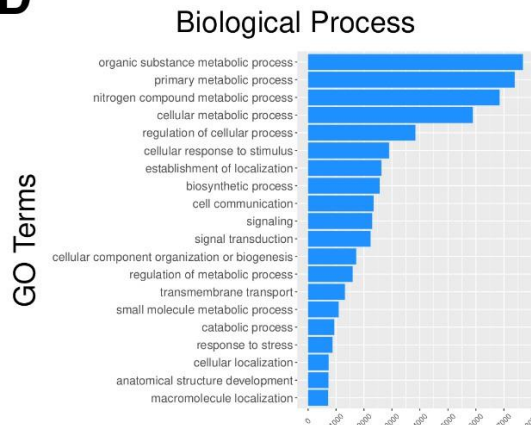
B**C****D**

Figure S2. Results of the *C. gigas* genome re-annotation. **A)** The number and percentage of Coding DNA Sequences (CDS) with valid annotation after each annotation step are shown. A BLAST query was performed against the TrEMBL/Uniprot database and InterproScan annotation against Pfam, PrositeSiteProfiles, CDD, TIGRFAM, PRINTS, SMART, SUPERFAMILY and Hamap databases. Blast and InterProScan results were compiled and processed using Blast2Go. A first mapping step was used to enrich the Blast result with GO-terms, and the annotation step was used to optimize and validate the GO-terms annotations. **B), C)** and **D)** show the distribution of the various categories of GO-terms across the three primary domains of Gene Ontology : Molecular Function, Cellular Component and Biological Process, respectively.

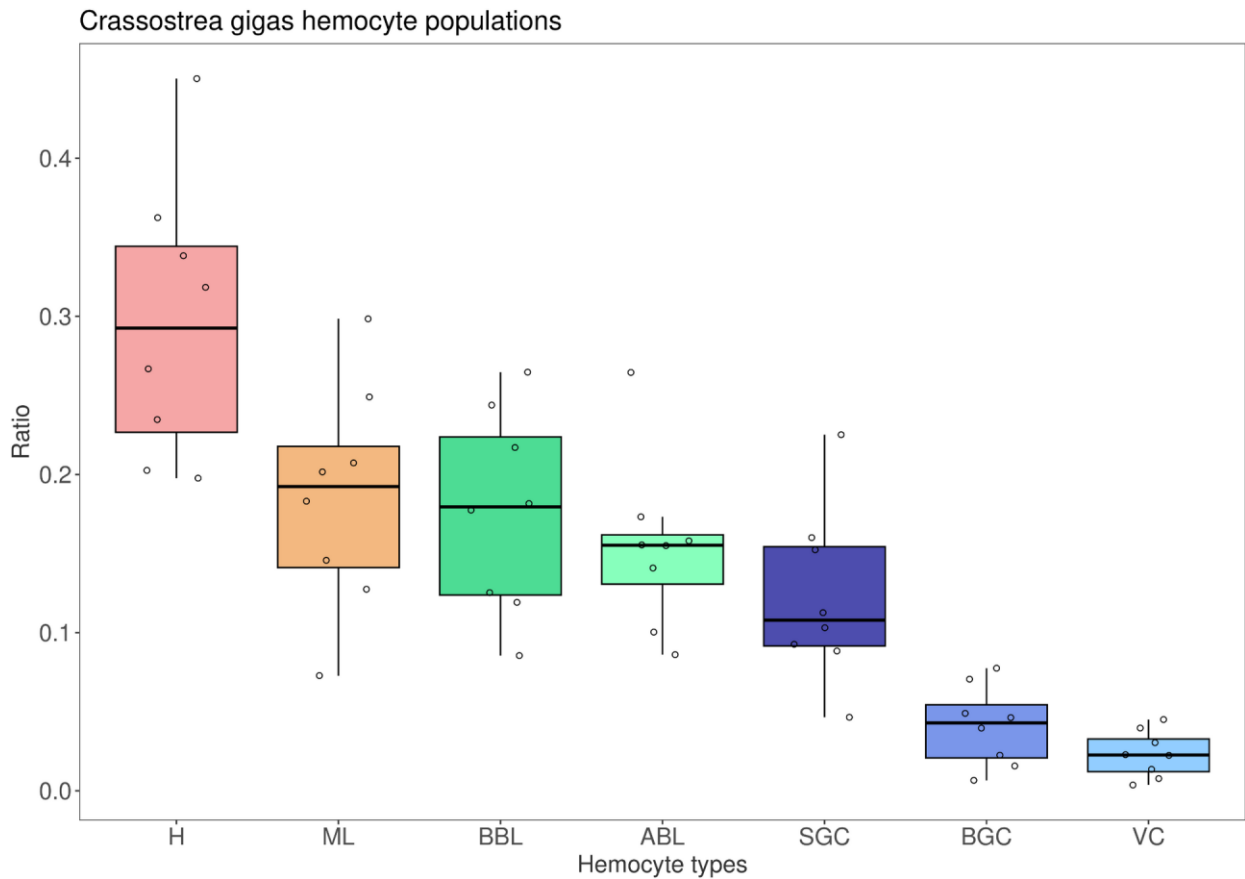
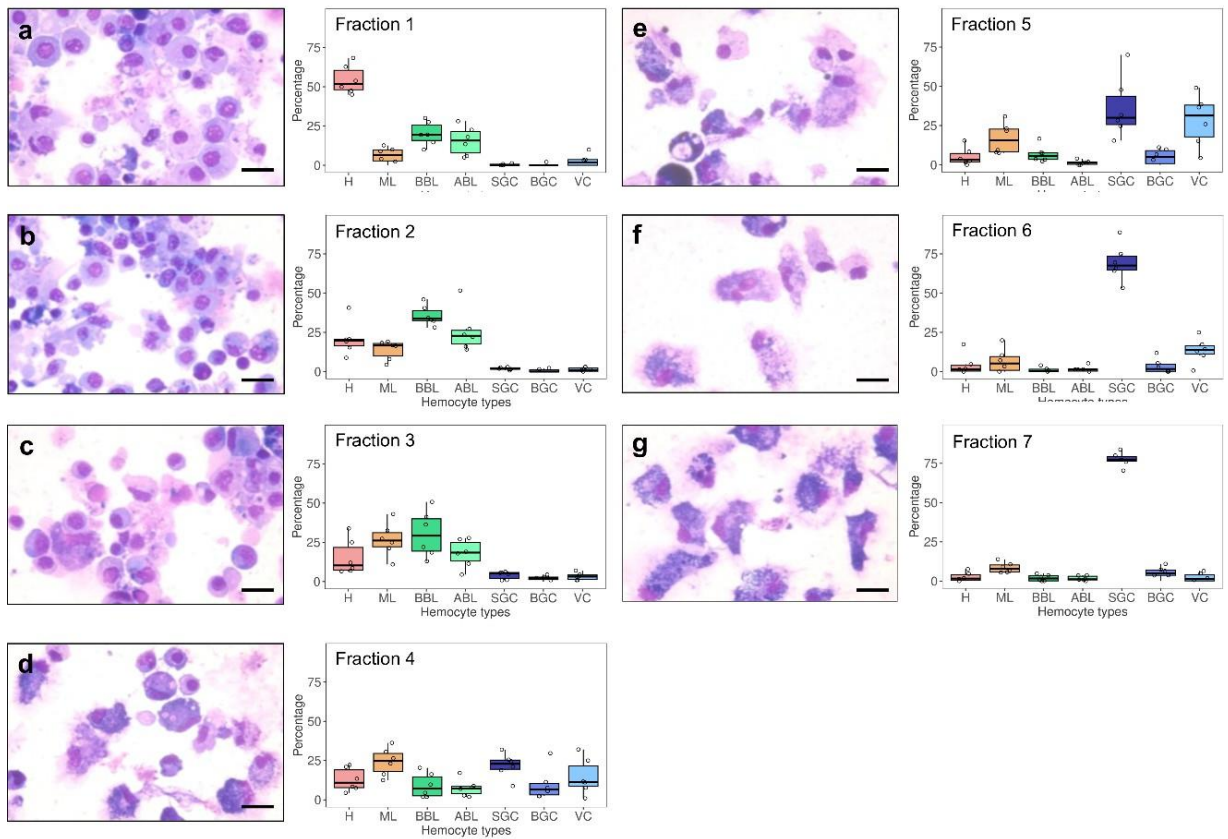


Figure S3. Whisker plot showing the distribution of counts of different hemocyte populations. Hemolymph was collected from eight different oysters and hemocytes were plated on a slide using cytopspin centrifugation. The proportion of each hemocyte type in these hemolymphs was calculated after MCDH staining. **H** : Hyalinocytes, **ML** : Macrophage-Like cells, **BBL** : Basophilic Blast-Like cells, **ABL** : Acidophilic Blast-Like cells, **SGC** : Small Granule Cells, **BGC** : Big Granule Cells, and **VC** : Vesicular Cells. The calculation of the proportion of each cell type in these hemolymphs reveals a heterogeneous composition of hemocytes between individuals as well as between cell types.

A



B

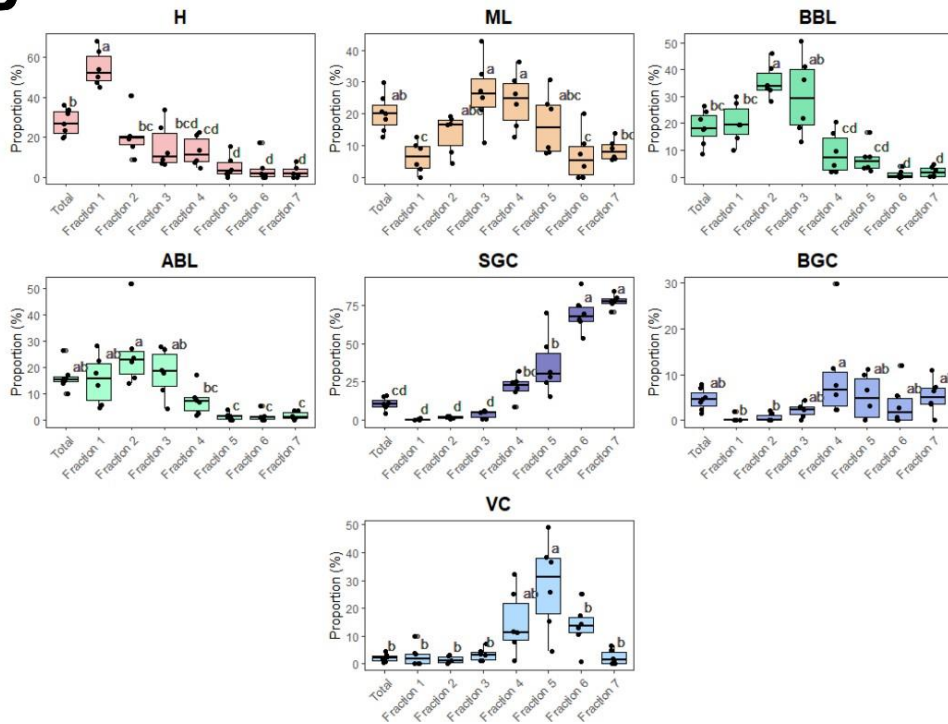


Figure S4. Statistical significance of enrichment in different hemocyte types in Percoll gradient fractions. (A) a,b,c,d,e,f, and g : MCDH staining of cells from the 7 fractions

isolated from the percoll gradient in (B). Scale bar : 10 μm . **Fraction 1 to 7** : Quantification of the different types of hemocytes found in each of the 7 fractions from 5 independent fractionation experiments. **(B)** Statistical significance of enrichment of different hemocyte types in Percoll gradient fractions. Results are from six independent experiments. Statistical significance is indicated by letters, as different letters indicate a significant difference between enrichments of cell types within the Percoll density gradient fractions (ANOVA, Tukey's test, p-value <0.05). Hyalinocytes (**H**) were significantly enriched in the first fraction compared to the other fractions and compared to unsorted hemocytes. However, they were significantly depleted in fractions 4, 5, 6 and 7 compared to unsorted hemocytes. Macrophage-like cells (**ML**) were significantly enriched in fractions 3 and 4 compared to fractions 1, 6 and 7. They were depleted in fraction 1 compared to unsorted hemocytes. Acidophilic blasts (**ABL**) were significantly depleted in fractions 4, 5, 6, and 7 compared to unsorted hemocytes. Basophilic blasts (**BBL**) were significantly enriched in fractions 2 and 3 compared to fractions 4, 5, 6, and 7 and in fraction 1 compared to fractions 6 and 7. Compared to unsorted hemocytes, basophilic blasts (**BBL**) were significantly enriched in fraction 2 and depleted in fractions 6 to 7. Small granule cells (**SGC**) were significantly depleted in fractions 1, 2, and 3 compared to fractions 4, 5, 6, and 7, and also significantly depleted in fractions 4 and 5 compared to fractions 6 and 7. In addition, small granule cells (**SGC**) were significantly enriched in fractions 5, 6, and 7 compared to unsorted hemocytes. The distribution of the big granule cells (**BGC**) showed a significant enrichment in fraction 4, compared to fractions 1 and 2, but no significant changes were observed with unsorted hemocytes. Vesicular cells (**VC**) were enriched in fraction 5 compared to fractions 1, 2, 3, 6, 7 and unsorted hemocytes in fractions 1, 2, and 3 compared to fraction 5 and enriched in fraction 5 compared to fraction 7 and unsorted hemocytes.

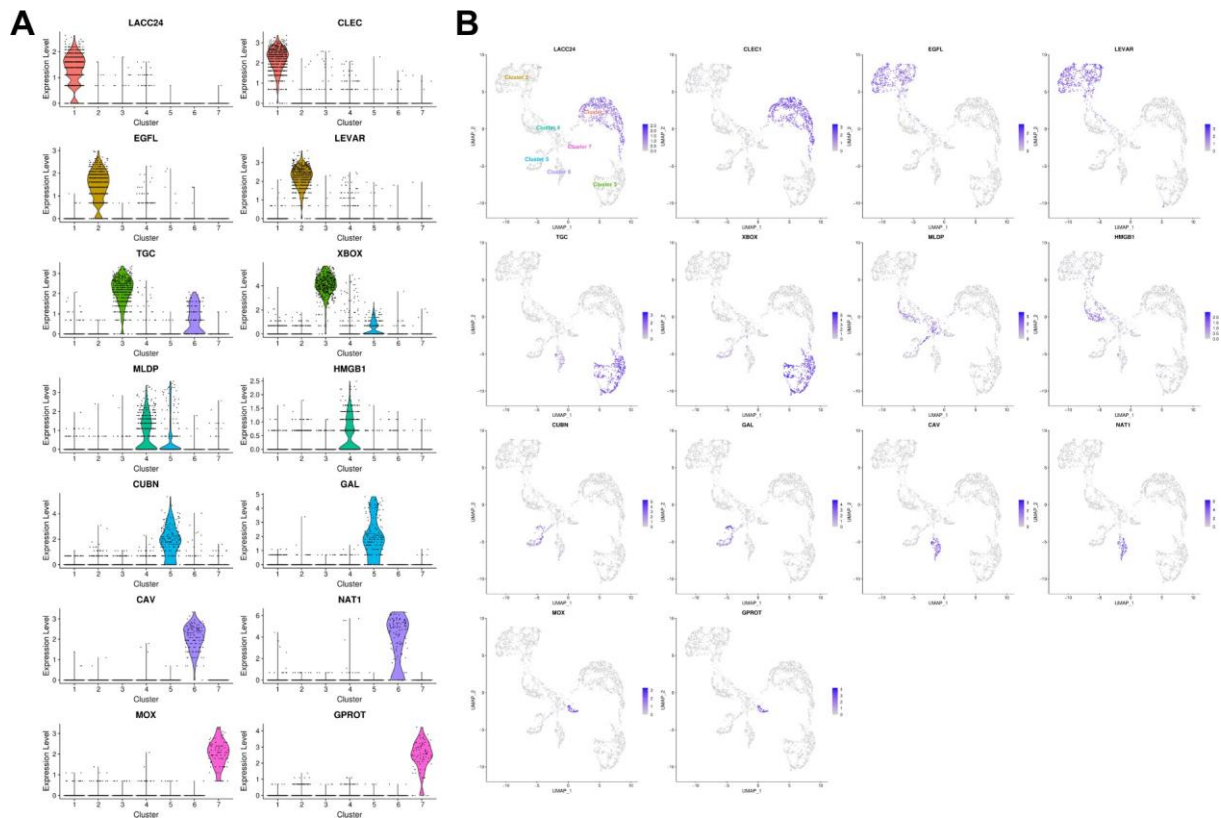


Figure S5. Cluster specificity and expression level of the 14 selected cluster markers A) Violin graph showing the average expression level (Log2FC) of the 14 selected marker transcripts specific to the different scRNA-seq clusters. **B)** Identification of cells expressing the selected markers on the UMAP plot. Positive cells are colored purple according to the Log2FC value. **LACC24** and **CLEC** are specific of cluster 1, **EGFL** and **LEVAR** of cluster 2, **TGC** and **XBOX** of cluster 3, **MLDP** and **HMGB1** of cluster 4, **CUBN** and **GAL** of cluster 5, **CAV** and **NAT1** of cluster 6 and **MOX** and **GPROT** of cluster 7. **LACC24** : Laccase 24, **CLEC** : C-type lectin domain-containing protein, **EGFL** : EGF-like domain-containing protein 8, **LEVAR** : Putative regulator of levamisole receptor-1, **TGC** : TGc domain-containing protein, **XBOX** : X- box binding protein-like protein, **MLDP** : ML domain-containing protein, **HMGB1** : High mobility group protein B1, **CUBN** : Cubilin, **GAL** : Galectin, **CAV** : Caveolin, **NAT1** : Natterin-1, **MOX** : DBH-like monooxygenase protein 1, **GPROT** : G protein receptor F1-2 domain- containing protein.

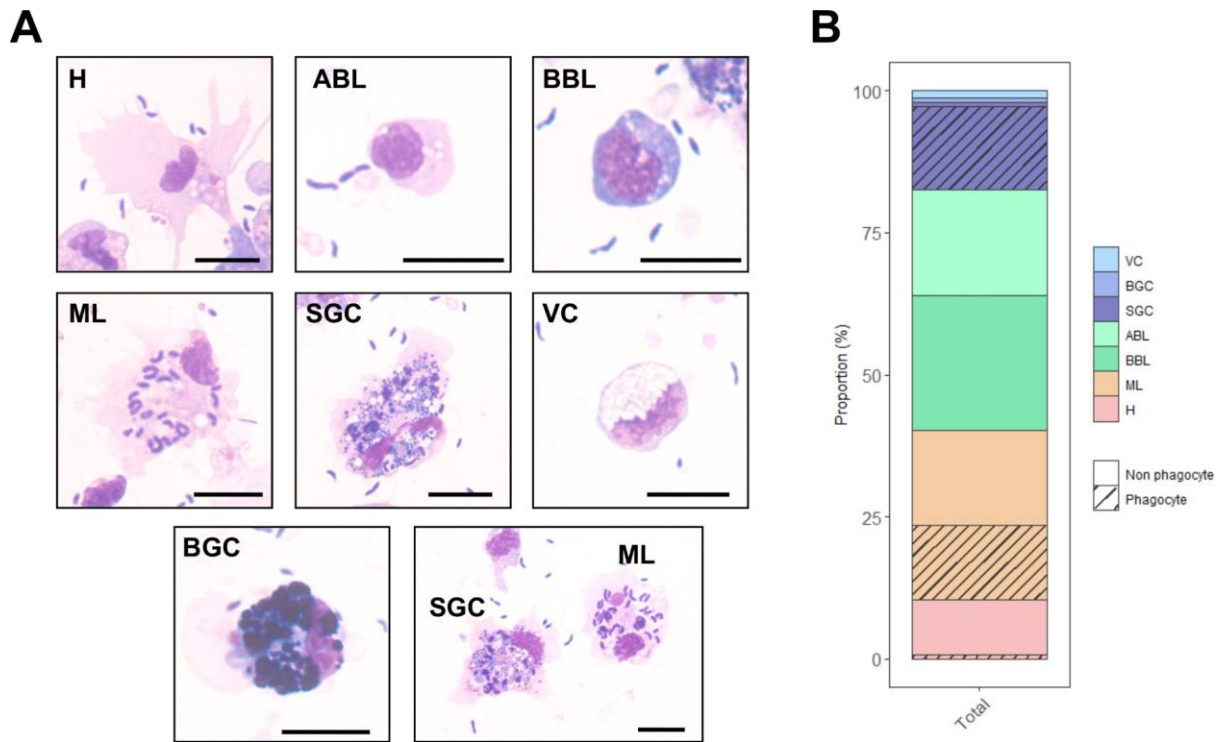


Figure S6. Measurement of the ability of *C.gigas* hemocytes to phagocytose *Vibrio tasmaniensis* LMG20012^T. Oyster hemocytes were challenged with non-pathogenic *Vibrio tasmaniensis* LMG20012^T and phagocytosis was measured by observing intracellular bacteria after MCDH staining. **(A)** MCDH staining of hemocytes after phagocytosis assay. Scale bar : 10µm. **(B)** Bar plot showing the proportion of each cell type and the proportion of phagocytic cells. **H** : Hyalinocytes, **ABL** : Acidophilic Blast-Like cells, **BBL** : Basophilic Blast-Like cells, **ML** : Macrophage-Like cells, **SGC** : Small Granule Cells, **VC** : Vesicular Cells and **BGC** : Big Granule Cells.

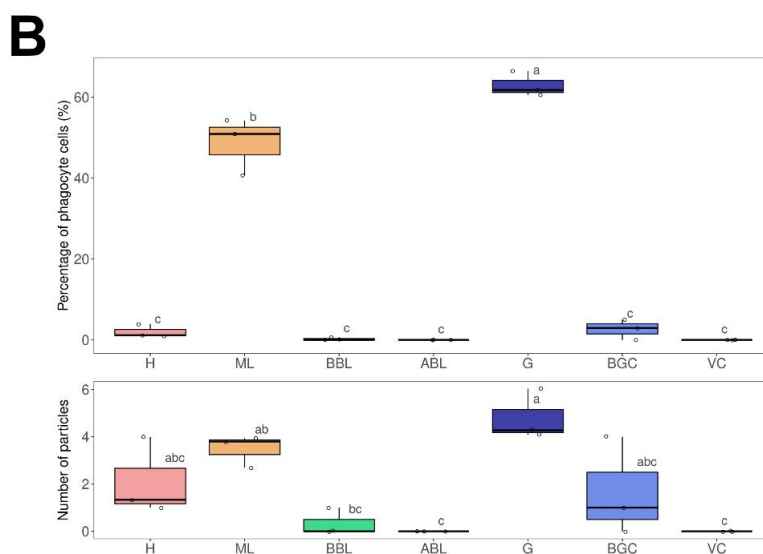
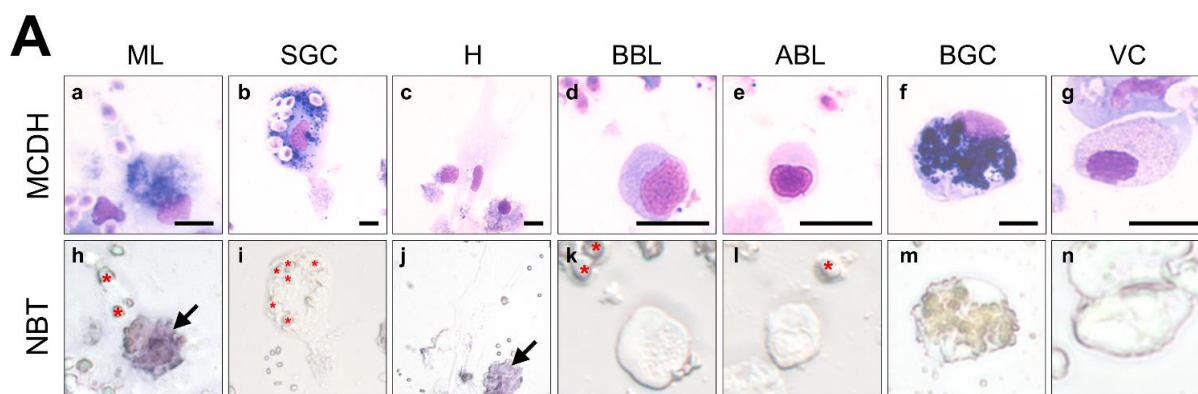


Figure S7. NBT (NitroBlueTetrazolium) staining of oyster hemolymph exposed to zymosan particles. (A) Hemocyte morphology after MCDH staining : Macrophage Like (a), Small Granule Cells (b), Hyalinocyte (c), Basophilic (d) and Acidophilic (e) Blast cells, Big Granule Cells (f) and Vesicular Cells (g). NBT staining of the different hemocyte types (h-n). Red stars show zymosan and bacteria particles. Black arrows identify Macrophage-Like cells. Scale bar : 10 μ m. **(B)** Quantification of the phagocytic activity of each cell type for zymosan particles from 3 independent experiments. Results of quantification of the phagocytic activity of each cell type and number of zymosan particles per cell type. The graph shows the result of 3 independent experiments.

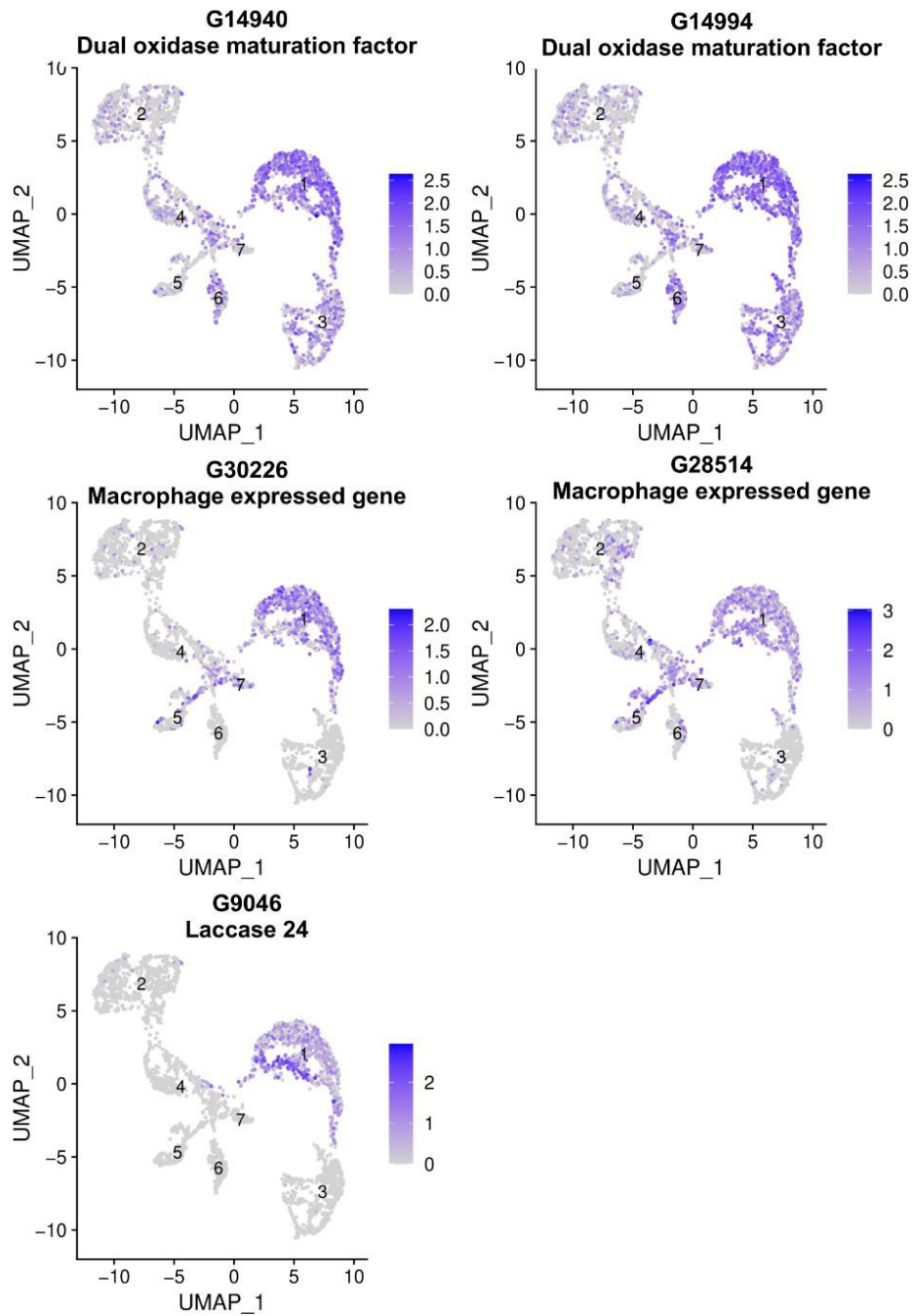


Figure S8. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plots of cells expressing Macrophage-Like markers. Cluster numbers are indicated on each cluster. Each point in the UMAP plot represents a single hemocyte, and the clustering of these points reveals the distinct transcriptional profiles of macrophage-like specific markers within the hemocyte population.

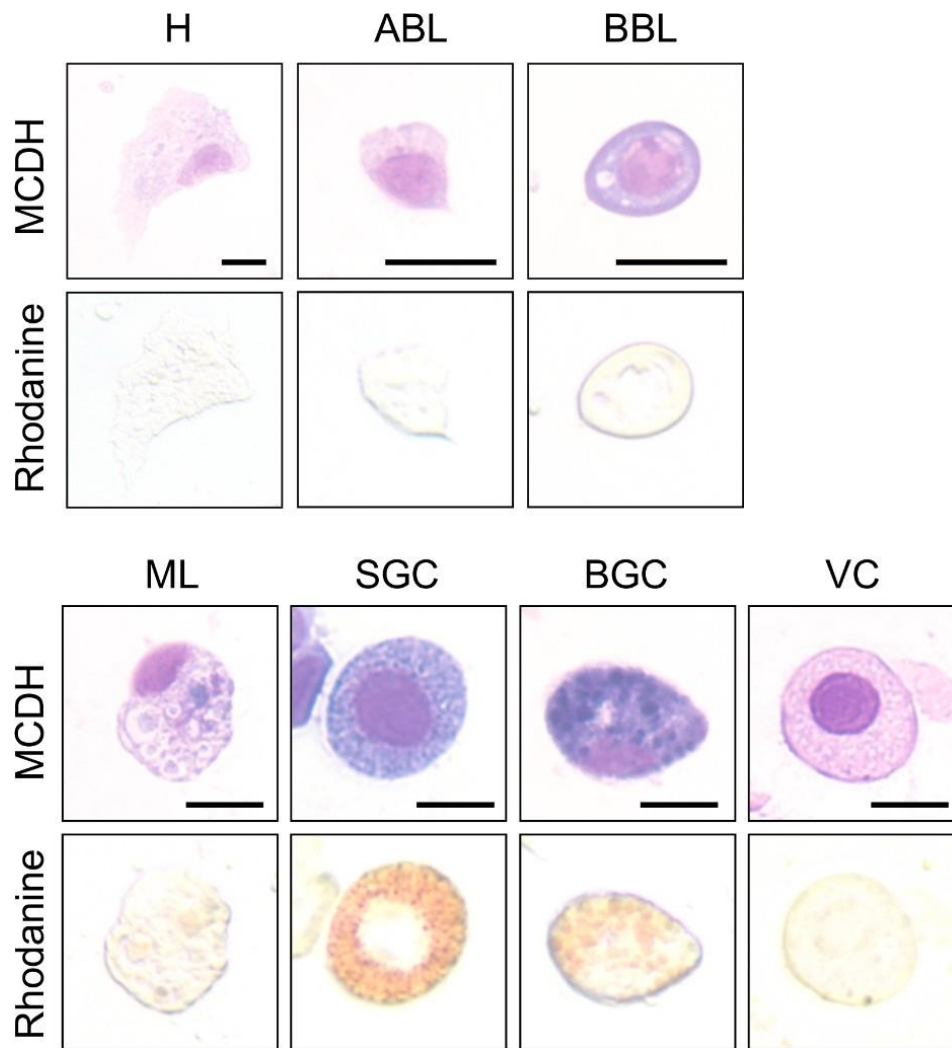


Figure S9. Labeling of intracellular copper stores in *C.gigas* hemocytes. MCDH (upper panels) and rhodanine (lower panels) staining of oyster hemocytes to reveal copper accumulation. Cells were first processed for copper staining and then stained according to MCDH protocol. **H** : Hyalinocytes, **ABL** : Acidophilic Blast-Like cells, **BBL** : Basophilic Blast-Like cells, **ML** : Macrophage-Like cells, **SGC** : Small Granule Cells, **VC** : Vesicular Cells and **BGC** : Big Granule Cells. Bar : 10 μ m.

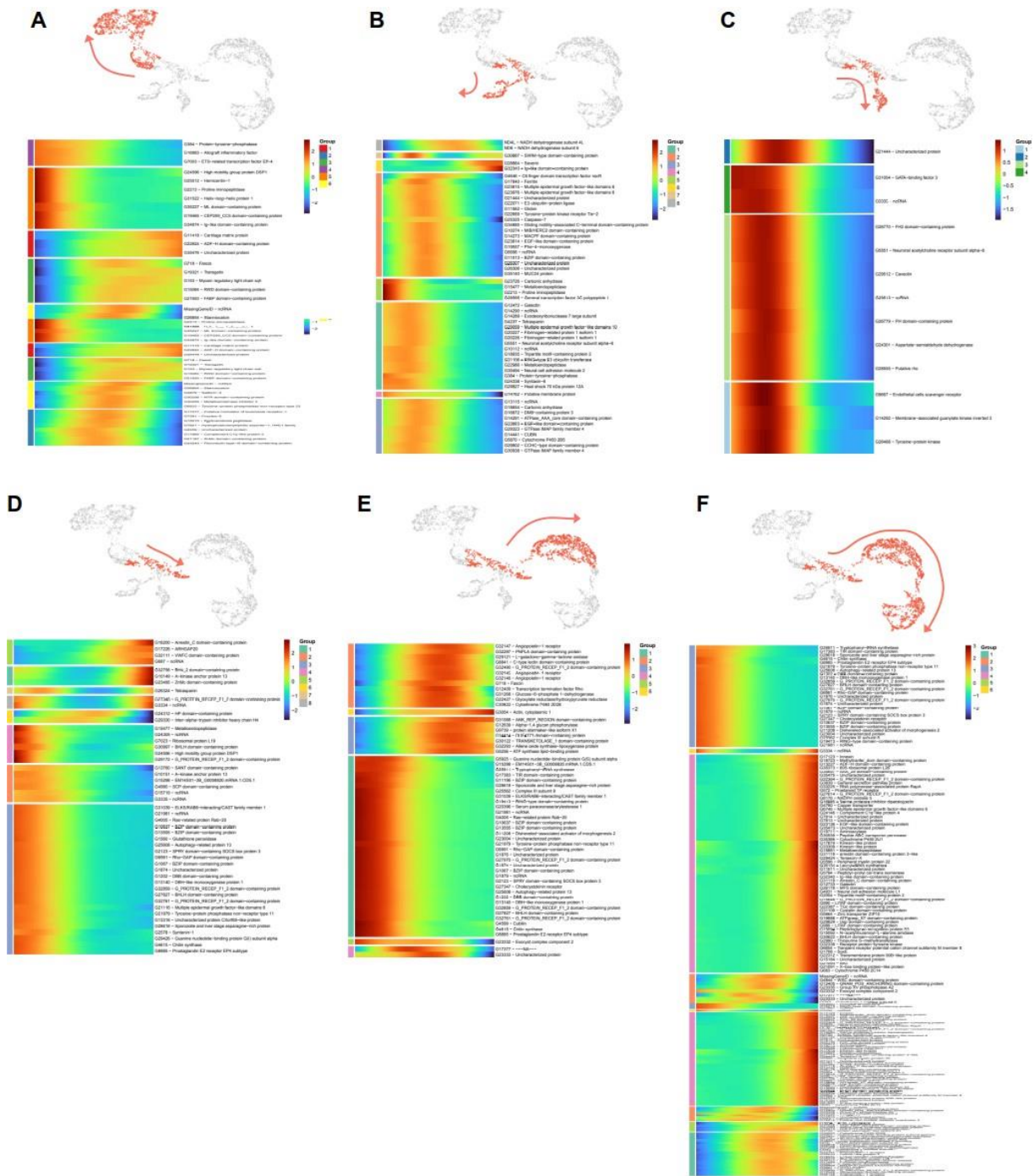


Figure S10. Results of scRNA-seq trajectory analysis using Monocle3. Analysis was performed using cluster 4 as the zero pseudotime. **(A)** Lineage from immature cells to hyalinocytes, **(B)** to cluster 5 cells, **(C)** to cluster 6 cells, **(D)** to vesicular cells, **(E)** to macrophage-like cells and **(F)** to small granule cells. For each lineage, cell trajectories are shown in red and heat maps of pseudo time-dependent genes are shown. Blue indicates low expression, and red indicates high expression. Pseudotime flows from right to left.

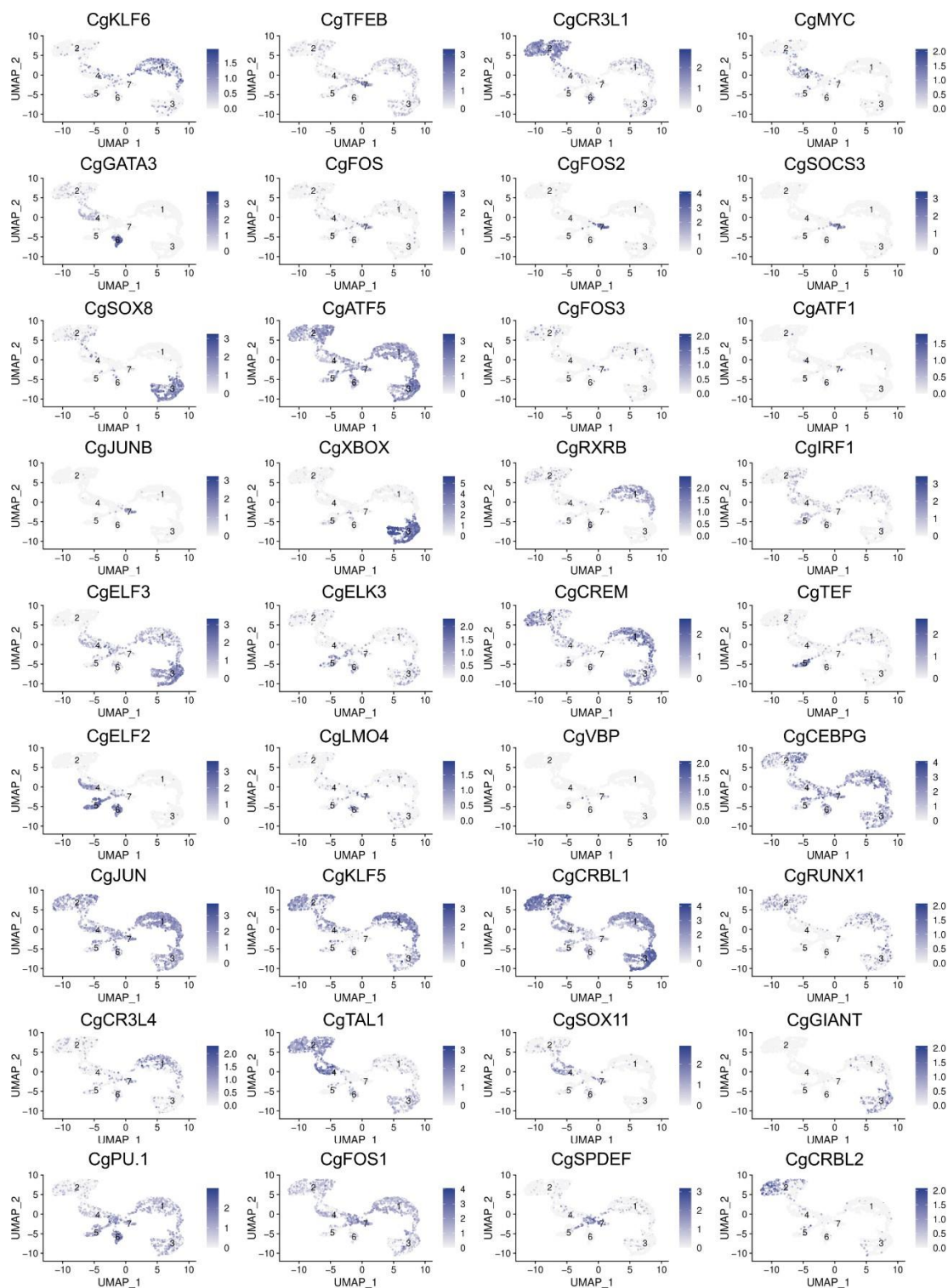


Figure S11. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plots of cells expressing transcription factors. 28 UMAP representation for the transcription factors identified in the scRNA-seq dataset. Each UMAP plot shows cells expressing the transcription factor in purple. Log₂FC expression level is also reported.

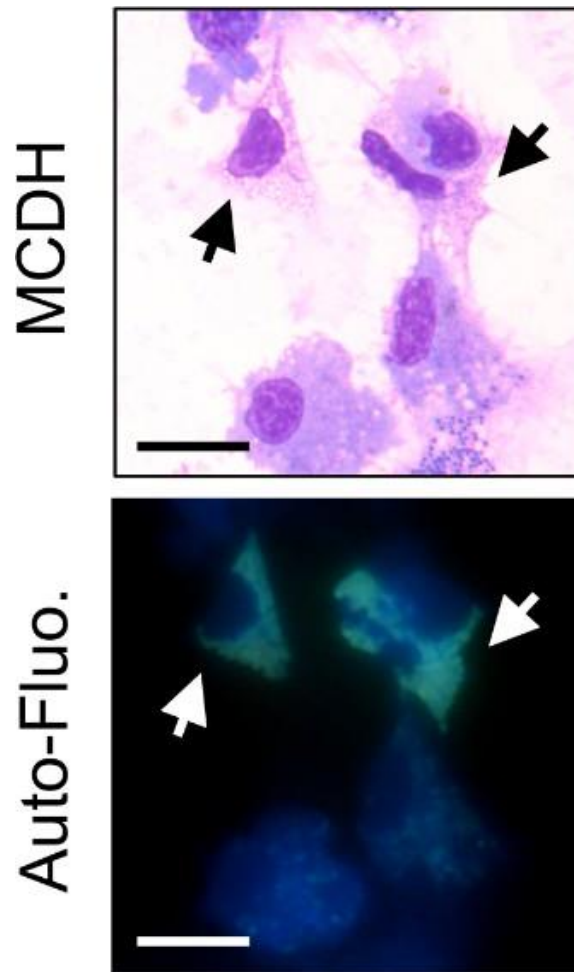


Figure S12. Observation of autofluorescence of vesicular cells in hemolymph. Freshly punctured total hemolymph was cytopun, directly observed under a microscope using a DAPI filter set (DAPI Blue ex : 350/50 nm, DC : 400 nm and em : 460/50 nm) and then processed for MCDH staining. Arrows indicate autofluorescent cells. Scale bar : 10 μ m.

CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'IMPACT D'UNE INFECTION PAR *V. AESTUARIANUS* SUR LA COMPOSITION ET LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES DE *C. GIGAS*.

Contexte et objectifs :

Comme indiqué dans l'introduction, *Crassostrea gigas* est fréquemment exposées à une grande diversité de micro-organismes pathogènes présents dans l'environnement, principalement en raison de leur capacité à filtrer l'eau de la mer pour se nourrir et respirer. Parmi les agents pathogènes les plus impactant chez *C. gigas* se trouvent plusieurs groupes de bactéries appartenant au genre *Vibrio*, et plus particulièrement aux espèces *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio aestuarianus*, mais aussi un virus appartenant à la famille des Malacoherpesviridae, le virus OsHV-1 μ Var (Rubio et al. 2019b; Oyanedel et al. 2023; de Lorgeril et al. 2018b). Ce virus est connu pour impacter principalement les huîtres juvéniles, via l'infection des hémocytes, conduisant à la diminution de l'expression de peptides antimicrobiens, chargés de contrôler la microflore bactérienne associée à l'huître (de Lorgeril et al. 2018b; Lucasson et al. 2020). Cette altération de la physiologie hémocytaire cause une dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre microbien associé à une augmentation de la concentration en bactéries pathogènes opportunistes composant le pathobionte de l'huître, notamment *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio crassostreae* et *Vibrio harveyi*. L'impact de ces bactéries sur les hémocytes a été caractérisé et a révélé qu'elles étaient cytotoxiques, causant une lyse des hémocytes et par voie de conséquence la perte de l'immunocompétence de l'huître (Rubio et al. 2019b; Oyanedel et al. 2023). Ainsi, si ces espèces de *Vibrio* sont à considérer comme des bactéries pathogènes opportunistes, profitant d'infections virales pour proliférer, *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* est quant à lui un agent pathogène primaire de *C. gigas* qui provoque des épisodes de mortalité récurrents chez l'huître adulte, notamment en période estivale (M. Garnier et al. 2007).

Vibrio aestuarianus est une bactérie pathogène présente naturellement dans les milieux estuariens et marins, et qui peut être subdivisée en 3 sous-espèces : *V. aestuarianus aestuarianus* qui regroupe des isolats non pathogènes, *V. aestuarianus cardii* qui regroupe des souches pathogènes pour les coques *Cerastoderma edule* et *V. aestuarianus francensis*, responsable d'épizooties touchant les huîtres adultes (taux de mortalités estimés entre 20 et 55 % des animaux touchés (M. Garnier et al. 2007; Dégremont et al. 2020). La virulence de *V. aestuarianus francensis* repose sur une phase initiale d'entrée de la bactérie dans l'huître,

probablement via les branchies (Parizadeh et al. 2018). Son association à des organismes comme des copépodes ou des micro-algues reste encore très discutée (Doni et al. 2023; Vezzulli et al. 2015), la bactérie étant exclusivement retrouvée sous forme libre lors d'épisodes de mortalités naturels (Parizadeh et al. 2018). L'impact d'une infection par *V. aestuarianus francensis* est visible au niveau histopathologique, où l'on observe une invasion progressive des organes au cours de l'infection, les stades finaux de la maladie étant associés à une lésion des tissus conjonctifs de nombreux tissus et une septicémie (Parizadeh et al. 2018; Mandas et al. 2020). Les souches virulentes de *V. aestuarianus francensis* sont issues de deux lignées clonales possédant toutes un îlot génomique leur conférant une résistance au cuivre (Mesnil et al. 2023) et donc pouvant possiblement résister aux hémocytes capables d'accumuler le cuivre et de l'utiliser dans le cadre d'une défense antibactérienne.

Les hémocytes jouent un rôle central dans la réponse immunitaire des huîtres et sont mobilisés face aux agents pathogènes. Les travaux présentés dans le chapitre 1 de ma thèse ont permis de caractériser en détail la diversité des hémocytes de *C. gigas*, en identifiant sept types distincts : les hyalinocytes, les macrophages-like, les blasts basophiles et acidophiles, les small granule cells, les big granule cells et les cellules vésiculaires. Ces cellules remplissent des fonctions immunitaires spécifiques telles que la phagocytose (par les macrophages-like et les small granule cells), le burst oxydatif (par les macrophages-like), l'accumulation de cuivre (chez les small granule cells), ou encore expriment des peptides antimicrobiens (hyalinocytes, blasts basophiles et acidophiles). De plus, nos travaux de séquençage d'ARNm sur cellule unique nous ont permis de mettre en évidence les gènes marqueurs de ces types hémocytaires, ainsi que les fonctions biologiques prédites par analyse des « GO terms » et des voies de signalisation KEGG, et les voies de différenciation entre ces types hémocytaires décrits. En particulier une seule voie de différenciation permet la formation des hémocytes granuleux (cellules vésiculaires, macrophages-like, big granule cells et small granule cells), hémocytes considérés comme les principales cellules immunocompétentes face à une infection bactérienne chez *C. gigas* (W. Wang et al. 2017b).

Quelques éléments sont connus concernant l'impact de *V. aestuarianus francensis* sur les hémocytes de *C. gigas*. Une métalloprotéase (Vam) a été mise en évidence comme facteur de virulence crucial conférant à *V. aestuarianus* la capacité d'affecter la compétence des hémocytes, via la diminution de leur capacité de phagocytose (Labreuche, Lambert, et al. 2006b) permettant à la bactérie de contourner les mécanismes classiques de défense immunitaire. L'expression de cette métalloprotéase Vam dépend du facteur de transcription VarS (Goudenège et al. 2015). Chez *Vibrio cholerae*, VarS fait partie d'un système à deux

composants (VarS/VarA) jouant un rôle crucial dans la régulation du *quorum sensing* en modulant l'expression et l'activité du régulateur transcriptionnel HapR (Jang et al. 2011; Lenz et al. 2005). À faible densité cellulaire, VarS phosphoryle VarA, qui phosphoryle à son tour le régulateur de *quorum sensing* LuxO. LuxO phosphorylé active des petits ARN qui déstabilisent l'ARNm codant pour HapR, réduisant ainsi son expression protéique. À mesure que la densité cellulaire augmente, des autoinducteurs inhibent la cascade de phosphorylation, entraînant la stabilisation de l'ARNm codant pour HapR et une augmentation de l'expression de la protéine HapR (Lenz et al. 2005). VarS/VarA influence également indirectement l'activité de HapR via de petits ARN comme CsrB, qui régulent le métabolisme du carbone et relient la détection des nutriments environnementaux au contrôle du *quorum sensing* (Jang et al. 2011). HapR réprime ensuite les facteurs de virulence, dont la production de toxine cholérique, tout en favorisant la formation de biofilms et l'activité des protéases. Cette double régulation permet à *V. cholerae* d'adapter sa virulence en réponse à la densité cellulaire et aux conditions environnementales (Jang et al. 2011; Lenz et al. 2005). Ainsi, la présence du gène VarS, contrôlant l'expression de la métalloprotéase Vam, permettant à *V. aestuarianus* d'échapper au système immunitaire de *C. gigas*, pourrait indiquer que des mécanismes de *quorum sensing* régulent l'expression de Vam. Afin de répondre face à une infection bactérienne, les hémocytes sont capables de monter des réponses immunitaires via l'activation de récepteurs membranaires comme les TLRs (Toll-Like Receptor) reconnaissant notamment les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) et conduisant à l'activation de voies de signalisations entraînant à une réponse via l'expression de gènes codants pour des peptides antimicrobiens, et des cytokines pro-inflammatoires. Quatre jours après l'injection intramusculaire d'une grande concentration en *V. aestuarianus* dans le muscle adducteur de *C. gigas*, des auteurs rapportent une réponse des hémocytes au niveau transcriptomique (RNA-seq). Cette réponse se traduit par une surexpression de gènes impliqués dans la transduction du signal, la communication et l'adhérence cellulaire, la phagocytose, la réorganisation du cytosquelette, le trafic cellulaire, l'autophagie, ainsi que la réponse antioxydante et anti-apoptotique (Lorgeril et al. 2011). Ces travaux suggèrent que les hémocytes sont tout de même capable d'engager une réponse immunitaire face à *V. aestuarianus* mais après 4 jours d'infection, donc à un stade où les huîtres possèdent possiblement une charge bactérienne importante dans l'hémolymphe et donc à un stade où des mécanismes de *quorum sensing* pourraient être engagés par *V. aestuarianus*. Cependant, l'utilisation d'un mode de transmission par piqûre pourrait conduire à la caractérisation d'une réponse due à la blessure causée par l'aiguille, et la forte concentration injectée pourrait refléter une réponse aiguë, et non pas observée en milieu naturel. Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse que la

réponse immunitaire de *C. gigas* pourrait dépendre de la charge bactérienne, et donc, du stade d'infection de l'huître par la bactérie. Cependant, utiliser des modes de contamination plus réalistes et surtout menés à l'échelle individuelle pourraient nous permettre de mieux comprendre la succession d'évènements et de réponses mises en place par l'huître lors d'une infection par *V. aestuarianus*.

Malgré l'importance de ce pathogène en aquaculture, les dynamiques de réponses immunitaires spécifiques activés par les hémocytes en réponse à *V. aestuarianus francensis* restent mal caractérisés. En particulier, nous ne savons pas quels types d'hémocytes sont directement affectés, ou répondent suite à une infection par cette bactérie. Ainsi, nous avons cherché à étudier l'impact d'une infection par *V. aestuarianus francensis* sur la composition hémocytaire et sur l'expression de gènes associés à la réponse immunitaire des hémocytes de *C. gigas*. Plus particulièrement, notre objectif a été de mettre en évidence l'impact de la charge bactérienne hémolympatique sur le niveau d'activation des hémocytes, afin de révéler la dynamique de la réponse immunitaire de *C. gigas*, au cours des différents stades d'infection par *V. aestuarianus*.

Afin de répondre à ces questions, nous avons effectué des infections expérimentales en utilisant une méthode de balnéation afin de reproduire au mieux une infection naturelle (Parizadeh et al. 2018). Les huîtres receveuses ont été ponctionnées avant l'infection pour analyser en cytologie la composition en hémocytes des huîtres à l'état basal. Une période de 7 jours après cette première ponction a été respectée pour assurer la cicatrisation de la plaie induite par la première ponction, et permettre aux hémocytes de retrouver une homéostasie basale.

Après les deux jours d'infection des huîtres donneuses, l'eau infectée a été collectée et les bactéries ont été quantifiées par qPCR (quantification du gène *dnaJ* spécifique de *V. aestuarianus*) pour garantir la quantité suffisante de bactéries dans l'eau infectée. Les huîtres receveuses ont ensuite été mises en contact avec l'eau infectée pendant 5 jours, après lesquels leur hémolymphe a été ponctionnée par prélèvement dans la cavité péricardique. L'hémolymphe a été utilisée pour :

- Quantifier par RT-qPCR la charge bactérienne dans l'hémolymphe et donc associer un niveau de progression de l'infection à chaque animal.
- Réaliser des lames de cytologie afin d'analyser la composition en hémocytes des huîtres après infection
- Extraire les ARNm pour étudier le transcriptome des hémocytes des animaux par RNA-seq.

Dans un premier temps nous avons analysé la concentration bactérienne dans l'hémolymphe des animaux et avons pu mettre en évidence 3 groupes majeurs d'animaux : les animaux dont la charge bactérienne est quantifiable dans l'hémolymphe (Infectés), les animaux dont la charge bactérienne ne l'est pas (Négatifs) et les animaux non exposés (Contrôle). En comparant la composition en types hématocytaires chez ces trois groupes d'animaux avant et après infection, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la concentration en certains types hématocytaires seulement chez les animaux du groupe infecté. En analysant plus en détail la charge bactérienne chez les animaux infectés, nous avons pu mettre en évidence 3 groupes d'animaux dont la charge bactérienne moyenne est de 10^4 , 10^5 et 10^8 bactéries / mL. En comparant cette fois la concentration hématocytaire des animaux de ces 3 groupes avant et après infection, nous avons pu observer une augmentation significative de la concentration en macrophages-like, cellules vésiculaires, et blastes basophiles et acidophiles pour les animaux dont la charge bactérienne est de 10^8 bactéries / mL. Seule une augmentation significative de la concentration en cellules à gros granules est observable chez les animaux dont la charge bactérienne est de 10^4 , et 10^5 bactéries / mL avant et après infection. L'approche de RNA-seq nous a permis de confirmer les résultats obtenus en cytologie. En effet, seuls les hématocytes issus d'animaux à des stades septicémiques de l'infection (avec une charge bactérienne hémolympatique supérieure à 10^7 bactéries / mL) possèdent un transcriptome significativement différent des autres animaux. Chez les hématocytes de ces animaux, nous avons pu mettre en évidence la surexpression de gènes impliqués dans l'immunité (interleukine 17-like, Myd88 TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)), pour l'autophagie et pour les fonctions du réticulum endoplasmique. Nous avons aussi pu mettre en évidence la sous expression de gènes codants pour la réparation et la réplication de l'ADN.

Publication 2

***Magallana gigas* immune response dynamic through a *V. aestuarianus francensis* natural infection.**

Sébastien de La Forest Divonne, Elyna Bouchereau, Mathilde Ollagnier, Benjamin Gourbal, Marie-Agnès Travers, Emmanuel Vignal

En préparation.

Title

Magallana gigas immune response dynamic through a *V. aestuarianus francensis* natural infection.

Keywords

Magallana gigas, *Vibrio aestuarianus*, infection, hemocytes, RNA-Seq, cytology

Authors

Sébastien de La Forest Divonne¹, Elyna Bouchereau¹, Mathilde Ollagnier¹, Benjamin Gourbal¹, Marie-Agnès Travers¹ and Emmanuel Vignal¹,

Contacts

emmanuel.vignal@umontpellier.fr

Affiliation

¹ IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Montpellier, France

Abstract

The Pacific oyster, *Magallana gigas*, plays a crucial role in global aquaculture but faces significant challenges from bacterial pathogens, including *Vibrio aestuarianus francensis*, which can lead to high mortality rates. Understanding the dynamics of oyster immune responses during natural infections is essential for improving resistance. This study investigates the immune response of *M. gigas* to *V. aestuarianus* using an ecologically relevant infection model, where bacterial transmission occurs through water exposure, mimicking natural conditions. Hemocyte composition and gene expression were analyzed using cytological methods and RNA sequencing (RNA-Seq) to quantify immune responses at various stages of infection. Results showed that *V. aestuarianus* infection led to a significant increase in hemocyte concentrations, particularly macrophage-like cells, basophilic and acidophilic blast-like cells, and large granule cells, indicating an active cellular response to the pathogen. Transcriptomic analysis revealed extensive changes in gene expression, especially in oysters with high bacterial loads. Genes associated with immune signaling, reactive oxygen species production, and autophagy were notably upregulated, reflecting a strong defense mechanism against bacterial proliferation. In

contrast, downregulation of genes related to DNA repair and metabolic processes suggested a shift in cellular priorities towards immune response and stress adaptation. This study provides a comprehensive view of the immune mechanisms employed by *M. gigas* in response to *V. aestuarianus*, highlighting the importance of hemocyte-mediated responses and transcriptomic reprogramming under infection stress. The findings underscore the critical role of hemocytes and adaptive gene expression in oyster resilience against bacterial pathogens, offering valuable insights for the development of strategies to enhance oyster health and resistance in aquaculture settings. This research bridges the gap between experimental and natural infection models, providing a foundation for future studies on pathogen-host interactions in marine organisms.

Introduction

The Pacific oyster, *Magallana (Crassostrea) gigas*, is a keystone species in aquaculture, widely farmed due to its ecological and economic importance. However, *M. gigas* farmed populations are threatened by infections from a range of pathogens, including protistan, viruses and bacteria (Rubio et al. 2019; Oyanedel et al. 2023; de Lorgeril et al. 2018; Arzul et al. 2022) a problem exacerbated by global environmental changes and the intensification of *M. gigas* farming (King et al. 2019).

Among the most impacting pathogens are the bacteria belonging to *Vibrio aestuarianus francensis* subspecies, responsible for recurrent mortality events in Europe, particularly affecting marketable-size oysters (Garnier et al. 2007; Mesnil et al. 2023). This pathogen is recognized as a primary pathogen (Garnier et al. 2007; Parizadeh et al. 2018), inducing up to 55 % of mortality in adult oysters during warm seasons (Dégremont et al. 2020). *V. aestuarianus francensis* infection in oysters usually lasts several days. After the entry of a few bacterial cells, *V. aestuarianus* proliferates in the circulatory system to finally induce a fatal septicemia (Geslin et al. 2024; Parizadeh et al. 2018), overcoming oyster immune response.

To counteract infections, oysters rely heavily on their innate immune defenses. A well-proportioned response can protect the host from pathogen proliferation. In the case of the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), a polymicrobial disease affecting juvenile oysters (Petton et al. 2021), resistant oyster's phenotype has been associated with a differential immune gene expression in the early infection (de Lorgeril et al. 2020).

Hemocytes, which are the cornerstone of the oyster's immune response, play a critical role in recognizing and responding to bacterial invaders (Lafont et al. 2019). Recent research has revealed that *M. gigas* hemocytes are highly heterogeneous, comprising at least seven distinct cell types, including hyalinocytes, basophilic and acidophilic blast-like cells, macrophage-like

cells, small granule cells, large granule cells, and vesicular cells (De La Forest Divonne et al. 2024)). These diverse hemocyte populations exhibit a range of immune functions. In addition to phagocytosis, hemocytes contribute to humoral immune responses through the production of reactive oxygen species (ROS), the production of extracellular traps (ETs) the secretion of antimicrobial peptides, cytokines, proteases, and the accumulation of copper ions, all of which are vital for defending against bacterial pathogens (Schmitt et al. 2012; Poirier et al. 2014).

Some of these cellular functions are known to be affected during *V. aestuarianus francensis* infection. In particular, an increase of ROS production and total hemocyte counts were detected *in vivo* following an contact with 01/032 strain, as well as a diminution of phagocytosis and adherent capacity of oyster's hemocytes (Labreuche, Lambert, et al. 2006). Other authors proposed a central role of autophagy, a process controlling intracellular biomass by targeting cytoplasmic components for autodigestion (Deretic et Levine 2009), in the oyster response to *V. aestuarianus francensis* (Moreau et al. 2015). In fact, the chemical induction or inhibition of autophagy induced a pronounced resistance or susceptibility to *V. aestuarianus*, respectively (Moreau et al. 2015). Finally, a first global approach mimicking the last infection steps tried to understand the immune response induced by this bacteria (Lorgeril et al. 2011). Following intramuscular injection of a high concentration of *V. aestuarianus francensis*, authors put in light a diversity of overexpressed functions relying on genes involved in signal transduction, cell communication and adhesion, phagocytosis, cytoskeletal reorganization, cell trafficking, antioxidant and anti-apoptotic responses, as well as autophagy (Lorgeril et al. 2011).

Despite the established role of hemocytes in oyster immunity, and the impact of a *V. aestuarianus francensis* on hemocytes immune functions, the specific dynamics of hemocyte responses during *V. aestuarianus francensis* infections, particularly how bacterial load in the hemolymph affects hemocyte composition and activity, remain poorly understood (Moreau et al. 2015; Lorgeril et al. 2011).

Previous studies investigating oyster immune responses to *Vibrio* infections have typically employed artificial infection models, such as needle injection (Lorgeril et al. 2011; Moreau et al. 2015; Labreuche, Lambert, et al. 2006; Labreuche, Soudant, et al. 2006; Labreuche et al. 2010), which may not fully capture the natural course of infection. These models often fail to account for the early stages of pathogen-host interactions and the gradual escalation of bacterial load (Parizadeh et al. 2018). Our study addresses this gap by employing a more ecologically relevant infection model, where infected oyster secrete virulent bacteria in the water, infecting secondary oysters (Parizadeh et al. 2018), and allowing us to observe the relationship between bacterial concentration in the hemolymph and the oyster's immune response over time. To

explore these dynamics, we assessed changes in hemocyte composition and gene expression in oysters experimentally infected with *V. aestuarianus*. Using a combination of cytological analysis and RNA sequencing (RNA-Seq), we quantified hemocyte populations and identified gene expression patterns associated with different stages of infection, offering a unique exploratory multi-level approach to understand immune responses during *V. aestuarianus* infection.

Results:

Experimental setup successfully establishes *Vibrio aestuarianus* infection and its effects on oyster survival.

The experiment was divided into several key stages (**Fig. 1, Panel A**). Oysters were prepared for repeated hemolymph sampling by filing an opening in the shell, as described in the Materials and Methods. Initially, prior to infection (time point t_0), hemolymph was collected from all oysters to establish a baseline for subsequent analyses, including *Vibrio aestuarianus* quantification and hemocyte characterization. Oysters were then kept in seawater for 7 days to ensure recovery from the initial sampling. Meanwhile, a culture of *V. aestuarianus* strain 02/041 was prepared and injected into 80 donor oysters, which were incubated for 2 days, allowing the bacteria to be secreted into the seawater. The infected seawater was then used to expose a group of 60 recipient oysters to the pathogen (**Fig. 1, Panel A, in red**). Ten oysters were kept in non-infected seawater as a control group (**Fig. 1, Panel A, in blue**). After a 5-day exposure period, hemolymph samples were collected from all oysters (time point t_i) for subsequent cytology, qPCR, and RNA-seq analysis (the latter was performed only on oysters from time point t_i). The *V. aestuarianus* load was quantified in the hemolymph by qPCR. No *V. aestuarianus* DNA was detected in control oysters at both sampling time points (t_0 and t_i) (**Fig. 1, Panel B**). In contrast, *V. aestuarianus* DNA was detected in exposed oysters five days post-infection, with a mean Ct value of 28.42 +/- 6.94 (**Fig. 1, Panel B**), corresponding to a bacterial load ranging from 10^3 CFU/mL to more than 10^8 CFU/mL (**Supp. Fig. S1**). However, *V. aestuarianus* DNA was not detected in 21 of the exposed oysters, which were therefore classified as negative for infection (**Fig. 1, Panel B**). To monitor the mortality induced by *V. aestuarianus*, a separate subset of 30 infected and 10 control oysters was followed. Mortality was recorded daily for 19 days (**Supp. table S1**). Oysters exposed to *V. aestuarianus* exhibited a significant reduction in survival over the 19-day observation period compared to the non-infected controls, with a median survival time of 13.5 days. The mortality kinetics observed in this experiment were consistent with those

reported in previous studies on *V. aestuarianus* infections (Parizadeh et al. 2018), confirming the lethality of the bacterial strain used in this experiment (**Fig. 1, Panel C**).

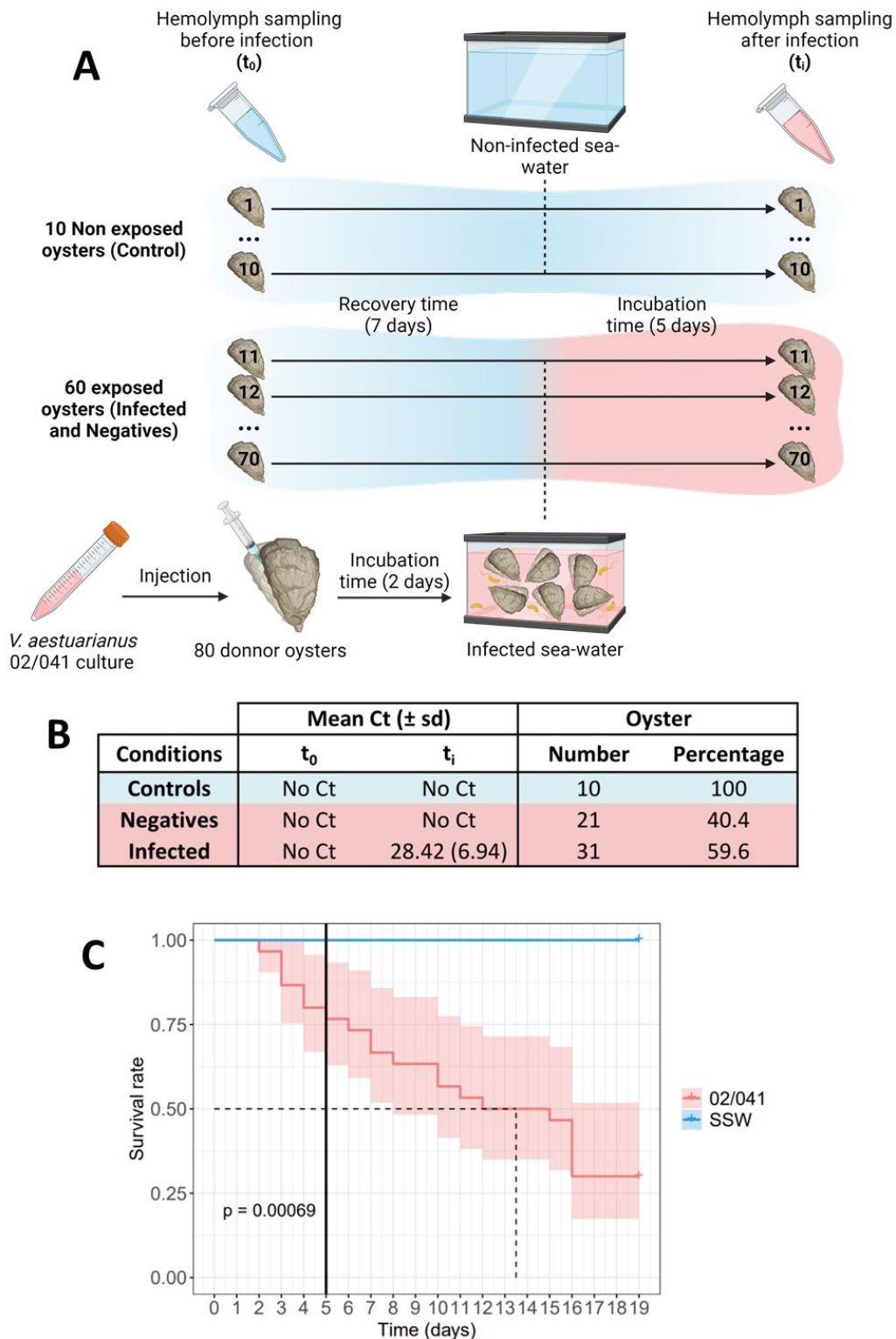


Figure 1 : Experimental Design and Validation of *Vibrio aestuarianus* Infection in Oysters.

(A) The diagram illustrates the experimental design. In brief, 70 oysters were sampled both before (t_0) and after (t_i) infection with *Vibrio aestuarianus* strain 02/041 (Infected in red) or

exposure to seawater (Non-infected in blue). Hemolymph was collected at t_0 and t_i and was used for cytology and qPCR quantification of bacterial load, while RNA-seq analysis was performed only on samples collected at t_i . **(B)** qPCR detection of *V. aestuarianus* in oyster hemolymph. The table summarizes the qPCR data, including the condition, mean Ct values (\pm SD), and the number and percentage of positive animals in each condition. **(C)** Survival of 40 oysters (30 exposed to *V. aestuarianus* 02/041 and 10 non-infected controls) was monitored daily for 19 days. The survival curves show oysters immersed in *V. aestuarianus*-infected seawater (**red**) compared to those in seawater (**blue**). The black line marks the time of post-infection hemolymph sampling. Survival data were analyzed using a log-rank test, with statistical significance observed ($p = 0.00069$).

Hemocyte types exhibit differential expansion in response to *Vibrio aestuarianus*

Infection

The effect of *Vibrio aestuarianus* 02/041 infection on hemocyte populations in *Magallana gigas* was monitored using MCDh staining, revealing seven distinct hemocyte types (**Fig. 2, Panel A**). Cytological characterization and quantification of hemocytes were performed across two conditions: uninfected (t_0) and exposed for five days to *Vibrio aestuarianus* (**Supp. table S2**). Overall, total hemocyte concentrations increased during the five-day exposure to *Vibrio aestuarianus* (**Fig. 2, Panel B**), rising from 1×10^6 to approximately 2.2×10^6 hemocytes per mL of hemolymph. Despite this increase in hemocyte concentration, the hemocytograms of the control and negative groups showed no significant changes in the proportions of the different hemocyte types between t_0 (before infection) and t_i (after five days) (**Fig. 2, Panels C and D**). However, in oysters with quantifiable bacterial loads in the hemolymph post-infection (infected at t_i) significant changes in hemocyte composition were observed. Specifically, concentrations of Macrophage-Like cells (ML) increased significantly from 3.6×10^5 hemocytes/mL at t_0 to 1×10^6 hemocytes/mL at t_i . Similarly, Basophilic Blast-Like cells (BBL) rose from 1.1×10^5 to 3×10^5 hemocytes/mL, Acidophilic Blast-Like cells (ABL) from 4.9×10^4 to 2.3×10^5 hemocytes/mL, and Small Granule Cells (SGC) from 3.2×10^5 to 9.9×10^5 hemocytes/mL. Notably, there was a marked increase in Big Granule Cells (BGC), from 9.4×10^3 to 6.2×10^4 hemocytes/mL, and Vesicular Cells (VC), from 1.4×10^4 to 7.2×10^4 hemocytes/mL (**Fig. 2, Panel E**). No significant changes were observed for control and negative oyster's hemocyte concentration between t_0 and t_i sampling times (**Supp. Fig S2**). These findings indicate that while uninfected oysters maintained stable hemocyte compositions over time, oysters with detectable

Vibrio aestuarianus loads displayed significant expansions in all hemocyte types except hyalinocytes, highlighting a robust cellular response to infection.

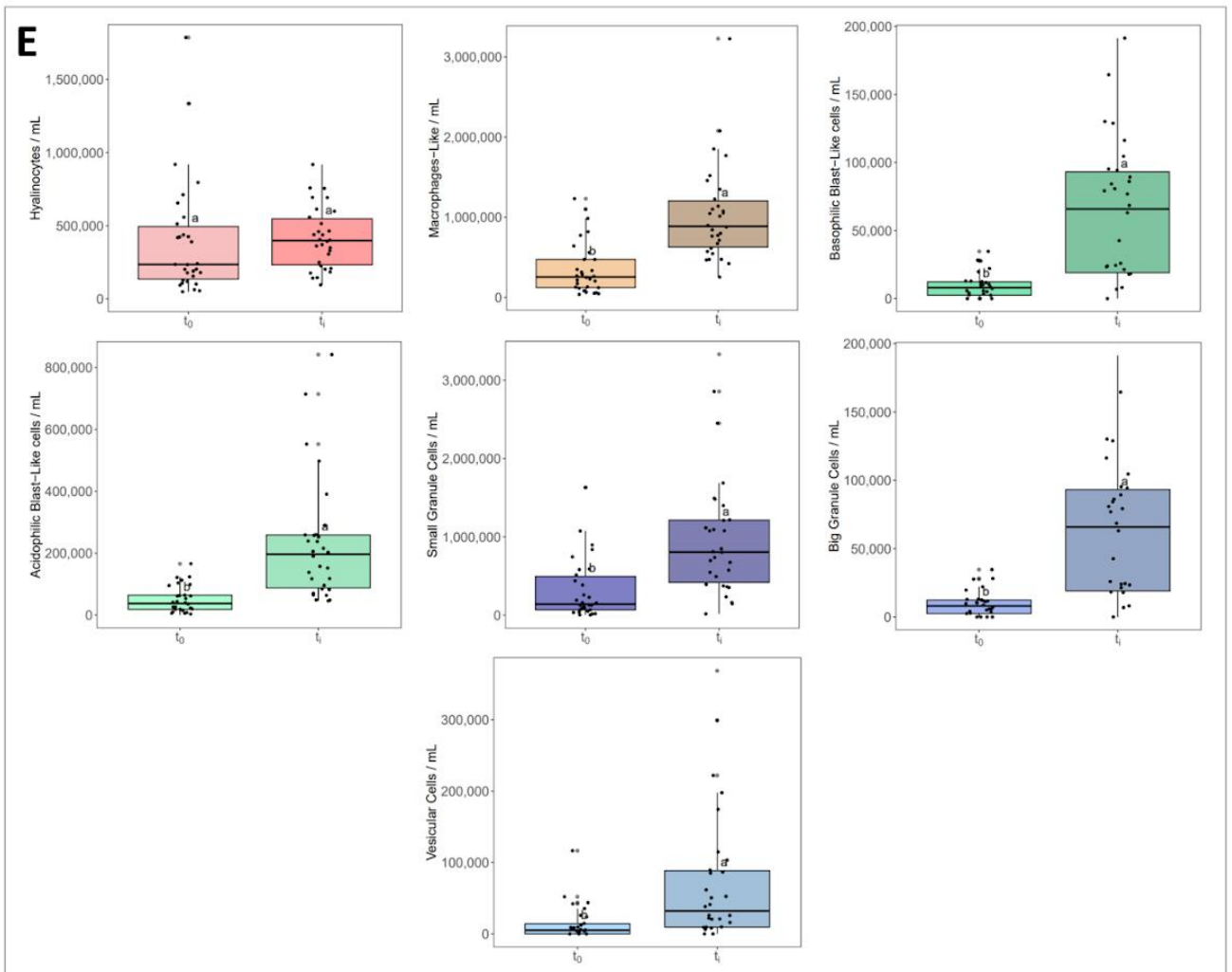
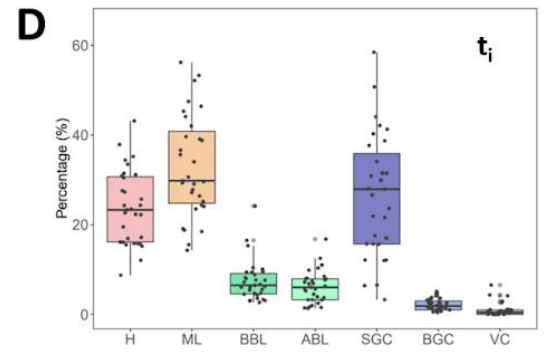
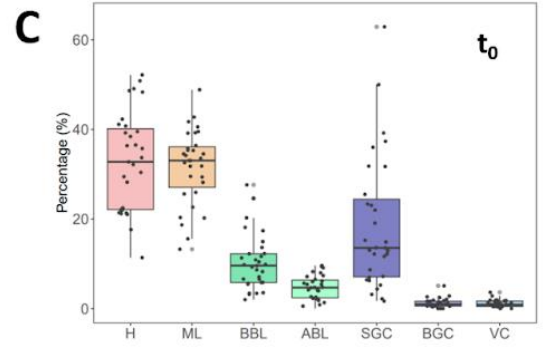
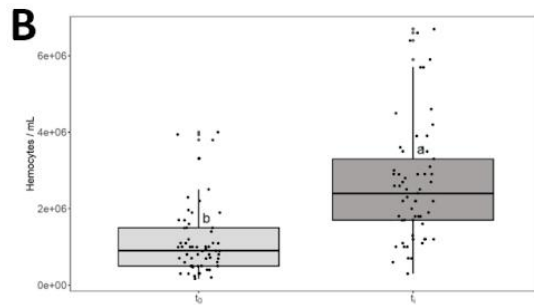
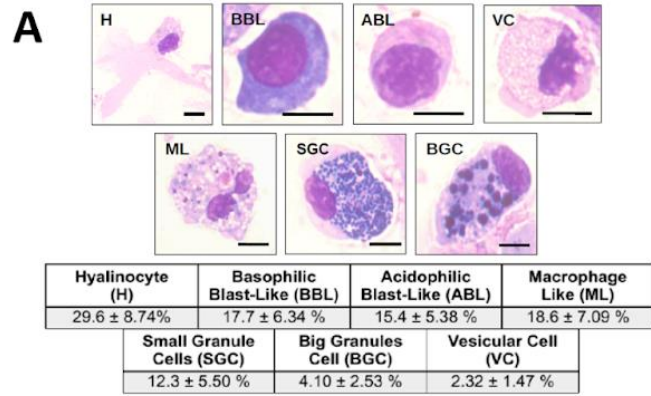


Figure 2 : Quantitative response of hemocyte subtypes to *Vibrio aestuarianus* infection in oysters. (A) Morphology and percentages of the seven identified hemocyte types using MCDh staining. **H** : Hyalinocyte, **ML** : Macrophage Like, **BBL** : Basophilic Blast Like cell, **ABL** : Acidophilic Blast Like cell, **SGC** : Small Granule Cell, **BGC** : Big Granule Cell, **VC** : Vesicular Cell. Scale bar : 5 μ m. (B) Change in total hemocyte concentration between time point t_0 (before exposure) and time point t_1 (after five days of exposure to *Vibrio aestuarianus*). (C) Boxplots representing the hemocyte composition (percentage of each type) at t_0 (before infection) and t_1 (after five days of *Vibrio aestuarianus* exposure) for the seven hemocyte types: Hyalinocytes (**H**), Macrophage-Like (**ML**), Basophilic Blast-Like (**BBL**), Acidophilic Blast-Like (**ABL**), Small Granule Cells (**SGC**), Big Granule Cells (**BGC**), and Vesicular Cells (**VC**). (D) Boxplots displaying hemocyte composition percentages at t_0 and t_1 for each hemocyte type under the same exposure conditions. (E) Hemocyte type concentrations before (t_0) and after (t_i) infection among individuals in which *V. aestuarianus* concentration is detectable (positive) in the hemolymph. The alphabetic characters displayed above the data points in each plot represent statistically significant differences among the groups, as determined by Tukey's test following ANOVA. Groups denoted by different letters differ significantly from each other at the $p < 0.05$ level of statistical significance.

Infection with *Vibrio aestuarianus* enhances the expansion of specific hemocyte subtypes.

For all positive individuals, the bacterial concentration in the hemolymph was quantified using qPCR (**Supp. Fig. S1.**), allowing the identification of four distinct groups based on *V. aestuarianus* load. A detailed density plot (**Fig. 3, Panel A**) reveals the distribution of bacterial concentrations within these groups. Group 1 (G1) consists of 16 oysters with bacterial concentrations centered around 10^4 CFU/mL, while Group 2 (G2) contains 9 oysters centered around 10^5 CFU/mL. Group 3 (G3) includes a single individual with 10^6 CFU/mL, excluded from further analysis due to its statistical outlier status. Lastly, Group 4 (G4) encompasses 5 oysters with concentrations around 10^8 CFU/mL.

Hemocyte populations were monitored pre- (t_0) and post-infection (t_i) for Groups G1, G2, and G4, focusing on changes in specific hemocyte subtypes after hemolymph sampling and MCDh staining (**Fig. 3, Panel B**). Significant increases in circulating macrophage-like (ML) cells and

big granule cells (BGC) were observed across groups. In G1, ML levels increased from 3.5×10^5 cells/mL at t_0 to 8.6×10^5 cells/mL at t_i , while BGCs rose from 1×10^4 cells/mL at t_0 to 5.8×10^4 cells/mL at t_i . Similarly, G2 showed a significant increase in BGCs, from 7.3×10^3 cells/mL at t_0 to 7×10^4 cells/mL at t_i . Group G4 exhibited more pronounced responses, with significant increases in multiple cell types: ML cells rose from 3.7×10^5 cells/mL at t_0 to 1.4×10^6 cells/mL at t_i , basophilic blast-like (BBL) cells increased from 1.1×10^5 to 5×10^5 cells/mL, acidophilic blast-like (ABL) cells from 6.2×10^4 to 3.8×10^5 cells/mL, and vesicular cells (VC) from 1.4×10^4 to 1.7×10^5 cells/mL. Altogether, these results suggest a strong immune response in oysters, with increased concentrations of all hemocyte types, except hyalinocytes, after *V. aestuarianus* infection, particularly in G4, which had the highest bacterial load, reflecting heightened cellular immune activation.

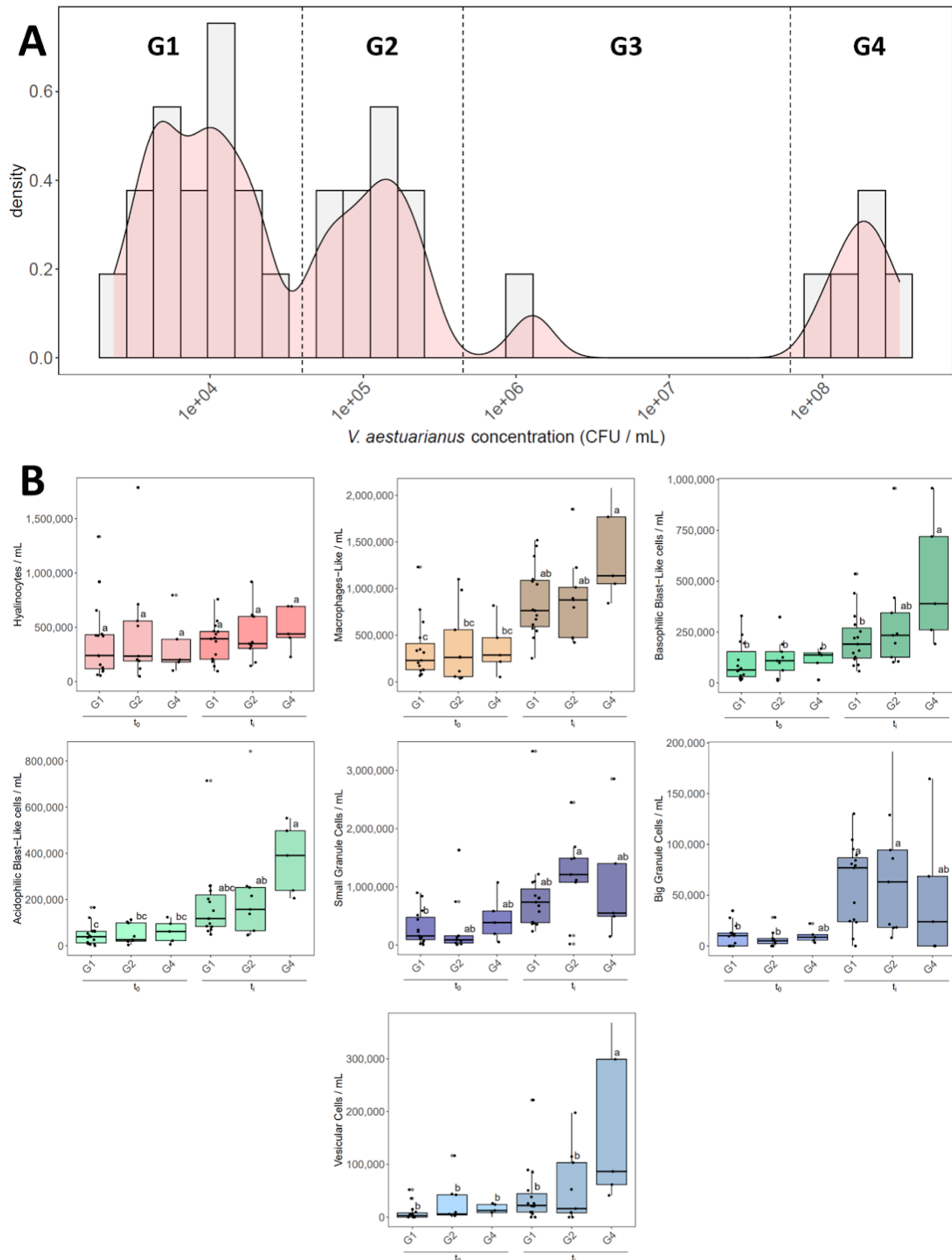


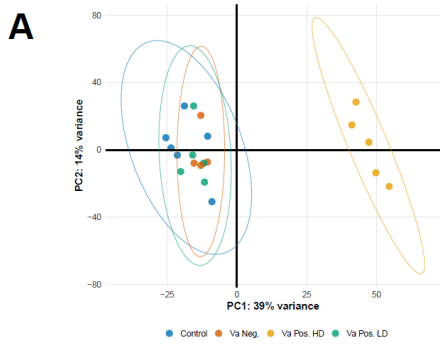
Figure 3: Quantification of hemocyte subtypes after infection with *Vibrio aestuarianus* at varying bacterial loads. (A) Density plot showing the distribution of bacterial concentrations in the hemolymph across four oyster groups (G1–G4), each representing distinct bacterial load ranges (CFU/mL). Group 1 (G1) is centered around 10^4 CFU/mL, G2 around 10^5 CFU/mL, G3

around 10^6 CFU/mL (excluded from further analysis), and G4 around 10^8 CFU/mL. **(B)** Boxplots illustrating the concentrations of seven hemocyte subtypes (Hyalinocytes, Macrophage-Like cells, Basophilic Blast-Like cells, Acidophilic Blast-Like cells, Small Granule Cells, Big Granule Cells, Vesicular Cells) in oysters before infection (t_0) and post-infection (t_i) within groups G1, G2, and G4. Statistically significant differences between time points and groups are indicated by distinct letters above the boxplots ($p < 0.05$). Hemocyte responses show a marked increase in specific cell types post-infection, particularly in G4, which had the highest bacterial concentration.

Oyster hemocytes exhibit extensive gene expression changes in response to high-dose *Vibrio aestuarianus* infection.

To investigate the transcriptomic response to *Vibrio aestuarianus* infection in oysters, we performed RNA-seq on hemocytes from control oysters, as well as oysters negative for *V. aestuarianus* in hemolymph, and oysters positive with either low or high bacterial loads (Va Pos. LD and Va Pos. HD, respectively) (**Fig. 5**). Principal component analysis (PCA) of the transcriptomic data (**Fig. 5A**) explains 53% of the total variance across the four conditions. Control, negative, and low-dose samples show significant overlap along both axes, suggesting minimal transcriptional divergence. In contrast, high-dose oysters form a distinct cluster, reflecting major transcriptional changes driven by high bacterial load, which likely corresponds to a stronger immune response. Differential expression analysis (**Fig. 5B**) further supports these findings. The comparison between control and high-dose oysters (Va Pos. HD) revealed 1,981 upregulated genes (7.7%) and 1,583 downregulated genes (6.1%). Similarly, the comparison between low- and high-dose oysters showed substantial transcriptional shifts, with 1,320 genes upregulated (5.1%) and 1,871 downregulated (7.2%). In contrast, comparisons between negative oysters and control or low-dose oysters revealed only minor transcriptional changes. Venn diagrams (**Fig. 5C**) highlight that the vast majority of DEGs (99%) are unique to the Va Pos. HD condition, underscoring the pronounced transcriptional impact of high bacterial load. The volcano plot (**Fig. 5D**) focusing on the Va Pos. HD vs. control comparison confirms the presence of a large number of significantly differentially expressed genes, many of which exhibit both large fold changes and strong statistical significance. Genes with a Log₂ fold change greater than ± 1 and an adjusted p-value < 0.05 were considered for further analysis, highlighting the extensive transcriptomic reprogramming occurring under high bacterial infection. To explore gene expression differences more comprehensively, a heatmap of all significantly differentially expressed genes (DEGs) was generated (**Fig. 5E**). Hierarchical

clustering clearly separates Va Pos. HD samples from other conditions, with distinct blocks of upregulated and downregulated genes. This reflects a robust transcriptional response specifically in high-dose infected oysters, whereas control, negative, and low-dose samples cluster together, indicating fewer transcriptional alterations. Finally, a detailed heatmap of the top 20 upregulated and top 20 downregulated genes in Va Pos. HD oysters (**Fig. 5F**) reveals key immune-related genes among the upregulated group. Notably, several interleukin 17-like genes, TNF receptor superfamily member 11A, and MyD88 are highly expressed, consistent with an active immune response. Conversely, downregulated genes such as L-gulonolactone dehydrogenase and zinc finger protein 862-like suggest a shift away from cellular maintenance and metabolic functions. These results highlight the strong immune activation and metabolic reallocation in oysters subjected to high bacterial loads of *Vibrio aestuarianus*.



B

Condition	Log2FC > 0		Log2FC < 0		Outliers	
	Number	Percent	Number	Percent	Number	Percent
Neg. vs Ctrl.	5	0.019	11	0.043	872	3.4
Neg. vs Pos.LD	8	0.031	12	0.046	872	3.4
Neg. vs Pos.HD	1328	5.1	1813	7	872	3.4
Ctrl. vs Pos.LD	2	0.0077	25	0.097	872	3.4
Ctrl. vs Pos.HD	1981	7.7	1583	6.1	872	3.4
Pos.LD vs Pos.HD	1320	5.1	1871	7.2	872	3.4

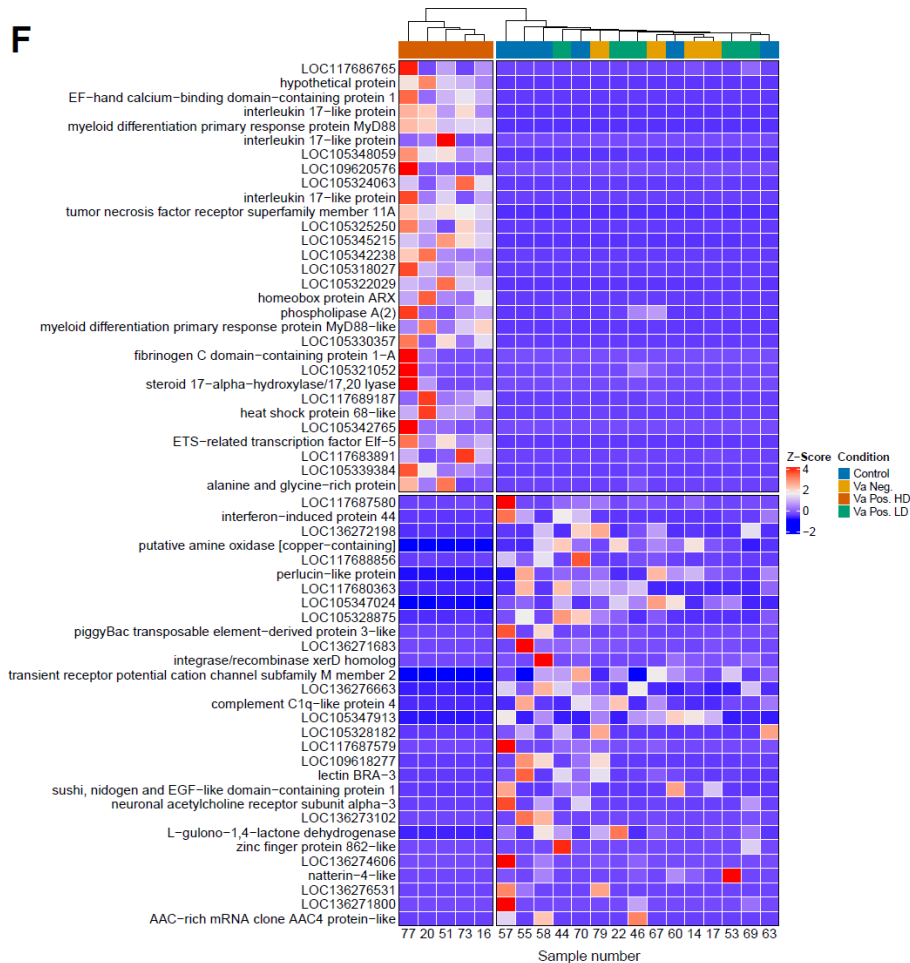
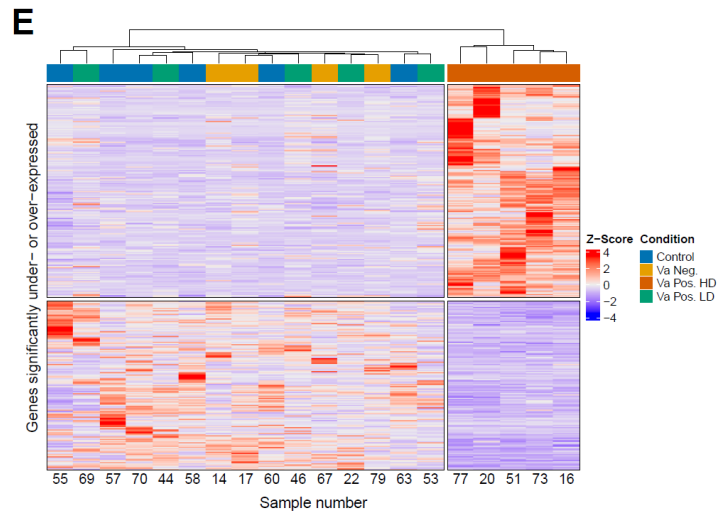
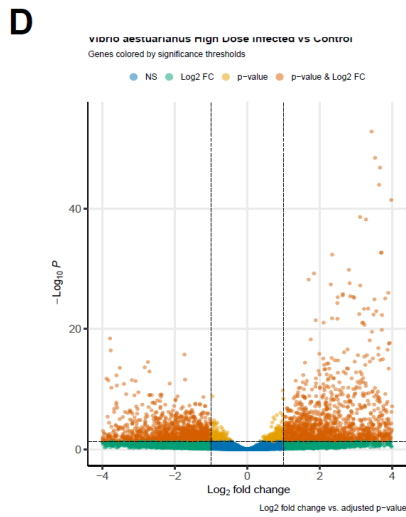
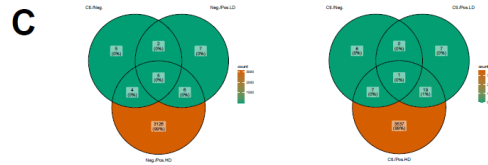


Figure 4. Differential Gene Expression Analysis (DESeq) of *Vibrio aestuarianus* Infection in Oysters. (A) Principal Component Analysis (PCA) depicting the variance between different infection conditions: Control, Negatively infected (Va Neg.), Positively infected at low dose (Va Pos. LD), and Positively infected at high dose (Va Pos. HD). The first principal component (PC1) explains 39% of the variance, and the second component (PC2) explains 14%, with clear clustering according to infection severity. (B) Table summarizing the number and percentage of differentially expressed genes (DEGs), both upregulated ($\text{Log}_2\text{FC} > 0$) and downregulated ($\text{Log}_2\text{FC} < 0$), across experimental conditions. Outliers, identified based on poor fit or extreme values, were excluded from the analysis. (C) Venn diagrams showing the overlap of significantly differentially expressed genes across the different experimental conditions, highlighting shared and unique DEGs between the comparisons. (D) Volcano plot displaying the relationship between \log_2 fold changes and $-\log_{10}$ adjusted p-values for genes differentially expressed in the *Vibrio aestuarianus* high dose (Va Pos. HD) infection versus control. Genes passing the significance threshold (adjusted p-value < 0.05) and fold change cutoff are highlighted. (E) Z-score heatmap of DEGs across hemolymph samples: Control, Negatively infected (Va Neg.), Positively infected at low dose (Va Pos. LD), and Positively infected at high dose (Va Pos. HD). Genes are clustered based on their expression profiles in response to varying infection doses. Analysis was performed using DESeq2, with significant DEGs identified at an adjusted p-value threshold of < 0.05 . (F) Z-score heatmap displaying the name of the 20 top over and under-expressed genes across hemolymph samples: Control, Negatively infected (Va Neg.), Positively infected at low dose (Va Pos. LD), and Positively infected at high dose (Va Pos. HD). Samples are clustered based on their expression profiles in response to varying infection doses.

Transcriptomic profiling of oyster Hemocytes highlights vesicular transport and oxidative stress adaptations to *Vibrio aestuarianus* infection

RBGOA approach was used to establish a detailed assessment of enriched or depleted Cellular Components (CC), Molecular Functions (MF), and Biological Processes (BP) within the hemocyte transcriptomes of high *Vibrio aestuarianus* infection load compared to control oyster's hemocytes. In the GO cellular component (CC) category (**Fig. 6, Panel A**) the analysis highlights depleted terms, where components such as the equatorial microtubule organizing center, ribonuclease MRP complex, and MCM complex showed marked depletion. Other significantly reduced GO terms include various DNA damage and repair sites, the mitochondrion, and the nuclear protein-containing complex, reflecting potential impairments

in cellular homeostasis and DNA repair mechanisms following the infection (**Fig. 6, Panel A, Left**). On the other hand, the enriched terms displayed demonstrate substantial upregulation in components associated with vesicle transport and membrane-bound organelles. Key enriched components include the endoplasmic reticulum chaperone complex, COPII-coated ER to Golgi transport vesicle, and endoplasmic reticulum membrane, suggesting a pronounced role for the endoplasmic reticulum (ER) and vesicular transport systems in the hemocyte response to infection. Additionally, enrichment in the vesicle membrane, vacuole, and extracellular region further supports an elevated involvement of vesicular trafficking and extracellular processes, likely reflective of an immune-related response to the bacterial pathogen (**Fig. 6, Panel A, Right**). These findings point toward a downregulation of DNA repair and mitochondrial function and an upregulation of protein folding, transport, and membrane dynamics as central features of the hemocyte response under the stress of *Vibrio aestuarianus* infection. In the GO molecular function (MF) category, the RBGOA analysis reveals significant alterations in specific molecular activities. The depleted terms (**Fig. 6, Panel B, Left**) highlight a reduction in activities related to nucleic acid processing and chromatin remodeling. Specifically, racemase and epimerase activity, histone methyltransferase activity (H3-K4 specific), single-stranded DNA binding, and catalytic activity acting on nucleic acids are markedly depleted. Other important depleted functions include phosphoric diester hydrolase activity, flavin adenine dinucleotide binding, and S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity, indicating potential suppression of DNA and RNA processing functions, along with impaired catalytic processes essential for maintaining genetic stability under infection stress. Conversely, the enriched terms (**Fig. 6, Panel B, Right**) reveal an upregulation of activities critical to protein folding, transport, and signaling. Notably, adenylyl-nucleotide exchange factor activity, chaperone binding, and tRNA binding are significantly enriched, highlighting a prominent role for molecular chaperones and translation factors in the hemocyte response to infection. Additional enriched functions include organic anion transporter activity, GTPase regulator activity, protein serine/threonine kinase activity, and signaling receptor regulator activity, suggesting enhanced signaling and energy metabolism. These processes are critical for mounting an efficient immune response. This pattern indicates that during *Vibrio aestuarianus* infection, hemocytes experience a downregulation of nucleic acid-associated catalytic functions and an upregulation of protein folding, signal transduction, and molecular transport functions, reflecting a shift in focus towards managing protein homeostasis and orchestrating immune signaling in response to pathogen stress. In the GO biological process (BP) category, the RBGOA analysis also shows significant shifts in several biological pathways. The depleted

terms (**Fig. 6, Panel C, Left**) reveal a marked downregulation in processes related to DNA replication and repair. Key depleted terms include DNA strand elongation involved in DNA replication, transcription initiation from RNA polymerase II promoter, and double-strand break repair via homologous recombination, suggesting compromised DNA synthesis and repair mechanisms under infection stress. Other notable depleted terms involve processes linked to chromosome organization, regulation of cell cycle, and nucleoside phosphate metabolic processes, indicating a broad suppression of cellular proliferation and metabolic regulation in hemocytes during the immune response. On the other hand, the enriched terms (**Fig. 6, Panel C, Right**) emphasize processes critical to protein localization, cellular response to stress, and membrane dynamics. Specifically, processes such as maintenance of protein localization in organelles, post-translational protein targeting to endoplasmic reticulum, and retrograde vesicle-mediated transport are significantly enriched. These enriched terms highlight the importance of protein trafficking and membrane organization in managing the infection. Additional enrichment in processes such as cellular response to oxygen-containing compounds, endoplasmic reticulum organization, and response to hydrogen peroxide reflect a robust cellular stress response and adaptation to oxidative stress, which is likely exacerbated during bacterial infection. Overall, the analysis indicates a downregulation of DNA replication, repair, and cell cycle regulation and an upregulation of protein targeting, stress response, and membrane transport processes, underscoring the shift from proliferation and maintenance of genetic integrity to managing protein homeostasis and oxidative stress during the immune response in hemocytes.

To further elucidate the pathways affected by *Vibrio aestuarianus* infection, a KEGG pathway enrichment analysis was conducted on DEGs between control and high bacterial load (Va HD) infected oysters (**Figure 6, Panel D**). This analysis identified key pathways across multiple functional categories, including Cellular Processes, Environmental Information Processing, Genetic Information Processing, and Metabolism, which were significantly enriched in response to the infection. Within the Cellular Processes category, pathways related to cellular degradation and recycling were notably enriched, with Mitophagy, Autophagy, Endocytosis, and Efferocytosis showing substantial upregulation. These pathways suggest enhanced mechanisms for the removal of damaged organelles and apoptotic cells, crucial for maintaining cellular homeostasis during infection. In the Environmental Information Processing category, TGF-beta signaling, mTOR signaling, and FoxO signaling pathways were significantly enriched. These pathways play vital roles in regulating immune responses, cell growth, differentiation, and apoptosis, highlighting their importance in modulating the oyster immune

(D) Bar plot showing enriched KEGG pathways associated with differentially expressed genes across several biological processes, including metabolism, genetic information processing, environmental information processing, and cellular processes. The x-axis represents fold enrichment, and the y-axis lists the KEGG pathways. The color gradient represents the $-\log_{10}(\text{p-value})$, and the size of the bars indicates the number of genes involved in each pathway. Analyses were performed using Rank-Based Gene Ontology Analysis (RBGOA) to identify functional categories of DEGs across three GO term ontologies (**BP**: Biological Process, **MF**: Molecular Function, **CC**: Cellular Component) and KEGG pathway enrichment analysis.

Discussion

Vibrio aestuarianus infections pose a significant threat to oyster farming, causing substantial mortality rates, particularly during warmer seasons (de Lorgeril et al. 2020). While previous research has investigated the hemocyte response to high concentrations of *V. aestuarianus* (Lorgeril et al. 2011), the detailed progression of the immune response, from the initial bacterial entry to the eventual death of the host, remains insufficiently characterized. In this study, we observed that *V. aestuarianus* infection triggers a marked increase in the concentrations of several hemocyte types indicating an active and targeted immune response. This cellular expansion likely represents the oyster's effort to combat bacterial proliferation. Furthermore, our transcriptomic analysis revealed the upregulation of genes involved in immune signaling pathways, reactive oxygen species production, and autophagy, particularly in oysters with higher bacterial loads. This reprogramming of gene expression highlights a shift in the oyster's physiological priorities, emphasizing immune defense over routine cellular maintenance functions, as evidenced by the downregulation of DNA repair and metabolic processes.

In our study, *M. gigas* was infected with *V. aestuarianus* using the immersion method, an ecologically realistic protocol replicating natural infection (Parizadeh et al. 2018). Our results revealed significant variations in circulating hemocyte populations. Notably, we observed a global hemocyte concentration increase post-infection, compared to pre-infection levels, in a similar way to what was already described after 5 days of infection using an injection protocol (Labreuche, Lambert, et al. 2006). This hemocyte concentration increase appears specific to the infection process as it was not observed in non-exposed conditions and in exposed-but-non-infected animals. However, the specificity of this cytologic response remains unknown, as a single virulent strain of *V. aestuarianus* was used in our infection experiment, principally because our experimental protocol relies on oyster-shed hypervirulent vibrios, able to colonize new hosts. This protocol only works with virulent *V. aestuarianus* strains, as non virulent strains

do not induce mortalities and are not shed by oysters. Moreover, this protocol also does not function with other oyster pathogenic *Vibrio* (*Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio harveyi*), these belonging to the pathobiota involved in a polymicrobial disease (POMS) where it is the viral agent that is mainly transmitted by water. However, more generally, many studies report oyster total hemocyte count (THC) variations, especially in response to parasitic and bacterial pathogens (T. Zhang et al. 2014; Comesaña et al. 2012) suggesting that this primary cellular response is quite common during *M. gigas* infections.

Beyond the total concentration, the cellular composition of the hemolymph matters. Contrary to long-established belief, oyster hemolymph is made up of 7 morphologically and functionally distinct types (De La Forest Divonne et al. 2024). Our results indicated that the concentration of macrophage-like, basophilic and acidophilic blasts-like cells, vesicular cells, small and big granule cells increased during the infection, compared to pre-infection levels suggesting a common hematopoiesis or hemocyte migration effort to fight the infection.

Interestingly, hyalinocyte concentrations remained unchanged throughout *V. aestuarianus* infection. Unlike phagocytes that are primarily granular hemocytes (Wang et al. 2017), hyalinocytes play a more prominent role in producing antimicrobial peptides (AMPs) (De La Forest Divonne et al. 2024). The absence of a significant increase in the concentration of hyalinocytes, may suggest that during late infection stages, oysters could prioritize a cellular immune response, rather than an AMP-mediated response to counter *V. aestuarianus*. It is also possible that *V. aestuarianus* actively kills hyalinocytes, as this virulence mechanism is common in pathogenic *Vibrio* infecting oysters (Rubio et al. 2019; Oyanedel et al. 2023).

The most pronounced hemocyte increase was observed at high bacterial loads, reaching septicemic levels ($\sim 10^8$ CFU/mL). This hemocyte increase was significantly elevated for blast-like hemocytes and granular hemocytes (macrophage-like and vesicular cells).

Granular hemocytes are known to play a central role in oyster immunity (Wang et al. 2017), being involved in phagocytosis and the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), which are crucial for pathogen elimination (de la Ballina et al. 2022). Furthermore, these cells are part of the same differentiation pathway as recently described by (De La Forest Divonne et al. 2024). Hence, these cells could represent a delayed hematopoietic response during the later stages of the disease, possibly reflecting an attempt to compensate for the failure of earlier immune mechanisms to control the infection. In the hemocyte differentiation model proposed by (De La Forest Divonne et al. 2024), MLs can differentiate into SGCs. The lack of significant SGC proliferation could be explained by a reduction of cell cycle and cell

differentiation gene expression in septicemic oysters, potentially reflecting a shift in cellular functions towards a response to the infection, instead of a differentiation of MLs to SGCs. The transcriptomic analysis supported our cytological findings, revealing significant changes only in septicemic oysters. Although we observed a significant increase in blast-like granular cells (BGCs) during early infection stages, no significant transcriptomic changes were observed at these stages. Given that BGCs make up only a small percentage (~2%) of the total hemocyte population in healthy oysters (De La Forest Divonne et al. 2024), this lack of signal may be due to background noise masking the transcriptomic differences. A limited number of immune-related genes were upregulated at this infection stage (IL-17-like, MyD88, TNFR), suggesting activation of the Toll/NF- κ B signaling pathway, known to be involved in the production of pro-inflammatory cytokines, and interferon responses (Kawai et Akira 2007). Our findings are consistent with previous research, where an infection with a mixture of pathogenic *Vibrios* induces the expression of TLR and signaling molecules involved in the signaling pathway (MyD88, TRAF, cactus and ECSIT) (L. Zhang et al. 2015; Gueguen et al. 2003). Once again, we could not assert the specificity of this response, as TLR activation is common in bacterial infections (Gerold, Zychlinsky, et de Diego 2007). Previous work comparing oyster hemocyte gene expressions in response to two bacterial pathogens, *V. aestuarianus* 02/041 and *V. tasmaniensis* LGP32, revealed a high level of similarities in the transcriptomic profile of infected oyster's hemocyte exposed to these 2 pathogens (Lorgeril et al. 2011). However, significant differences were reported when compared to non pathogenic *V. tasmaniensis* LMG20012t induced response, suggesting a common immune response to pathogenic *Vibrios*. No cytological or transcriptomic changes were detected during the early stages of the infection, and we currently don't know how *V. aestuarianus* evades the host immune response, as most studies replicate late infection stages with a high bacterial load injection (Labreuche et al. 2010; Lorgeril et al. 2011). The virulence of *V. aestuarianus* is largely driven by several critical factors, notably the production of the metalloprotease Vam (Labreuche et al. 2010) secreted through extracellular product (Labreuche, Soudant, et al. 2006). The regulation of this virulence factor is intricately controlled by the VarS protein, which has been linked to a quorum sensing mechanism in *V. cholerae* via the VarS/VarA signaling pathway, a two-component system that responds to bacterial density within the host (Goudenège et al. 2015; Lenz et al. 2005). Furthermore, the expression of this metalloprotease has been shown to be quorum sensing dependent (De Decker, Reynaud, et Saulnier 2013). Given that our major transcriptomic and cytological responses were observed only at high bacterial concentrations, it is possible that in these oysters, *V. aestuarianus* employs quorum sensing to regulate the expression of Vam, as

well as other virulence factors, triggering a robust immune response only at later infection stages.

Also, given that the high natural bacterial concentration within the oyster hemolymph (between 10^2 and 10^3 CFU / mL) (Olafsen et al. 1993) is similar to the level of infection of our low dose oysters, a full-scale immune response might only be triggered when bacterial loads surpass a critical threshold, where lower levels of bacterial infection do not provoke a major immune response, conserving energy and minimizing immune-mediated damages.

However, one limit of our experiment is the lack of data during the intermediate stages of infection, (with a bacterial load close to 10^6 bacteria per mL), preventing us from getting the full picture of the hemocyte response during the infection. As *V. aestuarianus* is known to infect multiple organs in the oyster (Parizadeh et al. 2018), only looking at the hemolymph may not allow a complete understanding of *V. aestuarianus* interaction with hemocytes, as they might migrate from infected tissues to hemolymph or the opposite (Allam et Pales Espinosa 2016).

Our gene ontology and KEGG pathway analyses revealed an upregulation of genes involved in protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) and autophagy. Autophagy appears to serve a dual role in *M. gigas* hemocytes. First, it acts as a cellular stress response, managing protein turnover and mitigating the damage caused by bacterial toxins (Deretic et Levine 2009). Second, autophagy may contribute directly to pathogen clearance via xenophagy (Bauckman, Owusu-Boaitey, et Mysorekar 2015; Moreau et al. 2015). Key autophagy-related genes implicated in bacterial clearance, such as ATG8 and LC3, which are conserved in *M. gigas* (Picot et al. 2020), are key components of this process, as demonstrated in *M. gigas*, where LC3-II accumulation suggests autophagy is induced during *V. aestuarianus* infection (Moreau et al. 2015). Similar autophagy-driven processes have been demonstrated in other oyster pathogens, such as the OsHV-1 virus, where autophagy inhibition led to increased oyster mortality (Moreau et al. 2015). Our data confirm that autophagy might play a role in managing hemocyte stress during *V. aestuarianus* infection. However, it remains unclear whether autophagy is actively involved in pathogen clearance or simply serves to maintain cellular integrity during infection. Further studies are needed to clarify the specific role of autophagy in *V. aestuarianus* infection.

Overall, our study highlights the complex and dynamic nature of the immune response of *Magallana gigas* to *Vibrio aestuarianus* infection, particularly in the later stages of the disease. We demonstrated a significant increase in hemocyte populations, especially granular and blast-like cells, under high bacterial load, suggesting a delayed but intense hematopoietic response to compensate for early immune evasion by the pathogen. The transcriptomic data supported

these findings, revealing downregulation of cell cycle and DNA repair genes, as well as the activation of autophagy-related pathways, which may serve both protective and pathogen-clearance roles. Notably, our results also suggest that *V. aestuarianus* might hide to avoid early immune detection, allowing the infection to progress until it reaches a critical bacterial concentration. Although we provided new insights into the immune mechanisms at play, the absence of intermediate infection data and the sole focus on hemolymph limit our ability to fully capture the complete immune dynamics. Future studies should investigate autophagy's role in hemocyte response to *V. aestuarianus* and explore tissue-specific responses to access a broader understanding of the oyster's hemocytes - bacteria crosstalk, deepening our understanding of oysters immune defenses against this pathogen. A finer understanding of *M. gigas* response to this infection will help to select *V. aestuarianus*-resistant oysters, for future in-field implantations.

Material and methods

Conservation of oysters

The work described here was performed using ISA (Ifremer Standardized Oysters - La tremblade - France) *Magallana (Crassostrea) gigas* oysters. Animals were washed and kept in 10 L tanks containing seawater (13° C and 33 Practical Saline Units) and a bubbler to oxygenate and homogenize the water. Water was changed daily and oyster health was monitored. All animals used in this study were 18 months of age.

Preparation of *Vibrio aestuarianus* for infection experiments

The virulent strain *Vibrio aestuarianus* 02/041 was used for all infection experiments. Bacteria were cultured overnight at 25°C with constant shaking in LB-NaCl 0.3 M medium (Luria-Bertani broth supplemented with 7.5 g/L NaCl). Bacterial growth was monitored using an Eppendorf BioPhotometer (Hamburg, Germany). After overnight incubation, bacterial cultures were centrifuged at 2500 g for 10 minutes, and the resulting pellet was washed twice in Lewis medium (0.4 M sodium chloride, 20 mM potassium chloride, 5 mM magnesium sulfate, and 1.35 mM calcium chloride). The bacteria were then resuspended in the same medium to achieve a final concentration of 10⁸ CFU/mL. A total of 100 µL of the *V. aestuarianus* 02/041 suspension was injected into donor oysters.

Experimental balneation methodology for *Vibrio aestuarianus* infection

The balneation method was employed to simulate a natural infection process as accurately as possible (Parizadeh et al. 2018). In this method, "donor" oysters, infected with *Vibrio aestuarianus*, secreted the bacteria into the water during their terminal stages. Receiver oysters were subsequently exposed to this infected water and became infected through their filtration process. To facilitate hemolymph sampling, an incision was made on the right posterior side of the receiver oysters' shells. The receivers were then acclimatized in water with progressively increasing temperatures over the course of a week, starting at 13° C and gradually increasing to 25° C. This was followed by an additional 12-day period at 25° C to ensure recovery from the incision and adaptation to the higher temperature. 19 days after the start of the experiment, hemolymph was collected from the receiver oysters for cytological analysis. A seven-day recovery period followed to ensure proper healing from the first puncture before exposing the receiver oysters to the infected water. During this time, 80 donor oysters were prepared. The donors were anesthetized with MgCl₂ for 4 hours before being injected into their adductor muscles with a suspension of 5.10⁸ CFU/mL of *V. aestuarianus* 02/041 in Lewis medium. The donor oysters were then placed in 5 L tanks (40 oysters per tank) for 2 days post-injection. Infected water was collected, and qPCR quantification (targeting the *dnaJ* gene) was performed to confirm the presence of bacteria. After ensuring bacterial presence, the receiver oysters were exposed to the infected water for 5 days. Following this exposure, hemolymph was collected from the pericardial cavities of the receivers using 23 G needles mounted on 2.5 mL syringes preloaded with 1 mL of modified ALSEVER medium (115 mM glucose, 31 mM sodium citrate, 385 mM NaCl, 4 mg/mL bovine serum albumin). 200 µL of the total hemolymph was allocated for cytological analysis, and another 200 µL was used for RT-qPCR quantification of *V. aestuarianus* presence. The remaining hemolymph was centrifuged, and the resulting pellet was resuspended in TRIzol for RNA extraction.

Mortality monitoring of oysters exposed to *Vibrio aestuarianus*

Mortality was monitored in a total of 40 oysters. The oysters were kept in 4 different tanks, with 10 animals per tank. Three tanks contained infected water, while one tank contained uninfected seawater. Mortality was tracked over 19 days without changing the water. The oysters were maintained at 25°C in seawater with a salinity of 33 PSU (Practical Salinity Units), and aeration was provided to oxygenate and homogenize the water. Mortality was recorded daily for the 19-day observation period.

Bacterial Load Quantification Using RT-qPCR

Bacterial load in both the infected water and hemolymph was quantified using RT-qPCR following DNA extraction. DNA was extracted using the QIAamp DNA Extraction Kit (Qiagen, Germany). RT-qPCR was performed using dnaJ primer pairs (specific for *V. aestuarianus*) and SYBR Green for fluorescence detection. The thermal cycling profile for RT-qPCR was as follows: an initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 10 seconds at 95°C, 20 seconds at 60°C, and 25 seconds at 72°C. SYBR Green fluorescence was measured at the 60°C step. At the end of the 40 amplification cycles, a dissociation curve analysis was performed. This began with a denaturation step at 95°C for 1 minute, followed by 30 seconds at 55°C, and a gradual temperature increase from 55°C to 95°C, during which SYBR Green fluorescence was continuously measured. The dissociation process concluded with a final 30-second denaturation at 95°C.

Cytological Staining and Observation of Hemocyte Preparations

Approximately 200,000 fresh hemocytes per sample were plated onto Superfrost slides (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) using a Cytospin 4 centrifuge (Thermo Scientific, USA). All slides were stained with MCDh (Micro Chromatic Detection for Hematology) (Cellavision, Sweden). According to the manufacturer's protocol, slides were immersed in a series of four MCDh reagents: 10 minutes in MCDh1, followed by 2 minutes and 1 minute in two consecutive baths of MCDh2, 3 minutes in MCDh3, and 10 seconds in MCDh4. After staining, a No. 1.5H, 12 mm diameter coverslip was mounted onto each slide using EUKITT mounting agent (VWR, Belgium). Slides were observed using a Leica DM6000 transmitted-light optical microscope with a 63X oil immersion objective (Leica Microsystems, Germany). Images were captured using a Prokyon camera (Jenoptik, Germany). Images were processed using the CellCounter plugin in ImageJ to quantify the number of each hemocyte type per image.

RNA sequencing

RNA-seq library construction and sequencing were performed by the BioEnvironment Platform (Perpignan, France). Directional cDNA libraries were constructed using the NEBNext-Ultra II Library prep kit RNA-Seq (NEB #E7765) and sequenced on a Nextseq 550 system aiming to 25 M reads in single-end reads 150 bp.

Primary bioinformatic : quality control reads alignment and quantification

RNA sequencing was performed on 20 different samples, and raw reads were subjected to a comprehensive quality control pipeline. Initial quality metrics were obtained using FastQC (v0.11.9) (Andrews 2010) to assess read quality, followed by MultiQC (Ewels et al. 2016) for aggregate reporting across all samples. To correct potential sequencing errors in the RNA reads, the rcorrector tool (Song et Florea 2015) was applied, which identifies and corrects k-mer-based errors in RNAseq data. Subsequently, reads were trimmed and filtered using Trim Galore (v0.6.6) (Krueger 2015), which removes adapter sequences and low-quality bases, ensuring that only high-quality reads were retained for downstream analysis. A second round of FastQC and MultiQC was conducted on the quality-controlled reads to confirm improvement in read quality after trimming. The quality-controlled reads were aligned to the latest reference genome of *Magallana gigas* (Pacific oyster) from the NCBI database using HISAT2 (v2.2.1) (Kim et al. 2019). Default parameters were used for alignment, with minor adjustments to match the genome reference and optimize performance for oyster transcriptomics. Aligned reads were then quantified using HTSeq-count (v0.11.3) (Anders, Pyl, et Huber 2015), a Python-based script designed for counting reads mapped to genomic features such as exons. This step produced the gene-level counts that were used in subsequent differential gene expression analyses.

Secondary bioinformatic : DESeq2 analysis

Raw count data from the 20 samples were imported into R (version 4.4.1) and merged by gene names across samples. Initial quality control steps involved filtering out low-count genes, retaining only genes with at least 10 reads across all samples. The design matrix was constructed using metadata for each sample, categorizing them based on infection conditions, including control, negative, and low or high dose of *Vibrio aestuarianus* infection. The differential gene expression analysis was conducted using the DESeq2 package (Love, Huber, et Anders 2014). The DESeq2 dataset was created using the count matrix and sample metadata, with the condition variable set as the design factor. RNA-seq read counts were normalized, and differential expression was calculated using the Wald test, comparing gene expression between control and infected conditions. The comparisons included control vs. negative, control vs. low-dose infection, and control vs. high-dose infection, along with comparisons between infected groups. Principal component analysis (PCA) was performed using variance-stabilized data to visualize the variance explained by the top two principal components. Significantly differentially expressed genes (DEGs) were filtered based on an adjusted p-value ($\text{padj} < 0.05$). Volcano plots were

generated using the EnhancedVolcano package to highlight significantly upregulated and downregulated genes. Venn diagrams of DEGs across comparisons were created using ggVenn-Diagram to visualize gene overlap between different conditions. Z-score normalized heatmaps of the top 20 upregulated and downregulated genes were generated using the ComplexHeatmap package (Gu, Eils, et Schlesner 2016).

KEGG pathway analysis

KEGG analysis was performed using the clusterprofile R library (Yu et al. 2012). Gene list of specifically differentially expressed genes were obtained after DESeq2 analysis (genes with $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ and significant p-value < 0.05) and used for KEGG annotation. The *M. gigas* reference genome from the DAVID bioinformatics resource was used for this analysis, with thresholds of 2 for counts and 0.05 for EASE value (p-value). KEGG annotation results were post-processed and presented as a heatmap showing the KEGG pathway, fold enrichment, p-value significance and number of positive terms.

Rank-Based Gene Ontology Analysis

RBGOA first clusters GO terms according to their representative genes to identify the most significant GO terms, and then ranks the identified biological processes according to their average expression levels (over all representative genes). Finally, biological processes, molecular functions and cellular components significantly enriched in DEGs are identified by a Mann-Whitney rank test with a strict FDR correction. The files generated by the GO-MWU scripts (https://github.com/z0on/GO_MWU) were post-processed to extract the category names and the fraction indicating the number of "good candidates" relative to the total number of genes belonging to that category. The "good candidates" were the genes that exceeded an arbitrary 'absValue' cutoff (defined as 0.001) in their significance measure. The results were presented as a dotplot with depleted and enriched GO terms in each category (CC : Cell Component, MF : Molecular Function and BP : Biological Process).

Statistical analysis

To assess differences between samples, statistical analysis was performed using R (version 4.4.1) (R Core Team, 2018) and appropriate packages. All data were examined for normality, and statistical tests were chosen accordingly. For normally distributed data, one-way analysis of variance (ANOVA) was used. A Tukey test was used to evaluate the statistical difference

between the proportions and number of hemocyte types. The null hypothesis was rejected at a significance level of $p \leq 0.05$.

References

- Allam, Bassem, et Emmanuelle Pales Espinosa. 2016. « Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? » *Fish & Shellfish Immunology*, Special Issue: ISFSI 2016, 53 (juin):4-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037>.
- Anders, Simon, Paul Theodor Pyl, et Wolfgang Huber. 2015. « HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data ». *Bioinformatics* 31 (2): 166-69. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- Andrews, Simon. 2010. « Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data ». 2010. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Arzul, Isabelle, Céline Garcia, Bruno Chollet, Delphine Serpin, Coralie Lupo, Mathilde Noyer, Delphine Tourbiez, Chloé Berland, Lionel Dégremont, et Marie-Agnès Travers. 2022. « First Characterization of the Parasite Haplosporidium Costale in France and Development of a Real-Time PCR Assay for Its Rapid Detection in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): e2041-58. <https://doi.org/10.1111/tbed.14541>.
- Ballina, Nuria R. de la, Francesco Maresca, Asunción Cao, et Antonio Villalba. 2022. « Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review ». *Frontiers in Immunology* 13 (avril):826255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>.
- Bauckman, Kyle A., Nana Owusu-Boaitey, et Indira U. Mysorekar. 2015. « Selective autophagy: Xenophagy ». *Methods, Autophagy*, 75 (mars):120-27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.005>.
- Comesaña, Pilar, Sandra M. Casas, Asunción Cao, Elvira Abollo, Isabelle Arzul, Benjamin Morga, et Antonio Villalba. 2012. « Comparison of Haemocytic Parameters among Flat Oyster *Ostrea Edulis* Stocks with Different Susceptibility to Bonamiosis and the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (3): 274-86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.007>.
- De Decker, Sophie, Yann Reynaud, et Denis Saulnier. 2013. « First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system ». *Aquaculture* 392-395 (mai):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.033>.
- De La Forest Divonne, Sébastien, Juliette Pouzadoux, Océane Romatif, Caroline Montagnani, Guillaume Mitta, Delphine Destoumieux-Garzon, Benjamin Gourbal, Guillaume M. Charrière, et Emmanuel Vignal. 2024. « Diversity and Functional Specialization of Oyster Immune Cells Uncovered by Integrative Single Cell Level Investigations ». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.07.19.604245>.
- Dégremont, Lionel, Patrick Azéma, Elise Maurouard, et Marie-Agnès Travers. 2020. « Enhancing resistance to *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas* by selection ». *Aquaculture* 526 (septembre):735429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735429>.
- Deretic, Vojo, et Beth Levine. 2009. « Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations ». *Cell Host & Microbe* 5 (6): 527-49. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.016>.
- Ewels, Philip, Måns Magnusson, Sverker Lundin, et Max Käller. 2016. « MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report ». *Bioinformatics* 32 (19): 3047-48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.
- Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert, et J.-L. Nicolas. 2007. « Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Microbial Ecology* 53 (2): 187-96. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9>.

- Gerold, Gisa, Arturo Zychlinsky, et Juana L. de Diego. 2007. « What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? » *Seminars in Immunology*, TLR-mediated Innate Immune Recognition, 19 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.003>.
- Geslin, Valentin, Leila Parizadeh, Marie-Agnès Travers, Luca Tomasetti, et Thor Ole Gulsrud. 2024. *Detection, Quantification and Characterisation by Digital Image Analysis Method of Bacterial Infection by Vibrio Aestuarianus, Stained by Immunohistochemistry, in the Pacific Oyster Magallana Gigas*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4833230>.
- Goudenège, David, Marie Agnès Travers, Astrid Lemire, Bruno Petton, Philippe Haffner, Yannick Labreuche, Delphine Tourbiez, et al. 2015. « A Single Regulatory Gene Is Sufficient to Alter *Vibrio Aestuarianus* Pathogenicity in Oysters: Comparative Genomics of *Vibrio Aestuarianus* ». *Environmental Microbiology* 17 (11): 4189-99. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12699>.
- Gu, Zuguang, Roland Eils, et Matthias Schlesner. 2016. « Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data ». *Bioinformatics* 32 (18): 2847-49. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>.
- Gueguen, Yannick, Jean-Paul Cadoret, Didier Flament, Catherine Barreau-Roumiguière, Anne-Laure Girardot, Julien Garnier, Alixe Hoareau, Evelyne Bachère, et Jean-Michel Escoubas. 2003. « Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas* ». *Gene* 303 (janvier):139-45. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01149-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01149-6).
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2007. « Signaling to NF-KappaB by Toll-like Receptors ». *Trends in Molecular Medicine* 13 (11): 460-69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.
- Kim, Daehwan, Joseph M. Paggi, Chanhee Park, Christopher Bennett, et Steven L. Salzberg. 2019. « Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype ». *Nature Biotechnology* 37 (8): 907. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>.
- King, William L., Cheryl Jenkins, Justin R. Seymour, et Maurizio Labbate. 2019. « Oyster Disease in a Changing Environment: Decrypting the Link between Pathogen, Microbiome and Environment ». *Marine Environmental Research* 143 (janvier):124-40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007>.
- Krueger, Felix. 2015. « Babraham Bioinformatics - Trim Galore! » 2015. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- Labreuche, Yannick, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Viviane Boulo, Arnaud Huvet, et Jean-Louis Nicolas. 2006. « Cellular and Molecular Hemocyte Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*, Following Bacterial Infection with *Vibrio Aestuarianus* Strain 01/32 ». *Microbes and Infection* 8 (12): 2715-24. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>.
- Labreuche, Yannick, Frédérique Le Roux, Joël Henry, Céline Zatylny, Arnaud Huvet, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Didier Mazel, et Jean-Louis Nicolas. 2010. « *Vibrio Aestuarianus* Zinc Metalloprotease Causes Lethality in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* and Impairs the Host Cellular Immune Defenses ». *Fish & Shellfish Immunology* 29 (5): 753-58. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.007>.
- Labreuche, Yannick, Philippe Soudant, Madeleine Gonçalves, Christophe Lambert, et Jean-Louis Nicolas. 2006. « Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 30 (4): 367-79. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003>.
- Lafont, Maxime, Priscila Goncalves, Ximing Guo, Caroline Montagnani, David Raftos, et Timothy Green. 2019. « Transgenerational Plasticity and Antiviral Immunity in the Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) against Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) ». *Developmental and Comparative Immunology* 91 (février):17-25. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.022>.
- Lenz, Derrick H., Melissa B. Miller, Jun Zhu, Rahul V. Kulkarni, et Bonnie L. Bassler. 2005. « CsrA and Three Redundant Small RNAs Regulate Quorum Sensing in *Vibrio Cholerae* ». *Molecular Microbiology* 58 (4): 1186-1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04902.x>.

- Lorgeril, Julien de, Aude Lucasson, Bruno Petton, Eve Toulza, Caroline Montagnani, Camille Clerissi, Jeremie Vidal-Dupiol, et al. 2018. « Immune-Suppression by OsHV-1 Viral Infection Causes Fatal Bacteraemia in Pacific Oysters ». *Nature Communications* 9 (1): 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>.
- Lorgeril, Julien de, Bruno Petton, Aude Lucasson, Valérie Perez, Pierre-Louis Stenger, Lionel Dégremont, Caroline Montagnani, et al. 2020. « Differential Basal Expression of Immune Genes Confers *Crassostrea Gigas* Resistance to Pacific Oyster Mortality Syndrome ». *BMC Genomics* 21 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6471-x>.
- Lorgeril, Julien de, Reda Zenagui, Rafael D. Rosa, David Piquemal, et Evelyne Bachère. 2011. « Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea Gigas* by Digital Gene Expression Analysis ». *PLOS ONE* 6 (8): e23142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023142>.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12): 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Mesnil, Aurélie, Maude Jacquot, Céline Garcia, Delphine Tourbiez, Lydie Canier, Audrey Bidois, Lionel Dégremont, et al. 2023. « Emergence and Clonal Expansion of *Vibrio Aestuarianus* Lineages Pathogenic for Oysters in Europe ». *Molecular Ecology* 32 (11): 2869-83. <https://doi.org/10.1111/mec.16910>.
- Moreau, Pierrick, Kevin Moreau, Amélie Segarra, Delphine Tourbiez, Marie-Agnès Travers, David C. Rubinsztein, et Tristan Renault. 2015. « Autophagy Plays an Important Role in Protecting Pacific Oysters from OsHV-1 and *Vibrio Aestuarianus* Infections ». *Autophagy* 11 (3): 516-26. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188>.
- Olafsen, Jan A., Helene V. Mikkelsen, Hanne M. Giæver, et Geir Høvik Hansen. 1993. « Indigenous Bacteria in Hemolymph and Tissues of Marine Bivalves at Low Temperatures ». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6): 1848-54. <https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1848-1854.1993>.
- Oyanedel, Daniel, Arnaud Lagorce, Maxime Bruto, Philippe Haffner, Amandine Morot, Yannick Labreuche, Yann Dorant, et al. 2023. « Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (40): e2305195120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2305195120>.
- Parizadeh, Leila, Delphine Tourbiez, Céline Garcia, Philippe Haffner, Lionel Dégremont, Frédérique Le Roux, et Marie-Agnès Travers. 2018. « Ecologically Realistic Model of Infection for Exploring the Host Damage Caused by *Vibrio Aestuarianus* ». *Environmental Microbiology* 20 (12): 4343-55. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350>.
- Petton, Bruno, Delphine Destoumieux-Garzón, Fabrice Pernet, Eve Toulza, Julien de Lorgeril, Lionel Dégremont, et Guillaume Mitta. 2021. « The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of Knowledge and Future Directions ». *Frontiers in Immunology* 12 (février):630343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>.
- Picot, Sandy, Nicole Faury, Isabelle Arzul, Bruno Chollet, Tristan Renault, et Benjamin Morga. 2020. « Identification of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, *Crassostrea gigas* ». *Autophagy* 16 (11): 2017-35. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713643>.
- Poirier, Aurore C., Paulina Schmitt, Rafael D. Rosa, Audrey S. Vanhove, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Tristan P. Rubio, Guillaume M. Charrière, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2014. « Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity: Evidences in *Crassostrea Gigas* ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (36): 24821-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546>.
- Rubio, Tristan, Daniel Oyanedel, Yannick Labreuche, Eve Toulza, Xing Luo, Maxime Bruto, Cristian Chaparro, et al. 2019. « Species-Specific Mechanisms of Cytotoxicity toward Immune Cells Determine the Successful Outcome of *Vibrio* Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (28): 14238-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>.

- Schmitt, Paulina, Rafael Rosa, Marylise Duperthuy, Julien de Lorgeril, Evelyne Bachère, et Delphine Destoumieux-Garzon. 2012. « The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora ». *Frontiers in Microbiology* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00160>.
- Song, Li, et Liliana Florea. 2015. « Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads ». *GigaScience* 4 (1): 48. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0089-y>.
- Wang, Weilin, Meijia Li, Lingling Wang, Hao Chen, Zhaoqun Liu, Zhihao Jia, Limei Qiu, et Linsheng Song. 2017. « The Granulocytes Are the Main Immunocompetent Hemocytes in *Crassostrea Gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 67 (février):221-28. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>.
- Yu, Guangchuang, Li-Gen Wang, Yanyan Han, et Qing-Yu He. 2012. « ClusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters ». *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16 (5): 284. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
- Zhang, Linlin, Li Li, Ximing Guo, Gary W. Litman, Larry J. Dishaw, et Guofan Zhang. 2015. « Massive Expansion and Functional Divergence of Innate Immune Genes in a Protostome ». *Scientific Reports* 5 (1): 8693. <https://doi.org/10.1038/srep08693>.
- Zhang, Tao, Limei Qiu, Zhibin Sun, Lingling Wang, Zhi Zhou, Rui Liu, Feng Yue, Rui Sun, et Linsheng Song. 2014. « The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus* ». *Developmental & Comparative Immunology* 45 (1): 141-50. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015>.

Supplementary Materials for

Magallana gigas immune response dynamic through a *V. aestuarianus* francensis natural infection.

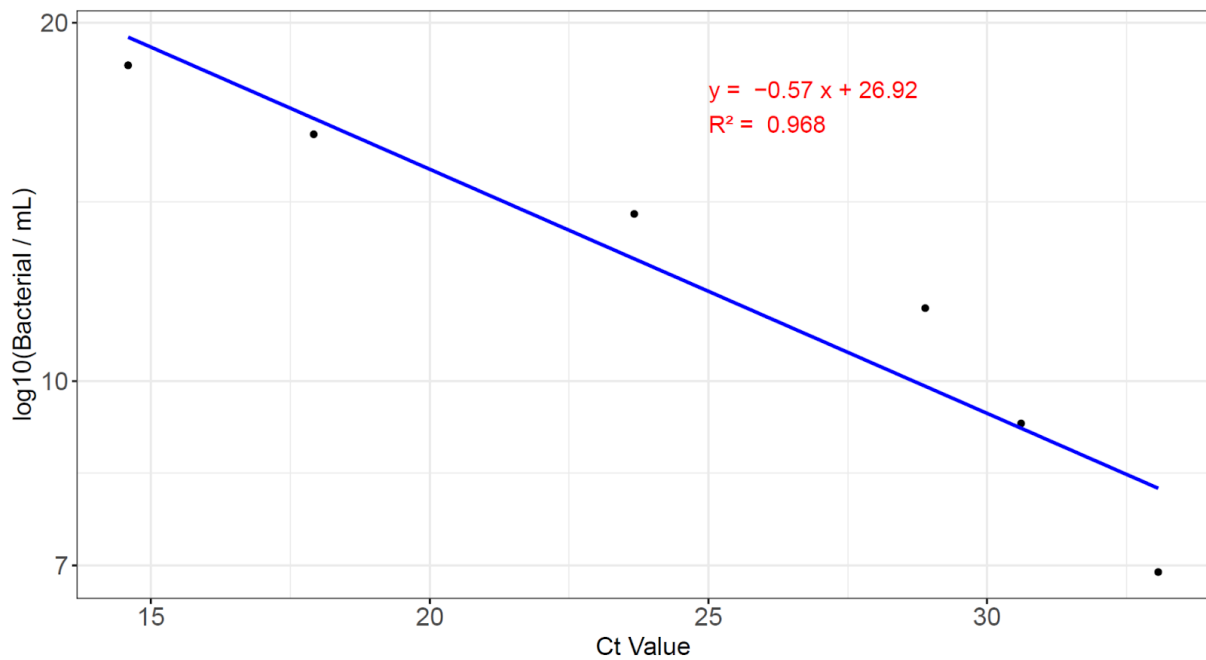
Sébastien de la Forest Divonne *et al.*

*Corresponding author. Email: emmanuel.vignal@umontpellier.fr

This PDF file includes:

Tables S1 to S2

Figs. S1 to S2



Supplemental Figure 1: Standard curve for the quantification of *V. aestuarianus* concentration (dnaJ gene quantification). The x-axis represents the *V. aestuarianus* detection cycles. The y-axis shows the log10 of the bacterial concentration. The line and its equation represent the linear regression of concentration as a function of Ct. The R² value represents the square of the correlation coefficient between Ct values and bacterial concentration.

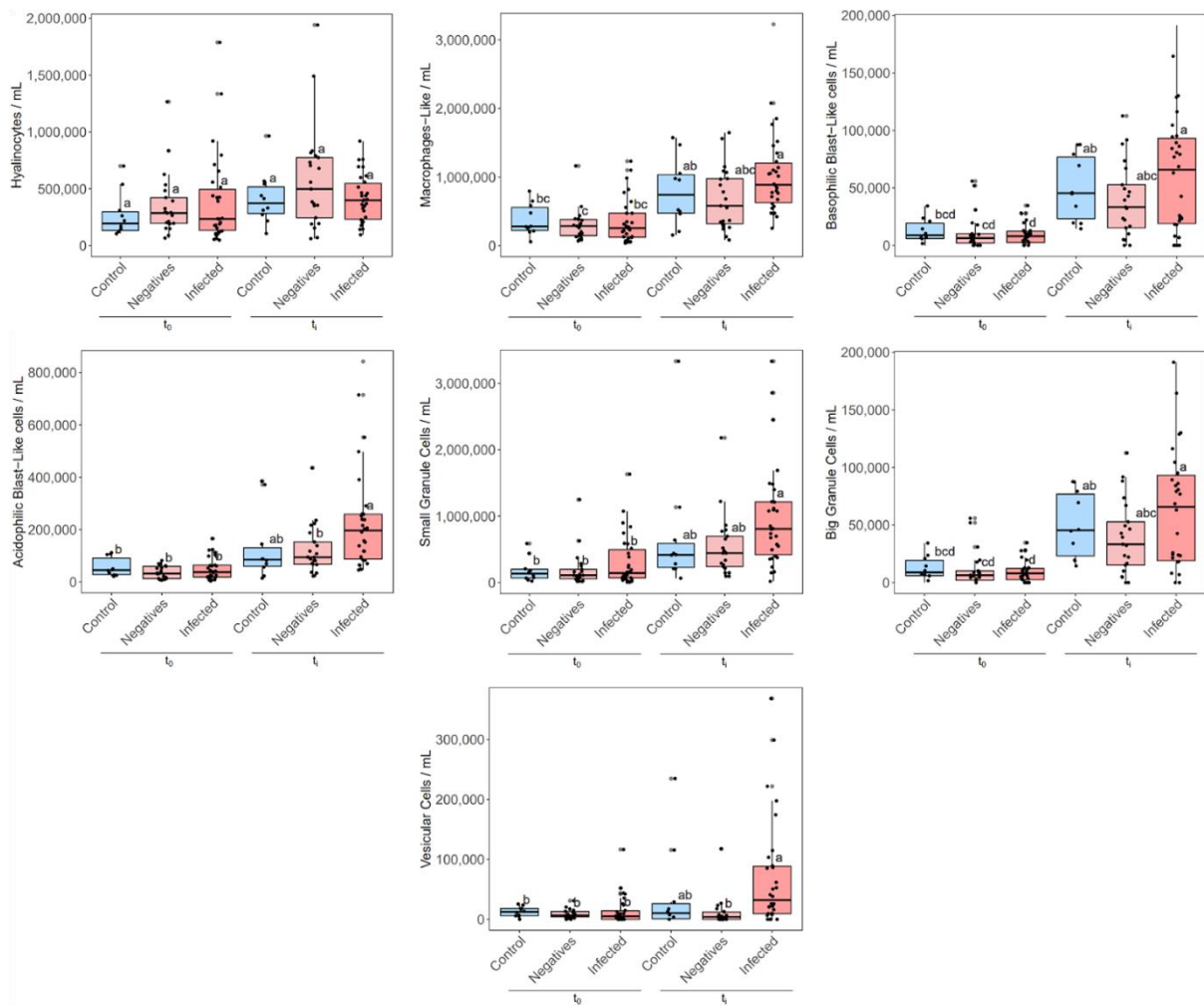
		Instantaneous mortality																		
Conditions	Tanks	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19
02/041	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	3	0	0	0
02/041	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
02/041	3	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		Cumulative mortality																		
Conditions	Tanks	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19
02/041	1	0	0	1	1	2	3	3	3	3	5	6	6	6	6	6	9	9	9	9
02/041	2	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
02/041	3	0	1	1	3	3	3	4	5	5	5	5	6	6	6	7	8	8	8	8
Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Supplemental Table 1: Monitoring of mortality rates recorded during the experimental infection trial. The two tables represent instantaneous mortality (top) and cumulative mortality (bottom) observed over the 19-day monitoring period. The control animals were kept in one tank containing 10 oysters, while the infected animals were divided into three tanks with 10 oysters each.

Conditions	Samples	Ct		Bacterial concentration	Hemocyte concentration / mL	
		t ₀	t ₁		t ₀	t ₁
Negatives	2	No Ct	No Ct	No quantification	1,00E+06	2,90E+06
Negatives	6	No Ct	No Ct	No quantification	4,00E+05	2,20E+06
Negatives	10	No Ct	No Ct	No quantification	1,00E+06	7,00E+05
Negatives	12	No Ct	No Ct	No quantification	7,00E+05	2,20E+06
Negatives	14	No Ct	No Ct	No quantification	3,00E+05	1,10E+06
Negatives	15	No Ct	No Ct	No quantification	5,00E+05	3,00E+05
Negatives	17	No Ct	No Ct	No quantification	1,00E+06	2,60E+06
Negatives	33	No Ct	No Ct	No quantification	8,00E+05	2,20E+06
Negatives	36	No Ct	No Ct	No quantification	1,20E+06	6,00E+05
Negatives	39	No Ct	No Ct	No quantification	9,00E+05	1,20E+06
Negatives	40	No Ct	No Ct	No quantification	9,00E+05	2,90E+06
Negatives	42	No Ct	No Ct	No quantification	1,10E+06	2,30E+06
Negatives	43	No Ct	No Ct	No quantification	1,10E+06	4,50E+06
Negatives	64	No Ct	No Ct	No quantification	3,00E+05	1,10E+06
Negatives	66	No Ct	No Ct	No quantification	8,00E+05	2,20E+06
Negatives	67	No Ct	No Ct	No quantification	1,10E+06	1,80E+06
Negatives	71	No Ct	No Ct	No quantification	9,40E+05	1,70E+06
Negatives	72	No Ct	No Ct	No quantification	3,93E+06	2,50E+06
Negatives	78	No Ct	No Ct	No quantification	7,24E+05	6,40E+06
Negatives	79	No Ct	No Ct	No quantification	4,60E+05	1,20E+06
Negatives	81	No Ct	No Ct	No quantification	1,70E+06	2,40E+06
Infected	3	No Ct	32,955	1,41E+04	3,00E+05	2,70E+06
Infected	16	No Ct	14,32	1,96E+08	1,00E+06	3,90E+06
Infected	19	No Ct	29,34	8,98E+04	5,00E+05	3,60E+06
Infected	20	No Ct	15,515	1,06E+08	1,10E+06	4,20E+06
Infected	21	No Ct	27,565	2,23E+05	3,80E+06	6,70E+06
Infected	22	No Ct	33,625	1,00E+04	1,50E+06	2,60E+06
Infected	23	No Ct	30,38	5,27E+04	4,00E+06	1,90E+06
Infected	26	No Ct	29,51	8,23E+04	3,00E+05	3,50E+06
Infected	27	No Ct	28,51	1,37E+05	1,50E+06	3,90E+06
Infected	28	No Ct	33,975	8,37E+03	1,70E+05	2,50E+06
Infected	30	No Ct	35,4	4,03E+03	3,00E+05	1,70E+06
Infected	31	No Ct	32,45	1,83E+04	1,00E+06	3,30E+06
Infected	37	No Ct	35,12	4,65E+03	9,00E+05	1,10E+06
Infected	38	No Ct	35,1	4,70E+03	1,70E+06	1,80E+06
Infected	41	No Ct	27,105	1,34E+05	1,00E+06	1,80E+06
Infected	44	No Ct	33,74	3,49E+03	2,20E+06	4,60E+06
Infected	45	No Ct	33,095	4,98E+03	9,00E+05	1,80E+06
Infected	46	No Ct	28,765	5,39E+04	5,00E+05	3,10E+06
Infected	47	No Ct	30,32	2,29E+04	8,00E+05	2,90E+06
Infected	48	No Ct	26,85	1,54E+05	2,00E+05	1,00E+06
Infected	49	No Ct	26,075	2,36E+05	7,00E+05	2,90E+06
Infected	50	No Ct	31,85	9,87E+03	1,90E+06	2,00E+06
Infected	51	No Ct	14,29	1,54E+08	2,50E+06	6,60E+06
Infected	52	No Ct	30,76	1,80E+04	4,00E+05	1,20E+06
Infected	53	No Ct	32,59	6,57E+03	5,00E+05	1,30E+06
Infected	65	No Ct	33,22	4,65E+03	1,90E+06	3,00E+06
Infected	68	No Ct	23,01	1,28E+06	6,00E+05	5,90E+06
Infected	69	No Ct	34,46	2,35E+03	1,00E+06	1,60E+06
Infected	73	No Ct	13,36	3,21E+08	2,39E+05	2,70E+06
Infected	75	No Ct	33,45	1,09E+04	3,31E+06	5,70E+06
Infected	77	No Ct	14,205	2,08E+08	1,96E+06	2,90E+06
Controls	55	No Ct	No Ct	No quantification	1,40E+06	1,80E+06
Controls	56	No Ct	No Ct	No quantification	5,00E+05	3,60E+06
Controls	57	No Ct	No Ct	No quantification	1,60E+06	1,70E+06
Controls	58	No Ct	No Ct	No quantification	3,00E+05	1,20E+06
Controls	59	No Ct	No Ct	No quantification	8,00E+05	3,50E+06
Controls	60	No Ct	No Ct	No quantification	7,00E+05	2,80E+06
Controls	61	No Ct	No Ct	No quantification	7,00E+05	1,00E+06
Controls	63	No Ct	No Ct	No quantification	6,00E+05	1,00E+06
Controls	70	No Ct	No Ct	No quantification	2,30E+06	7,00E+05
Controls	82	No Ct	No Ct	No quantification	1,50E+06	5,70E+06

Supplemental Table 2: Quantification of *V. aestuarianus* and hemocyte concentration from hemolymph samples before and after *V. aestuarianus* infection. Animals exposed to *V. aestuarianus* (infected and negative) are shown in red, while control animals (non-exposed) are shown in blue.



Supplemental Figure 2: Comparison of hemocyte type concentrations between all samples at t_0 and t_1 . Control animals (blue), negative (light red), and positive (dark red) animals are shown and grouped according to each hemocyte type. The alphabetic characters displayed above the data points in each plot represent statistically significant differences among the groups, as determined by Tukey's test following ANOVA. Groups denoted by different letters differ significantly from each other at the $p < 0.05$ level of statistical significance. Differences between t_0 and t_1 are only observed in animals from the infected group.

PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

L'objectif de ma thèse a été d'apporter un niveau de détail supplémentaire concernant la diversité des hémocytes de *C. gigas*, car ces cellules, jusqu'alors peu décrites, sont principalement impliquées dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, constituant ainsi une pierre angulaire dans la compréhension des maladies responsables des épisodes de mortalité massive en ostréiculture. J'ai ainsi entrepris de caractériser les hémocytes de *Crassostrea gigas* par une approche cytologique, des approches de biologie cellulaire fonctionnelle et une approche transcriptomique de séquençage d'ARNm sur cellules uniques dans le but de mieux comprendre leur diversité. J'ai également caractérisé l'impact sur la diversité des hémocytes chez *C. gigas* d'une infection par *Vibrio aestuarianus*, qui est la bactérie pathogène majoritairement impliquée dans les mortalités ostréicoles chez l'huître adulte, L'objectif de cette section est de discuter les résultats obtenus à la lumière de la littérature existante, tout en proposant, en fin de partie, des perspectives pour ces travaux.

Nos travaux ont permis de définir les populations hémocytaires chez l'huître et d'établir un atlas de référence

Les résultats des travaux réalisés dans la première partie de ma thèse enrichissent les connaissances sur la diversité fonctionnelle et ontogénique des hémocytes de *Crassostrea gigas*. Nous avons identifié sept types d'hémocytes par cytologie, en procédant à un comptage individuel chez plusieurs animaux. Les hyalinocytes (H), les blastes, les cellules vésiculaires (VC) et les cellules à petits granules (SGC) avaient déjà été décrits sous d'autres dénominations dans des études antérieures (SuJung, SuMin, et HsinYiu 2005; Evelyne Bachère, Chagot, et Grizel 1988). Cependant, nous avons apporté des précisions supplémentaires dans la caractérisation des sous-types d'hémocytes granuleux ainsi que des hémocytes de type blastes. En effet, aucune publication antérieure n'a mentionné l'existence de cellules similaires aux *macrophage-like* (ML), de cellules à gros granules (BGC), ou de deux sous-types distincts de blastes (basophiles (BBL) et acidophiles (ABL)). Les divergences observées entre nos résultats et ceux des études précédentes pourraient s'expliquer par les colorations cytologiques utilisées ainsi que par la méthode de séparation des hémocytes sur gradient de Percoll. Notamment, la cytométrie en flux, employée par d'autres auteurs pour trier les hémocytes, tend à regrouper les hémocytes granuleux (SGC, ML, BGC, et VC) dans un seul groupe, souvent appelé granulocytes, et permet d'obtenir deux autres fractions, enrichies soit en blastes, soit en

hyalinocytes (W. Wang et al. 2017b). Nous proposons ici une méthode normée (déjà utilisée pour le marquage des cellules sanguines humaines) facile à mettre en œuvre qui permet un suivi cytologique rapide des populations hématocytaires. De plus, l'utilisation d'une méthode de séparation des hématocytes sur gradient de Percoll permet de séparer et d'enrichir certaines populations hématocytaires facilitant les études fonctionnelles. Après avoir ré-annoté le génome de *C. gigas* et grâce au séquençage d'ARNm sur cellules uniques (scRNA-Seq), une méthode jusqu'alors inédite pour la caractérisation des hématocytes de *Crassostrea gigas*, nous avons identifié sept clusters transcriptomiques distincts, ainsi que les marqueurs moléculaires et les fonctions biologiques associées à ces clusters. Une approche de scRNA-Seq visant à caractériser les hématocytes de *C. hongkongensis* a pu être réalisée avant la nôtre (Meng, Zhang, et Wang 2022). Malgré la proximité phylogénétique entre *C. gigas* et *C. hongkongensis*, nous observons des différences majeures dans le nombre de clusters identifiés (sept chez *C. gigas* contre douze chez *C. hongkongensis*) (Meng, Zhang, et Wang 2022). Ces différences s'expliquent principalement par la résolution appliquée lors du clustering des cellules séquencées. En effet, la résolution influence le seuil à partir duquel un cluster d'hématocytes est considéré comme unique ou subdivisé en plusieurs sous-clusters. Cependant, le choix de la résolution doit être en accord avec la réalité biologique des cellules séquencées (Kiselev, Andrews, et Hemberg 2019). Ainsi, le choix d'identifier sept clusters a été fondé sur la diversité morphologique révélée par la cytologie, qui est absente de l'analyse transcriptomique réalisée chez *C. hongkongensis* (Meng, Zhang, et Wang 2022). La similitude entre le nombre de clusters transcriptomiques et le nombre de types d'hématocytes identifiés par cytologie est toutefois inhabituelle, car la plupart des analyses de scRNA-Seq révèlent généralement un nombre de clusters supérieur à celui des cellules observées en cytologie (Meng, Zhang, et Wang 2022; Tattikota et al. 2020; Pichon et al. 2022). Nous nous sommes donc interrogés sur la correspondance entre les clusters définis par scRNA-Seq et la "réalité biologique" observée en cytologie. Ainsi, nous avons cherché à établir des liens entre les clusters et les types hématocytaires identifiés par cytologie (**Figure 34**). Ces liens ont pu être établis grâce à l'utilisation du fractionnement par gradient de densité de Percoll, combinée à l'expression des marqueurs transcriptomiques et à la réalisation de tests fonctionnels. Des analyses de corrélation entre les profils d'expressions des gènes marqueurs issus des analyses scRNA-Seq et la proportion des types hématocytaires dans les fractions correspondantes nous ont permis d'associer le cluster 2 aux hyalinocytes, le cluster 3 aux cellules à petits granules, et le cluster 7 aux cellules vésiculaires.

Grâce à des approches fonctionnelles, nous avons découvert que les ML et les SGC sont les seuls types cellulaires à se comporter comme des phagocytes professionnels. Selon l'analyse de trajectoire, ces deux types de phagocytes appartiennent à la même lignée de cellules granuleuses. Bien que le rôle des ML comme précurseurs des SGC puisse sembler contre-intuitif, cela n'est pas sans précédent chez les invertébrés, comme chez *Drosophila*, où certaines populations de phagocytes donnent naissance à des cellules morphologiquement et fonctionnellement distinctes. (Banerjee et al. 2019). Nous avons découvert que les ML possèdent la capacité de réaliser un burst oxydatif. De manière surprenante, les SGC, habituellement décrites comme des granulocytes, ne sont pas capables de produire ce burst oxydatif, contrairement à ce qui est généralement rapporté dans la littérature. (K. Takahashi et MORI 2000). Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons cherché à définir plus précisément le mécanisme de burst oxydatif et avons constaté qu'il dépend de la NADPH-oxydase, une enzyme uniquement exprimée dans le cluster 1 selon notre analyse RBGOA. Cette approche nous a permis d'associer ce cluster 1 aux cellules de type macrophage. Une des caractéristiques principales des BGC est leur teinte brune naturelle, visible sans coloration MCDh (Zarogian et Yevich 1993), rappelant la mélanine, produite lors de la transformation de la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) sous l'action de la tyrosinase ou de la laccase (Y.-J. Kim et Uyama 2005). L'expression de la laccase 24 dans nos données de scRNA-Seq pourrait être associée à ces cellules. Cette laccase est exprimée dans un sous-cluster des ML et est liée à une trajectoire de différenciation alternative au sein de ce sous-cluster. Ces observations nous ont conduits à associer les BGC au cluster 1. Il est toutefois essentiel de confirmer la présence de mélanine dans ces cellules ainsi que son rôle dans les défenses immunitaires de *Crassostrea gigas*, et de déterminer l'implication de la laccase dans sa formation pour valider cette hypothèse. La mélanisation, qui joue un rôle clé chez les insectes dans la lutte contre les infections parasitaires (Dubovskiy et al. 2016), consiste en l'encapsulation de particules trop larges pour être phagocytées, suivie de leur élimination par la libération d'hémolécitine et d'ions calcium activant la cascade phénol/prophénoloxydase, contribuant à la formation de mélanine et de ROS, qui participent à l'élimination de nématodes, trématodes ou cestodes (Soudant, E. Chu, et Volety 2013; Nguyen et Alfaro 2020). Chez les bivalves, ce mécanisme a été reporté chez la palourde *Tapes Decussatus* suite à une infection par le parasite *Perkinsus marinus* (Jf, M, et J 1996). L'encapsulation et la mélanisation pourraient, si elles sont caractérisées chez *C. gigas*, nous aider à mieux comprendre sa résistance aux infections parasitaires touchant d'autres espèces d'huîtres. Quant aux VC, elles semblent présenter une forte activité de trafic vésiculaire et d'autophagie, mais leur rôle immunitaire reste encore

indéterminé. Elles pourraient néanmoins représenter des précurseurs immatures d'autres types de cellules granuleuses (ML, BGC et SGC).

Nous avons identifié trois clusters que nous associons à deux morphotypes de cellules blastes. L'enrichissement en transcrits liés à la synthèse et à la dégradation de l'ARN est en accord avec la définition des cellules blastes comme étant non différenciées et plutôt correspondant à des pro-hémocytes, mais l'expression de gènes de la famille des *Big Defensins* (peptides antimicrobiens) dans ces cellules suggère qu'elles pourraient être immunocompétentes et exprimer des fonctions spécifiques. Cette découverte est inédite, puisque les cellules de type blastes ne sont généralement pas décrites comme immunocompétente chez les bivalves (de la Ballina et al. 2022) à l'exception des blastes décrits chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*, présentant une activité lysosomale, bien que très faible par rapport aux hyalinocytes et granulocytes décrits (Evariste et al. 2016). Malgré la similitude entre le nombre de clusters et les types cytologiques, nous avons observé trois clusters (n°4, n°5 et n°6) correspondant à deux types de blastes (BBL et ABL) et un cluster (n°1) regroupant deux types d'hémocytes granuleux (ML et BGC). L'utilisation du gradient de Percoll permet uniquement de trier les cellules en fonction de leur densité. Ainsi, il serait nécessaire de combiner le gradient de Percoll avec des approches reposant sur d'autres critères morphologiques, tels que la granulométrie et la taille des hémocytes (cytométrie en flux) nous permettant d'affiner davantage la séparation des différents types d'hémocytes et d'associer chaque cluster à un type cytologique spécifique (Robinson 2022). Nous avons montrés que les hémocytes possèdent une autofluorescence naturelle, particulièrement marquées pour les VC. Cette autofluorescence peut être un paramètre supplémentaire permettant de distinguer les types hémocytaires, notamment par des méthodologies de cytométrie à déconvolution spectrale, se basant sur l'autofluorescence des cellules, en plus de leur taille et granulométrie, pour séparer les cellules (McCausland et al. 2021). Le développement de marqueurs moléculaires spécifiques aux clusters identifiés par scRNA-Seq pourrait permettre de créer des anticorps ciblant spécifiquement ces marqueurs, utilisables en FACS pour trier les cellules appartenant à différents clusters. Cela offrirait ensuite la possibilité de les caractériser en cytologie (Loken et Herzenberg 1975). L'utilisation de ces marqueurs en hybridation *in situ*, par le biais de techniques telles que le RNA FISH ou RNAscope, pourrait également permettre d'associer directement les types morphologiques aux clusters transcriptomiques (Higo, Ishii, et Ozawa 2023). Cependant, la composition des colorants MCDh ne permet pas à cette technique cytologique d'être compatible avec l'hybridation *in situ*. De plus, ces colorants peuvent manquer de précision pour distinguer certains sous-types d'hémocytes. Cela est particulièrement vrai pour les cellules présentant des

traits morphologiques similaires, mais étant fonctionnellement et transcriptionnellement distinctes, comme les cellules ganglionnaires rétinienne, qui partagent des morphologies comparables mais peuvent être subdivisées en 45 clusters distincts (W. Huang et al. 2022). De plus, l'utilisation exclusive du marquage MCDh pour distinguer les types d'hémocytes repose uniquement sur le pH des compartiments cellulaires (RAL Diagnostics), et non sur leur composition moléculaire (comme le collagène, le glycogène, les glycoprotéines, les mucines et les lipides) ou leur contenu en ARN. Ainsi, bien que deux types de cellules blastes soient décrits, nous avons identifié trois clusters transcriptomiques distincts. L'utilisation d'autres méthodes de coloration, telles que le trichrome de Masson, le PAS (Periodic Acid-Schiff) ferricyanure ou encore le vert de méthyl-pyronine, pourrait être envisagée pour affiner la caractérisation des hémocytes, en particulier des blastes. Puisque les technologies de scRNA-Seq nous permettent de prédire les compartiments cellulaires associés aux hémocytes séquencés, nous pourrions combiner ces analyses avec l'observation de la morphologie ultra-structurale des hémocytes par microscopie électronique à transmission (MET), ce qui permettrait d'affiner l'association entre les clusters transcriptomiques et les types hémocytaires avec une plus grande précision.

Il convient également de noter que la technique de scRNA-Seq, bien qu'efficace pour révéler l'hétérogénéité transcriptomique des cellules qui compose un tissu, offre une profondeur de séquençage limitée (Zheng et al. 2017). Ainsi, les marqueurs transcriptomiques distinguant deux types cytologiques pourraient ne pas refléter les ARNm majoritairement exprimés dans les clusters, en particulier pour les récepteurs de surface qui peuvent avoir des rôles fonctionnels majeurs mais dont les transcrits qui les codent ne sont que faiblement représentés, ce qui complique la distinction entre deux types d'hémocytes aux profils transcriptomiques similaires par scRNA-Seq, comme les ML et les BGC. L'utilisation de technologies de scRNA-Seq avec une profondeur de séquençage plus élevée, comme le Quartz-seq2, permettrait de contourner ce biais et de distinguer plus précisément des hémocytes morphologiquement distincts en se basant sur leur profils transcriptomiques (Sasagawa et al. 2018). Ce phénomène est d'autant plus accentué chez les huîtres, connues pour leur niveau élevé de polymorphisme inter-individuel dans l'expression génique (Rosa et al. 2015). Ainsi, réaliser des analyses de scRNA-Seq sur plusieurs individus d'origines différentes (provenant de familles distinctes, standardisées ou non, élevées en milieu naturel ou non) pourrait mettre en évidence des marqueurs moléculaires communs entre individus, facilitant ainsi leur association avec les types hémocytaires identifiés par cytologie. De plus, au cours de la différenciation, certains types cellulaires peuvent se trouver dans un état de transition entre deux états fonctionnels ou morphologiques, ce qui peut entraîner une

discordance entre les analyses cytologiques, qui capturent la morphologie à un moment donné, et les profils transcriptomiques, qui peuvent refléter des états intermédiaires partagés au sein d'un même cluster. C'est, par exemple, le cas des cellules de Kupffer et des macrophages de la pulpe rouge, dont la morphologie diffère tout en partageant un profil transcriptomique similaire (Davies et al. 2013). La réalisation d'analyses de sous-clusters, en variant la résolution appliquée lors de l'analyse, pourrait permettre de mieux révéler l'hétérogénéité transcriptomique au sein des hémocytes appartenant à un même cluster.

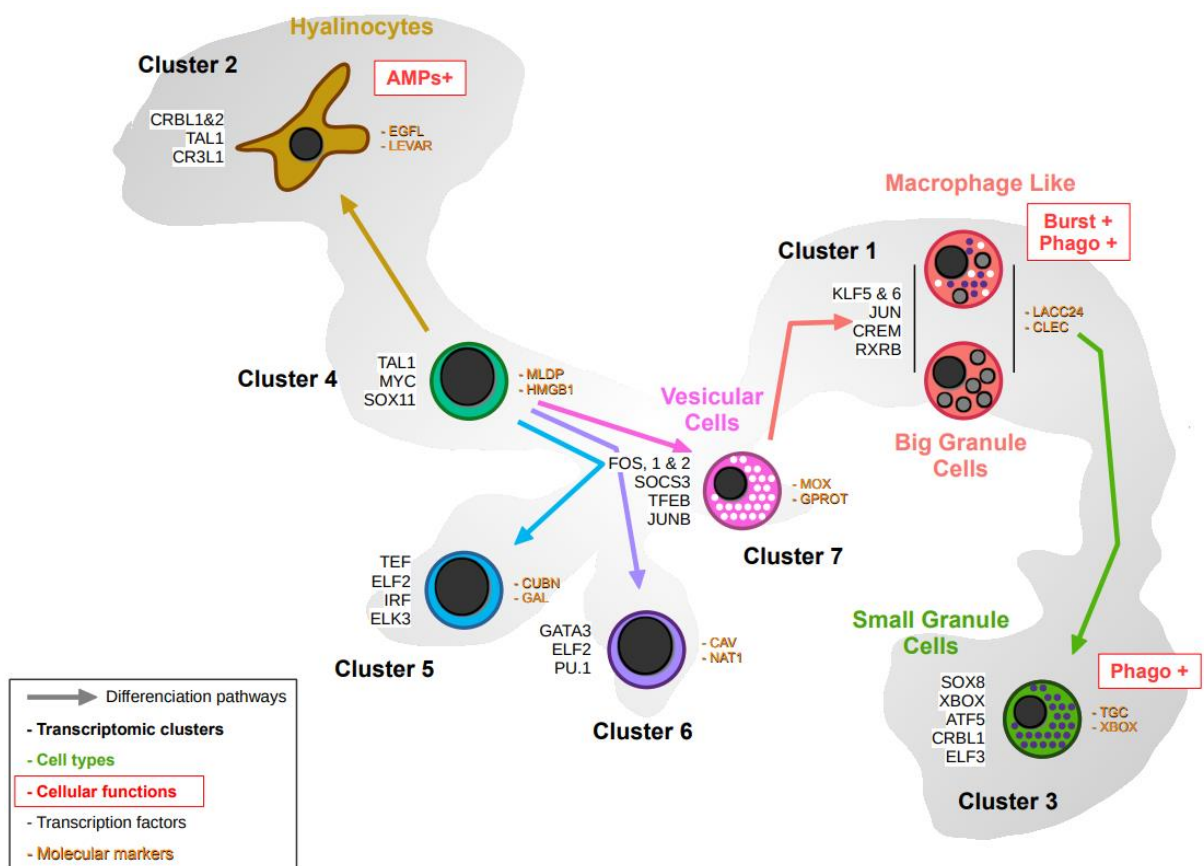


Figure 34 : Ontologie proposée chez *C. gigas* d'après l'analyse de scRNA-Seq, de cytologie, et l'analyse fonctionnelle. L'association des clusters et types cytologiques est représentée : Le cluster 1 est associé aux ML et aux BGC, le cluster 2 aux H, le cluster 3 aux SGC, les clusters 4, 5 et 6 aux BBL et ABL, et le cluster 7 aux VC. Sont aussi représentées les voies de différenciation prédites entre clusters, les marqueurs moléculaires et les facteurs de transcription spécifiques de chaque cluster.

L'utilisation des données de scRNA-Seq nous a permis de proposer une ontologie hémocytaire chez *C. gigas*

Grâce à l'analyse des trajectoires des données de scRNA-Seq, nous proposons désormais un modèle affiné des voies de différenciation des hémocytes circulants chez *Crassostrea gigas*. Cette analyse nous a permis d'identifier les profils d'expression des facteurs de transcription

spécifiques à chaque cluster, dont certains sont bien connus pour leur rôle dans l'hématopoïèse, tels que GATA, PU-1, TAL1 et les facteurs SOX (de Bruijn et Dzierzak 2017; Scott et al. 1994; Bergiers et al. 2018). Il reste cependant nécessaire de valider l'association de ces facteurs de transcription aux types morphologiques décrits, notamment par des approches de qPCR.

L'existence de cellules souches hématopoïétiques dans l'hémolymphe a longtemps été suggérée, notamment dans les études visant à caractériser les hémocytes chez les bivalves. Chez *Crassostrea gigas*, les blastes sont généralement considérés comme les précurseurs des autres types d'hémocytes (de la Ballina et al. 2022). Bien qu'ils puissent posséder une certaine immunocompétence, notamment par l'expression de peptides antimicrobiens, l'association de ces clusters avec des cellules de type « blast-like » et leur classification en tant que précurseurs reste cohérente. En particulier, le cluster quatre surexprime principalement des gènes codant pour des ARN ribosomiaux, un marqueur typique des cellules souches hématopoïétiques chez les vertébrés (Jarzebowski et al. 2018). Il est cependant nécessaire de valider que ces cellules de type blastes sont capables de se différencier en d'autres types d'hémocytes. Des travaux *in vitro* ont été réalisés pour décrire la différenciation des hémocytes du bivalve *Ruditapes philippinarum* après un challenge bactérien, révélant une diminution de la proportion de blastes et une augmentation des cellules séreuses (Cima et Matozzo 2018). Nous pourrions envisager d'isoler les blastes par séparation des hémocytes sur gradient de Percoll, puis de les exposer à différents challenges bactériens. Un changement dans la composition de ces hémocytes, notamment une diminution de la proportion de blastes accompagnée d'une augmentation d'autres types d'hémocytes, combiné à une expression différentielle des facteurs de transcription identifiés par scRNA-Seq, indiquerait une différenciation des blastes. Nous avons ainsi identifié quatre principales voies de différenciation chez les hémocytes de *Crassostrea gigas*. La première voie relie le cluster quatre au cluster deux, correspondant aux H. Deux autres voies mènent respectivement du cluster quatre aux clusters cinq et six. Enfin, une quatrième voie conduit du cluster quatre aux clusters sept (VC), un (ML et BGC), et trois (SGC) (**Figure 34**). L'existence d'une voie de différenciation impliquée dans la formation d'hémocytes granuleux a d'ailleurs déjà été rapportée chez le moustique *Anopheles gambiae* (Kwon et al. 2021).

L'identification de sept types hémocytaires permet de clarifier leurs rôles lors de certaines pathologies ostréicoles

Comme détaillé dans l'introduction de cette thèse, *Crassostrea gigas* est affectée par des pathogènes ciblant principalement les hémocytes. Lors d'une infection par le virus OsHV-1, celui-ci infecte les hémocytes et entraîne une diminution de la production de peptides

antimicrobiens, provoquant une dérégulation du microbiote de *C. gigas*. Cela conduit à un enrichissement des communautés microbiennes composant le pathobionte (bactéries pathogènes opportunistes profitant de cette baisse de production de peptides antimicrobiens), entraînant finalement la mort de l'huître par septicémie. Nos résultats montrent que *Cg-BigDef* est exprimé par tous les hémocytes agranuleux (H, BBL et ABL), et que *Cg-BPI* et *Cg-Defh* sont principalement exprimés par les blastes, en particulier les BBL. Ces résultats amènent à repenser le rôle des cellules agranuleuses dans l'interaction de l'huître avec les agents pathogènes et remettent en question l'idée largement acceptée selon laquelle seuls les hémocytes granuleux expriment des peptides antimicrobiens chez *C. gigas* (W. Wang et al. 2017b). Elle suggère également que les H, jusqu'à présent principalement associés à l'agrégation et à la réparation tissulaire, ainsi que les blastes, souvent considérés comme des précurseurs (de la Ballina et al. 2022), sont également immunocompétents et jouent un rôle essentiel dans le maintien du microbiote ainsi que dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. Il est donc possible que ces cellules soient ciblées par le virus OsHV-1, qui est connu pour inhiber l'expression des peptides antimicrobiens (AMPs), provoquant ainsi une dysbiose bactérienne et conduisant à la mort de l'huître par septicémie (de Lorgeril et al. 2018b). Dans l'hypothèse où les blastes sont considérés comme des cellules précurseurs d'autres types d'hémocytes, notamment ceux de la lignée granuleuse, il est possible que l'infection par le virus OsHV-1 entraîne, via l'infection des blastes, une dérégulation de la différenciation hémocytaire, et donc une perturbation de la réponse secondaire des hémocytes granuleux face aux bactéries pathogènes opportunistes. Il serait donc pertinent de caractériser l'impact d'une infection par le virus OsHV-1 sur la diversité hémocytaire de *Crassostrea gigas* afin de valider ces hypothèses. Les bactéries pathogènes opportunistes associées à l'infection par le virus OsHV-1 ont été caractérisées, et certains membres de ce pathobionte ont été particulièrement étudiés pour leur cytotoxicité envers les hémocytes de *C. gigas*. Par exemple, *Vibrio tasmaniensis* LGP32, *Vibrio crassostreae* J2-9 et *Vibrio harveyi* induisent la lyse des hémocytes par des mécanismes variés (Rubio et al. 2019a; Oyanedel et al. 2023). En particulier, *Vibrio tasmaniensis* LGP32 provoque la mort des hémocytes de manière dépendante de la phagocytose (Rubio et al. 2019a), ce qui suggère que les ML et les SGC sont spécifiquement ciblés par cette bactérie. Cependant, une partie des SGC sont capables d'accumuler du cuivre dans leurs granules. Ces SGC, identifiées comme des phagocytes professionnels contenant des granules riches en cuivre, sont probablement essentielles à la résistance de l'huître contre de nombreuses bactéries. Toutefois, elles pourraient être ciblées par certaines bactéries, telles que *Vibrio tasmaniensis* ou *Vibrio aestuarianus*, qui sont résistantes à la toxicité du cuivre, perdant leur pathogénicité lorsque des

mutations affectent les gènes conférant cette résistance (Audrey S. Vanhove et al. 2016; Mesnil et al. 2023). De plus, lors de nos tests de phagocytose, nous avons observé une affinité accrue des SGC pour les bactéries du genre *Vibrio*, renforçant ainsi notre hypothèse. Pour confirmer l'infection et la cytotoxicité de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 envers les SGC, ou pour déterminer quels hémocytes sont ciblés par *Vibrio harveyi* et *Vibrio crassostreae* J2-9, des tests de cytotoxicité sur des hémocytes triés par gradient de Percoll pourraient être envisagés afin de valider nos hypothèses.

Le cuivre est un métal possédant des propriétés antimicrobiennes, via l'induction de la production de ROS, et la capacité de déstabiliser les membranes des micro-organismes (Dupont, Grass, et Rensing 2011). Une seule fraction des SGC est capable d'accumuler du cuivre, suggérant une spécialisation fonctionnelle encore inexplorée de ces cellules dans la défense antibactérienne. Chez l'humain, les macrophages et les neutrophiles possèdent différents mécanismes pour éliminer les pathogènes. En particulier, bien que ces deux types cellulaires soient capables de phagocytose, seuls les macrophages peuvent réaliser l'efferocytose (phagocytose des corps apoptotiques), tandis que les neutrophiles produisent des pièges extracellulaires d'ADN (NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*) (Rosowski 2020). Il est donc possible qu'une diversité mécanistique dans l'élimination des pathogènes soit également présente chez *Crassostrea gigas*, entre les ML et les SGC, deux types d'hémocytes capables de phagocytose. Les BGC, bien qu'incapables de phagocytose, concentrent également le cuivre, ce qui pourrait indiquer une utilisation non immunitaire du cuivre ou une diversité dans les mécanismes d'utilisation de ce métal dans l'immunité. Des travaux menés chez *Crassostrea hongkongensis* ont montré la capacité des hémocytes à transférer le cuivre par l'intermédiaire de nanotubes (Luo et al. 2024). Le rôle des BGC pourrait être de stocker le cuivre et de le transférer aux SGC afin d'optimiser leur réponse lors d'une infection. Il serait intéressant d'étudier si l'exposition de *Crassostrea gigas* à des concentrations élevées de cuivre favorise ou non la résistance de l'huître face aux pathogènes du genre *Vibrio*, en particulier *Vibrio aestuarianus*, en raison de la nature primaire de ce micro-organisme pathogène. Ces approches permettraient de déterminer si les mécanismes principalement impliqués dans l'élimination de cet agent pathogène dépendent ou non du cuivre.

L'homéostasie hémocytaire est modifiée lors de la réponse immunitaire à *V. aestuarianus*.

La caractérisation des hémocytes que nous avons réalisée dans la première partie de ma thèse a permis d'identifier sept types distincts d'hémocytes. L'utilisation de la méthode de comptage

par cytologie après coloration MCDh présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre (contrairement à des méthodes plus complexes comme la microscopie à fluorescence ou électronique), ce qui nous permet d'analyser un grand nombre d'individus et d'évaluer l'impact d'une infection sur la diversité quantitative des hémocytes de *Crassostrea gigas*. Parmi les infections touchant les cultures ostréicoles, *Vibrio aestuarianus* représente une menace particulièrement importante, entraînant de forts taux de mortalité, notamment durant les saisons chaudes (de Lorgeril et al. 2020). Bien que des recherches antérieures aient étudié la réponse des hémocytes à des concentrations élevées de *V. aestuarianus* (Lorgeril et al. 2011), la progression détaillée de la réponse immunitaire, depuis l'entrée initiale de la bactérie jusqu'à la mort de l'hôte, reste insuffisamment caractérisée. Ainsi, avec le développement de ces approches cytologiques nous avons cherché à caractériser l'impact d'une infection par *V. aestuarianus* sur la concentration, et l'expression génique des hémocytes de *C. gigas*. Plus particulièrement, nous nous sommes demandés à partir de quel stade de progression de la maladie, le système immunitaire de l'huître reconnaît, et déclenche une réponse visant à éliminer cet agent pathogène.

L'infection par *V. aestuarianus* entraîne une réponse hémocytaire de *C. gigas*

Nos résultats ont révélé des variations significatives dans les populations d'hémocytes circulants. En particulier, nous avons observé une augmentation globale de la concentration d'hémocytes après l'infection, par rapport aux niveaux de pré-infection, similaire à ce qui avait déjà été décrit après cinq jours d'infection en utilisant un protocole d'injection (Labreuche, Lambert, et al. 2006a). Cette augmentation de la concentration d'hémocytes semble spécifique au processus d'infection, car elle n'a pas été observée dans les conditions ne contrôles ni chez les animaux exposés mais non infectés. De nombreuses études rapportent des variations du nombre total d'hémocytes circulants, en particulier en réponse à des pathogènes parasitaires et bactériens (T. Zhang et al. 2014; Comesaña et al. 2012), suggérant que cette réponse cellulaire primaire est assez courante lors des infections chez *C. gigas*.

Au-delà de la concentration totale, nous avons pu démontrer que les concentrations en ML, ABL, BBL, VC, ainsi qu'en SGC et BGC augmentaient de manière significative pendant l'infection, par rapport aux niveaux de pré-infection.

En revanche, la concentration en H est restée inchangée tout au long de l'infection. Contrairement aux phagocytes, qui sont principalement des hémocytes granuleux (W. Wang et al. 2017b), nous avons montré que les H jouent un rôle plus important dans la production de

peptides antimicrobiens (AMPs). L'absence d'une augmentation significative de la concentration en hyalinocytes pourrait indiquer qu'aux stades avancés de l'infection, les huîtres privilégient une réponse cellulaire plutôt qu'une réponse dépendante des AMPs pour combattre *Vibrio aestuarianus*. Il est également possible que *V. aestuarianus* tue activement les H, un mécanisme de virulence fréquemment observé chez les *Vibrio* pathogènes d'huîtres (Rubio et al. 2019a; Oyanedel et al. 2023). Pour confirmer ces hypothèses, il serait envisageable de quantifier la production de peptides antimicrobiens tout au long de l'infection par qPCR ou via des approches protéomiques. Ces techniques permettraient de corrélérer le niveau de production d'AMPs à la concentration en H afin de valider ou non notre hypothèse. De plus, des tests de cytotoxicité avec *Vibrio aestuarianus*, similaires à ceux réalisés pour *Vibrio tasmaniensis* LGP32, *Vibrio crassostreae* J2-9, et *Vibrio harveyi*, (Rubio et al. 2019a; Oyanedel et al. 2023), pourraient être mis en place sur des hémocytes triés sur gradient de Percoll, afin de savoir si *V. aestuarianus* induit activement la lyse des H.

L'augmentation la plus marquée de la concentration en hémocytes a été observée à des charges bactériennes élevées, atteignant des niveaux septicémiques ($\sim 10^8$ bactéries/mL). Cette augmentation était significative pour les ABL, BBL, les ML, et les VC.

Les hémocytes granuleux jouent un rôle central dans l'immunité des huîtres (W. Wang et al. 2017b), étant impliqués dans la phagocytose ainsi que dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), qui sont essentielles pour l'élimination des pathogènes (de la Ballina et al. 2022). De plus, ces cellules appartiennent à la même voie de différenciation des hémocytes granuleux que nous avons mise en évidence, partant des ABL et BBL pour se différencier en VC puis en ML. Elles pourraient ainsi représenter une réponse hématopoïétique tardive lors du stade septicémique de la maladie. Pour valider cette hypothèse, il serait pertinent de quantifier le niveau d'expression des facteurs de transcription identifiés à différents stades de développement de la maladie. Chez les animaux sains, l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* est principalement composée de superoxyde dismutase extracellulaire (Cg-EcSOD), qui joue un rôle crucial dans l'opsonisation des agents pathogènes en se liant à leur LPS (Marcelo Gonzalez et al. 2005). Ainsi, la première réponse de *Crassostrea gigas* face à une infection par *Vibrio aestuarianus* pourrait être seulement humorale, la réponse cellulaire n'intervenant que plus tardivement, lorsque la réponse humorale seule ne suffit pas à éliminer les pathogènes.

Nous avons caractérisé la réponse transcriptomique à *V. aestuarianus* dans des conditions réalistes d'infection

L'analyse transcriptomique confirme nos observations cytologiques, révélant des changements significatifs uniquement chez les huîtres septicémiques, dont la charge bactérienne est supérieure à 10^7 bactéries / mL (Geslin et al. 2024)). Nous avons montré que les SGCs sont capables de phagocytose et dérivent de la différenciation des MLs dans notre modèle d'hématopoïèse hémocytaire. L'absence d'une augmentation significative de la concentration en SGCs pourrait s'expliquer par la réduction de l'expression des gènes liés au cycle cellulaire et à la différenciation chez les huîtres infectées au stade septicémique. Cela pourrait refléter un changement des fonctions cellulaires, privilégiant une réponse à l'infection plutôt que la différenciation des MLs en SGCs. Bien que nous ayons observé une augmentation significative des BGCs aux premiers stades de l'infection, aucun changement transcriptomique significatif n'a été détecté à ces stades. Étant donné que les BGCs ne représentent qu'un faible pourcentage (~2 %) de la population totale d'hémocytes chez les huîtres saines, ce manque de signal pourrait être dû à un bruit de fond masquant de potentielles différences transcriptomiques. Un nombre limité de gènes liés à l'immunité ont été régulés positivement au stade septicémique de l'infection (IL-17-like, MyD88, TNFR), ce qui suggère l'activation de la voie de signalisation Toll/NF- κ B, connue pour être impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires et les réponses de type interféron (Kawai et Akira 2007). Cependant, la voie des TLR est commune à de nombreuses cellules immunitaires chez d'autres animaux (Kawai et Akira 2007) et nous ne pouvons donc pas associer cette réponse à un type hémocytaire spécifique.

Une des limitations de l'utilisation du RNA-Seq réside dans l'incapacité d'associer chaque transcrite à son type cellulaire d'origine. Ainsi, avec le développement de pipelines d'analyse de données scRNA-Seq chez *Crassostrea gigas*, il serait possible d'examiner l'impact d'une infection par *Vibrio aestuarianus* sur chaque type d'hémocyte. L'utilisation du scRNA-Seq pour étudier l'impact d'un stress sur un hôte a déjà été mise en œuvre chez de nombreux animaux, comme chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) pour analyser la réponse des cellules embryonnaires à une infection par *Escherichia coli* (Rawson et al. 2022), et permet également de prédire l'impact d'une infection par *Salmonella enterica* chez l'humain (Bossel Ben-Moshe et al. 2019). Chez l'huître *Crassostrea hongkongensis*, une approche par scRNA-Seq a été utilisée pour étudier l'effet d'une exposition au cuivre sur les populations hémocytaires (Meng et Wang 2022), révélant les types d'hémocytes impliqués dans la gestion de ce métal.

En plus de valider les marqueurs moléculaires identifiés dans la première partie de ma thèse en tant que marqueurs « universels » (dont l'expression ne varie pas en cas d'infection), cette approche pourrait nous permettre d'identifier quels hémocytes engagent une réponse immunitaire face à *Vibrio aestuarianus*. Cela nous offrirait une plus grande précision pour étudier le rôle de chaque type d'hémocyte dans la réponse anti-*V. aestuarianus*, pour valider l'absence de différenciation des MLs en SGCs, en raison de l'absence d'une augmentation significative de la concentration en SGCs aux stades tardifs de l'infection, et pour examiner plus en détail le rôle des BGCs dans la réponse précoce à l'infection.

***Vibrio aestuarianus* empêche l'induction d'une réponse immunitaire**

Nous ne savons pas actuellement comment *Vibrio aestuarianus* échappe à la réponse immunitaire de l'hôte, car la plupart des études se concentrent sur les stades avancés de l'infection en utilisant des injections à forte charge bactérienne (Labreuche et al. 2010; Lorgeril et al. 2011). La virulence de *V. aestuarianus* est en grande partie due à plusieurs facteurs critiques, notamment la production et la sécrétion extracellulaire de la métalloprotéase Vam (Labreuche et al. 2010; Labreuche, Soudant, et al. 2006). Il a également été démontré que l'expression de cette métalloprotéase est régulée par des mécanismes de *quorum sensing* (De Decker, Reynaud, et Saulnier 2013). En effet, l'expression de la métalloprotéase Vam dépend du facteur de transcription VarS (Goudenège et al. 2015). Chez *Vibrio cholerae*, ce facteur de transcription fait partie du système à deux composants VarA/VarS, associé à des mécanismes de *quorum sensing* régulant l'expression des facteurs de virulence (Jang et al. 2011). Étant donné que nos principales réponses transcriptomiques et cytologiques ont été observées uniquement à des concentrations bactériennes élevées, il est possible que *V. aestuarianus* utilise le *quorum sensing* pour réguler l'expression de Vam, ainsi que d'autres facteurs de virulence, déclenchant une réponse immunitaire robuste uniquement à des stades avancés de l'infection. Il est donc crucial d'étudier comment *V. aestuarianus* module l'expression de ses gènes à différents stades de l'infection, afin de valider l'expression des gènes dépendant du *quorum sensing* ou d'identifier des gènes permettant à ce pathogène d'échapper à la détection aux stades précoces. Des mécanismes d'échappement similaires ont déjà été rapportés chez *Crassostrea virginica* lors d'une infection par *Perkinsus marinus* (Romestand, Corbier, et Roch 2002), où ce parasite exprime des protéases empêchant la fixation des opsonines de l'hôte, bloquant ainsi sa phagocytose par les hémocytes. Étudier la structure des protéines de surface de *V. aestuarianus* ou l'expression de ses gènes lors de l'infection pourrait nous permettre de nous renseigner sur

l'existence potentielle de protéases ou de motifs spécifiques empêchant la liaison des opsonines à *V. aestuarianus*.

Vibrio aestuarianus est connu pour infecter plusieurs tissus chez l'huître, notamment les branchies, le manteau, le muscle adducteur, les palpes labiaux et les glandes digestives (Parizadeh et al. 2018). Il est donc possible que *Vibrio aestuarianus* passe inaperçu dans ces organes, échappant ainsi à la reconnaissance par les hémocytes circulant dans l'hémolymphe. Par conséquent, se concentrer uniquement sur l'hémolymphe pourrait ne pas offrir une compréhension complète de l'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes, car ces derniers pourraient migrer des tissus infectés vers l'hémolymphe, ou inversement (Allam et Pales Espinosa 2016). Ainsi, des étapes cruciales de la pathologie pourraient se dérouler dans d'autres organes, que nous n'aurions pas pu identifier dans nos travaux. Pour étudier cela, nous pourrions réaliser des marquages en hybridation *in situ* afin de mettre en évidence la possible colocalisation des hémocytes et de *Vibrio aestuarianus* dans d'autres tissus de l'huître, au-delà de l'hémolymphe. L'étude du dialogue entre les hémocytes et *V. aestuarianus* dans ces tissus pourrait être réalisée en utilisant la technologie de scRNA-Seq spatiale, permettant d'analyser le transcriptome des hémocytes infiltrants ainsi que des cellules des tissus conjonctifs de l'huître, afin de déterminer leur rôle dans la défense antibactérienne et dans le développement de l'infection à *V. aestuarianus*. Ces approches transcriptomiques spatiales ont été développées chez l'homme pour étudier l'adénocarcinome pancréatique, permettant d'analyser l'hétérogénéité transcriptomique et spatiale des cellules composant ces tissus (Moncada et al. 2020). Ces analyses seraient d'une grande importance, d'autant plus que les branchies, les premiers organes connus pour être infectés par *Vibrio aestuarianus* (Parizadeh et al. 2018), sont potentiellement également suspectées d'héberger l'organe hématopoïétique chez *Crassostrea gigas* (Jemaà et al. 2014). En effet, aux stades précoces de l'infection, *Vibrio aestuarianus* pourrait cibler le site hématopoïétique de *Crassostrea gigas* afin de perturber la génération de nouveaux hémocytes, et ainsi la réponse engagée par ces cellules, facilitant ainsi sa multiplication et sa dissémination dans l'organisme. Ces hypothèses pourraient être validées par des techniques histologiques utilisant des marqueurs spécifiques des types hémocytaires et des marqueurs de *V. aestuarianus*, ou encore des facteurs de virulence connus chez cette bactérie. Il est aussi possible que l'infection de *C. gigas* par *V. aestuarianus* puisse faire intervenir d'autres communautés microbiennes, comme c'est le cas pour d'autres infections comme pour le virus OsHV-1 μ Var (de Lorgeril et al. 2018b). En particulier, le microbiote façonne de nombreux aspects physiologiques chez l'huître comme la croissance ou la nutrition, mais aussi la résistance aux micro-organismes pathogènes (Dantan et al. 2024). Aujourd'hui, les

technologies de scRNA-Seq ne se limitent plus aux organismes eucaryotes, mais s'étendent à l'analyse du transcriptome de communautés microbiennes complexes (Ma et al. 2023). Ainsi, utiliser ces approches pour étudier *Vibrio aestuarianus* à différents stades de l'infection permettrait de mieux comprendre son interaction avec *Crassostrea gigas* ainsi qu'avec les bactéries composant le microbiote de l'huître.

Les voies de l'autophagie sont activées en réponse à une infection par *Vibrio aestuarianus*

Nos analyses de *Gene Ontology* et des voies KEGG ont révélé une régulation positive des gènes impliqués dans le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique et dans l'autophagie. Nous avons également observé des modifications distinctes dans la physiologie des hémocytes aux stades avancés de l'infection. Ces changements morphologiques pourraient être liés à l'autophagie, car ces cellules présentent des caractéristiques similaires à celles de cellules autophagiques (Picot et al. 2020). Cependant, une confirmation par microscopie électronique est nécessaire pour vérifier la présence de la double membrane caractéristique de l'autophagie (Picot et al. 2020). L'autophagie semble jouer un double rôle dans les hémocytes de *Crassostrea gigas*. D'une part, elle agit comme une réponse au stress cellulaire, en régulant le renouvellement des protéines et en atténuant les dommages causés par les toxines bactériennes (Deretic et Levine 2009). D'autre part, l'autophagie peut contribuer directement à l'élimination des micro-organismes pathogènes intracellulaires, ou ayant échappé à la vacuole phagocytaire, via la xénophagie, un mécanisme qui sous-entend la formation d'une nouvelle membrane (le phagophore) autour du micro-organisme pathogène, et sa fusion avec des lysosomes (Bauckman, Owusu-Boaitey, et Mysorekar 2015; Moreau et al. 2015). Les gènes clés liés à l'autophagie, tels qu'ATG8 et LC3, qui sont conservés chez *Crassostrea gigas* (Picot et al. 2020), jouent un rôle essentiel dans l'élimination des bactéries. En effet, il a été démontré que l'accumulation de LC3-II chez *C. gigas* suggère que l'autophagie est induite lors de l'infection par *Vibrio aestuarianus* (Moreau et al. 2015). Des processus similaires déclenchés par l'autophagie ont été observés chez d'autres pathogènes des huîtres, comme le virus OsHV-1, où l'inhibition de l'autophagie a entraîné une augmentation de la mortalité des huîtres (Moreau et al. 2015). Nos données renforcent l'idée que l'autophagie pourrait jouer un rôle dans la gestion du stress des hémocytes lors de l'infection par *Vibrio aestuarianus*, comme cela a déjà été démontré lors d'une infection par le virus OsHV-1 μ Var, et comme cela a été suspecté dans le cas de *V. aestuarianus* (Moreau et al. 2015). Cependant, il reste à déterminer si l'autophagie est activement impliquée dans l'élimination des pathogènes via la xénophagie, ou

si elle sert simplement à maintenir l'intégrité cellulaire pendant l'infection. Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle spécifique de l'autophagie dans l'infection par *Vibrio aestuarianus*. Il serait notamment intéressant de quantifier le niveau d'expression de LC3 aux différents stades de l'infection, potentiellement par scRNA-Seq, et de valider, en parallèle, les types d'hémocytes impliqués dans ce processus d'autophagie, via la microscopie électronique à transmission (MET).

PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma thèse nous ont permis de développer divers outils cyto- logiques, transcriptomiques et fonctionnels, qui peuvent être adaptés à différents contextes phy- siologiques chez l'huître. En particulier, nous avons mis en évidence, grâce à ces outils cyto- logiques, l'impact de la charge bactérienne dans l'hémolymphe lors d'une infection par *Vibrio aestuarianus* sur l'abondance des différents types d'hémocytes et sur l'expression de leurs gènes, via des approches transcriptomiques en RNA-Seq. L'objectif de cette partie du manuscrit sera de proposer de futurs axes de recherche que les travaux réalisés pendant ma thèse pourraient permettre d'explorer.

Utiliser le scRNA-Seq pour caractériser le site hématopoïétique chez *C. gigas*

L'origine de l'hématopoïèse n'a pas encore été identifiée chez *Crassostrea gigas*. Les blastes ont longtemps été considérés comme des cellules précurseurs capables de se différencier en d'autres types d'hémocytes (de la Ballina et al. 2022). Dans notre analyse de scRNA-Seq, nous avons identifié un cluster de cellules en division que nous avons associé aux blastes, renforçant ainsi les hypothèses formulées dans des travaux précédents quant à leur rôle en tant que cellules précurseurs d'autres types d'hémocytes. D'autres études ont montré la présence de cellules en division dans les branchies de *C. gigas*, connectées aux vaisseaux hémolymphatiques, suggé- rant que les branchies pourraient être les organes hématopoïétiques chez cette espèce (Jemaà et al. 2014). Il est donc possible que les branchies produisent des hémocytes progéniteurs imma- tures capables de se multiplier et de se différencier en hémocytes matures. La validation du statut des blastes en tant que cellules en division pourrait être réalisée par tri des hémocytes via FACS après marquage au BrdU (un marqueur des cellules en division). La caractérisation des cellules triées pourrait ensuite être réalisée par coloration MCDh. Il serait aussi envisageable

de marquer des hémocytes triés sur gradient de Percoll au ClickIT EdU, un autre marqueur des cellules en divisions, en microscopie à fluorescence.

La confirmation que ces cellules sont celles identifiées dans le cluster de cellules en division pourrait être validé par RNA-Seq, en comparant leur profil transcriptomique avec celui du cluster identifié en scRNA-Seq. Ces résultats pourraient également être comparés à des analyses réalisées sur les branchies. Grâce aux avancées des méthodes de scRNA-Seq, il serait possible d'explorer la diversité transcriptomique des cellules de cet organe afin de confirmer la présence de cellules souches hématopoïétiques, potentiellement dotées d'un profil transcriptomique similaire à celui des blastes. Bien que la transfection des hémocytes de *C. gigas* reste un obstacle méthodologique majeur, l'identification précise, l'isolement et la mise en culture primaire des hémocytes progéniteurs chez *C. gigas* constitueraient une première étape indispensable pour valider les voies de différenciation que nous avons mises en évidence dans nos travaux de scRNA-Seq.

Utilisation de l'atlas cytologique et des méthodes transcriptomiques pour étudier les pathologies ostréicoles.

Au cours de cette thèse, nous avons développé des outils cytologiques et transcriptomiques pour étudier les hémocytes. En particulier, nous avons démontré que ces outils peuvent être utilisés pour étudier l'impact d'une infection par *Vibrio aestuarianus*. Ces travaux ouvrent la voie à de nouvelles études cytologiques, à l'aide de colorations MCDh, et transcriptomiques, via des approches de RNA-Seq ou de scRNA-Seq, sur des huîtres infectées par d'autres pathogènes. En particulier, le virus OsHV-1 représente un pathogène majeur affectant les huîtres en ostréiculture (de Lorgeril et al. 2018b). Il serait donc pertinent d'étudier l'impact de cette pathologie à travers des approches cytologiques ou de scRNA-Seq afin de caractériser la cinétique des changements de la composition hémocytaire et d'identifier les types d'hémocytes ciblés par ce pathogène. Ces approches permettraient également de mettre en évidence les marqueurs moléculaires spécifiques de l'infection par ce virus. OsHV-1 est principalement connu pour infecter les huîtres juvéniles. Il serait donc intéressant d'étudier les différents types d'hémocytes et les processus immunitaires des huîtres à ce stade de développement ainsi que la dynamique de mise en place du système immunitaire chez les larves et les huîtres juvéniles, encore peu décrits (Bassim et al. 2015). Des analyses comparatives avec des huîtres adultes pourraient révéler les éléments qui favorisent l'infection des huîtres juvéniles par le virus.

La santé des huîtres juvéniles comme adultes dépend des défenses immunitaires mais aussi des communautés microbiennes associées à l'hôte. En particulier, le microbiote joue un rôle majeur dans l'interaction de l'huître avec les pathogènes ostréicoles (Destoumieux-Garzón et al. 2024). Bien que la composition de ces communautés microbiennes ait été étudiée dans le cadre d'infections, le dialogue entre le microbiote et le système immunitaire de *Crassostrea gigas* à l'âge adulte reste peu connu, notamment en ce qui concerne le rôle du microbiote dans le façonnement du système immunitaire à ce stade de développement (Destoumieux-Garzón et al. 2024). Étudier ces interactions, tant à l'état naïf que dans le contexte d'infections, est crucial pour obtenir une vision globale des mécanismes d'interaction de *C. gigas* avec les pathologies ostréicoles. Avec le développement de pipelines d'analyses bio-informatiques de données de scRNA-Seq, ces études pourraient être menées par ces approches en analysant de manière croisées le transcriptome des hémocytes et des bactéries constituant le microbiote hémolympatique de ces mêmes animaux. Cela permettrait d'explorer les dialogues moléculaires entre les hémocytes et le microbiote hémolympatique de l'huître, et notamment le rôle de ces dialogues lors d'une infection par *Vibrio aestuarianus*, dont les processus pathologiques restent encore peu compris.

Dans le cas où *C. gigas* est capable de survivre à certaines infections (Lorgeril et al. 2011), il serait intéressant de voir comment le dialogue hémocytes – microbiote hémolympatique évolue après une interaction et une élimination de ces différents pathogènes. De plus, de nombreuses recherches ont récemment mis en évidence un phénomène de *priming* immunitaire chez les huîtres après un contact avec une version atténuée du virus OsHV-1 μ Var ou avec des bactéries du genre *Vibrio* (H. Wang et al. 2024; Green, Helbig, et al. 2016). Le *priming* immunitaire est défini comme la capacité du système immunitaire inné à mémoriser ou à réutiliser des informations issues d'une exposition préalable à un pathogène ou à ses composants, permettant ainsi une réponse plus rapide et efficace lors de réexpositions ultérieures (Caroline Montagnani et al. 2024). À ce jour, le support cellulaire de ce *priming* reste inconnu. Pour déterminer si les hémocytes ou les facteurs humoraux de l'hémolymphe sont impliqués dans ce *priming*, nous pourrions imaginer primer des huîtres avec du poly I:C ou avec des bactéries inactivées par la chaleur, une méthode couramment utilisée pour primer *C. gigas* (Lafont et al. 2020), puis prélever leur hémolymphe afin de la transplanter chez des huîtres n'ayant pas été primées. Nous pourrions ensuite étudier la survie de ces huîtres transplantées lors d'une infection par le virus OsHV-1 μ Var pour valider le support hémolympatique du *priming*. Pour distinguer le rôle des hémocytes de celui des facteurs humoraux circulants, nous pourrions transplanter soit uniquement les hémocytes (reprises dans du plasma d'huîtres non primées), soit uniquement

l'hémolymphe (dans laquelle auraient été repris des hémocytes provenant d'huîtres non primées, tout en vérifiant l'absence de poly I:C pour éviter tout effet confondants). Il serait également intéressant de caractériser la réponse transcriptomique par scRNA-Seq des hémocytes après un *priming* au poly I:C. Cela nous permettrait de mettre en évidence un possible nouveau cluster hémocytaire surexprimant les gènes associé au *priming* immunitaires (ADAR-1, cGAS, DICER, IFI44, IRF2, SACSIN, VIPERIN) mis en évidence lors d'analyse de RNA-Seq (Lafont et al. 2020). L'identification de marqueurs spécifiques de cette nouvelle population transcriptomique permettrait son association à un type hémocytaire, par des approches de qPCR sur des hémocytes triés sur gradient de Percoll, issus d'animaux primés. Le *priming* est suspecté comme pouvant dépendre de modifications épigénétiques (Lanz-Mendoza et Contreras-Garduño 2022). Il serait donc intéressant d'analyser le remodelage épigénétique des hémocytes après un *priming* au poly I:C, par des techniques telles que le BS-Seq, le ChIP-Seq ou le scA-TAC-Seq, afin de déterminer le support moléculaire épigénétique du *priming* chez *C. gigas*.

L'analyse hémocytaire comme méthode pour détecter des stress biotiques et abiotiques chez *Crassostrea gigas*.

L'objectif serait de transposer chez l'huître ce qui est couramment pratiqué chez l'homme : détecter les altérations de l'état général de l'animal à partir des modifications de sa formule hémocytaire (« sanguine ») après prélèvement.

Nos travaux ont permis de caractériser des marqueurs moléculaires spécifiques des différentes populations hémocytaires et d'établir un profil de base chez l'huître en condition naïve. Ces marqueurs pourraient être utilisés pour développer un suivi, via qPCR, des populations hémocytaires afin d'évaluer l'état physiologique de l'huître et donc la présence d'infections potentielles. En effet, à ce jour, les méthodes de diagnostic permettent la détection de certains pathogènes bactériens, viraux et parasitaires de façon directe (Oden et al. 2011; Geslin et al. 2024; Isabelle Arzul et al. 2022). Cependant, l'émergence de nouveaux agents pathogènes impose un développement continu de nouvelles techniques de détection, afin de prévenir les infections avant que des vagues de mortalité ne se produisent. Traditionnellement, la détection des pathologies repose sur l'observation des agents pathogènes en histologie (Thébault et al. 2005) ou par des analyses moléculaires sur des lysats d'animaux entiers (Zaczek-Moczyłowska et al. 2020).

De plus, à partir de nos résultats, nous proposons de suivre par cytologie les variations des populations hémycytaires comme indicateurs de stress biotiques (infections) ou abiotiques. En particulier, l'analyse cytologique des hémycytes par marquage MCDh a montré qu'il est possible de relier une formule hémycytaire spécifique à l'état infectieux des animaux. Cette méthode pourrait servir à évaluer le statut sanitaire des huîtres, qu'il s'agisse d'une exposition à un pathogène ou à des contaminants environnementaux connus pour affecter leur physiologie et leur sensibilité aux infections (Cao, Liu, et al. 2018b; Geret et al. 2013; dos Reis et al. 2020).

Dans les deux cas, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la significativité des changements de formule hémycytaire en réponse à différents agents pathogènes ou à des stress abiotiques. L'analyse de l'hémolymphe de quelques individus pourrait néanmoins offrir une vision globale des stress subis par les huîtres.

Toutefois, l'examen des lames cytologiques reste une tâche chronophage, nécessitant un apprentissage pour la reconnaissance des types hémycytaires et pouvant introduire des biais entre opérateurs. Le développement d'outils automatisés permettant de quantifier rapidement les sept populations hémycytaires à partir de prélèvements serait une solution rapide d'analyse. Deux approches pourraient être explorées : i) l'analyse automatisée des lames cytologiques par intelligence artificielle (Balasubramanian, Gayathri Devi, et Ramya 2023) et ii) l'utilisation de la cytométrie en flux à déconvolution spectrale (Robinson 2022). Cette dernière permettrait une caractérisation fine de la composition cellulaire de l'hémolymphe en prenant en compte, en plus de la taille et la granulométrie, classiquement utilisés en cytométrie, l'autofluorescence des hémycytes, facilitant ainsi l'identification des différents types cellulaires. Le développement de tels outils permettrait une évaluation rapide et précise de l'état physiologique des huîtres.

Pour conclure, les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis le développement d'approches cytologiques, de biologie fonctionnelle, et de transcriptomique, permettant d'obtenir différents outils offrant de nouvelles perspectives et opportunités pour étudier les micro-organismes pathogènes affectant les huîtres en ostréiculture. En outre, ces travaux confortent de précédentes observations sur les fonctions immunitaires des hémycytes de *C. gigas* tout en les enrichissant de manière significative. Grâce à nos travaux sur la description de l'hématopoïèse chez l'huître, via l'utilisation du séquençage d'ARNm sur cellules uniques, il est désormais possible de caractériser plus finement les différents types d'hémycytes et leurs trajectoires de différenciation. Ces progrès ouvrent la voie à une compréhension plus profonde de la plasticité fonctionnelle

des hémocytes et de leurs rôles dans la réponse immunitaire face aux pathogènes, offrant ainsi de nouvelles pistes pour la gestion des maladies en ostréiculture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adema, C. M., L. A. Hertel, R. D. Miller, et E. S. Loker. 1997. « A Family of Fibrinogen-Related Proteins That Precipitates Parasite-Derived Molecules Is Produced by an Invertebrate after Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (16): 8691-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8691>.
- Adema, Coen M. 2015. « Fibrinogen-Related Proteins (FREPs) in Mollusks ». In *Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations*, édité par Ellen Hsu et Louis Du Pasquier, 111-29. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_5.
- Aerbajinai, Wulin, Y. Terry Lee, Urszula Wojda, Valarie A. Barr, et Jeffery L. Miller. 2004. « Cloning and Characterization of a Gene Expressed during Terminal Differentiation That Encodes a Novel Inhibitor of Growth * ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (3): 1916-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305634200>.
- Akira, Shizuo, et Kiyoshi Takeda. 2004. « Toll-like Receptor Signalling ». *Nature Reviews Immunology* 4 (7): 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>.
- Aladaileh, Saleem, Sham V. Nair, Debra Birch, et David A. Raftos. 2007. « Sydney Rock Oyster (*Saccostrea Glomerata*) Hemocytes: Morphology and Function ». *Journal of Invertebrate Pathology* 96 (1): 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.011>.
- Allam, Bassem, et Emmanuelle Pales Espinosa. 2016. « Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? ». *Fish & Shellfish Immunology*, Special Issue: ISFSI 2016, 53 (juin):4-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037>.
- Allam, Bassem, et David Raftos. 2015. « Immune Responses to Infectious Diseases in Bivalves ». *Journal of Invertebrate Pathology* 131 (octobre):121-36. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>.
- Ameisen, J. C. 2002. « On the Origin, Evolution, and Nature of Programmed Cell Death: A Timeline of Four Billion Years ». *Cell Death & Differentiation* 9 (4): 367-93. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400950>.
- Andrés, Celia María Curieses, José Manuel Pérez de la Lastra, Celia Andrés Juan, Francisco J. Plou, et Eduardo Pérez-Lebeña. 2022. « The Role of Reactive Species on Innate Immunity ». *Vaccines* 10 (10): 1735. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101735>.
- Arthur, J. Simon C., et Steven C. Ley. 2013. « Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 13 (9): 679-92. <https://doi.org/10.1038/nri3495>.
- Arzul, I., B. Chollet, S. Boyer, D. Bonnet, J. Gaillard, Y. Baldi, M. Robert, J. P. Joly, C. Garcia, et M. Bouchoucha. 2014. « Contribution to the Understanding of the Cycle of the Protozoan Parasite *Marteilia Refringens* ». *Parasitology* 141 (2): 227-40. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001418>.
- Arzul, Isabelle, Céline Garcia, Bruno Chollet, Delphine Serpin, Coralie Lupo, Mathilde Noyer, Delphine Tourbiez, Chloé Berland, Lionel Dégremont, et Marie-Agnès Travers. 2022. « First Characterization of the Parasite *Haplosporidium Costale* in France and Development of a Real-Time PCR Assay for Its Rapid Detection in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): e2041-58. <https://doi.org/10.1111/tbed.14541>.
- Ashton-Alcox, K. A., et S. E. Ford. 1998a. « Variability in Molluscan Hemocytes: A Flow Cytometric Study ». *Tissue and Cell* 30 (2): 195-204. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(98\)80068-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(98)80068-2).
- Ashton-Alcox, K.A., et S.E. Ford. 1998b. « Variability in Molluscan Hemocytes: A Flow Cytometric Study ». *Tissue and Cell* 30 (2): 195-204. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(98\)80068-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(98)80068-2).

- Ashwell, Gilbert, et Anatol G. Morell. 1974. « The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins ». In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 99-128. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470122860.ch3>.
- Auffret, Michel, Matthieu Duchemin, Sabrina Rousseau, Isabelle Boutet, Arnaud Tanguy, Dario Moraga, et Alain Marhic. 2004. « Monitoring of Immunotoxic Responses in Oysters Reared in Areas Contaminated by the “Erika” Oil Spill ». *Aquatic Living Resources* 17 (3): 297-302. <https://doi.org/10.1051/alr:2004035>.
- Ayling, G. M. 1974. « Uptake of cadmium, zinc, copper, lead and chromium in the pacific oyster. *Crassostrea gigas*. Grown in the tamar river. Tasmania ». *Water Research* 8 (10): 729-38. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(74\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90017-7).
- Azandégbé, Afi, Matthieu Garnier, Françoise Andrieux-Loyer, Roger Kérouvel, Xavier Philippon, et Jean-Louis Nicolas. 2010. « Occurrence and Seasonality of *Vibrio Aestuarianus* in Sediment and *Crassostrea Gigas* Haemolymph at Two Oyster Farms in France ». *Diseases of Aquatic Organisms* 91 (3): 213-21. <https://doi.org/10.3354/dao02253>.
- Bachère, E., D. Chagot, et H. Grizel. 1988. « Separation of *Crassostrea Gigas* Hemocytes by Density Gradient Centrifugation and Counterflow Centrifugal Elutriation ». *Developmental and Comparative Immunology* 12 (3): 549-59. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(88\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0145-305x(88)90071-7).
- Bachère, Evelyne, Dominique Chagot, et Henri Grizel. 1988. « Separation of *Crassostrea Gigas* Hemocytes by Density Gradient Centrifugation and Counterflow Centrifugal Elutriation ». *Developmental & Comparative Immunology* 12 (3): 549-59. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(88\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0145-305X(88)90071-7).
- Bachère, Evelyne, Yannick Gueguen, Marcelo Gonzalez, Julien De Lorgeril, Julien Garnier, et Bernard Romestand. 2004. « Insights into the Anti-Microbial Defense of Marine Invertebrates: The Penaeid Shrimps and the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Immunological Reviews* 198 (1): 149-68. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x>.
- Bachère, Evelyne, Rafael Diego Rosa, Paulina Schmitt, Aurore C. Poirier, Nicolas Merou, Guillaume M. Charrière, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2015. « The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view ». *Fish & Shellfish Immunology*, SI: Molluscan Immunity, 46 (1): 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040>.
- Backeljau, Thierry. 2018. « *Crassostrea gigas* or *Magallana gigas*: A Community-based Scientific Response », mars.
- Bahar, Ali Adem, et Dacheng Ren. 2013. « Antimicrobial Peptides ». *Pharmaceuticals* 6 (12): 1543-75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.
- Balasubramanian, Kishore, K. Gayathri Devi, et K. Ramya. 2023. « Classification of White Blood Cells Based on Modified U-Net and SVM ». *Concurrency and Computation: Practice and Experience* 35 (28): e7862. <https://doi.org/10.1002/cpe.7862>.
- Ballina, Nuria R. de la, Francesco Maresca, Asunción Cao, et Antonio Villalba. 2022. « Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review ». *Frontiers in Immunology* 13 (avril):826255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>.
- Banerjee, Utpal, Juliet R. Girard, Lauren M. Goins, et Carrie M. Spratford. 2019. « *Drosophila* as a Genetic Model for Hematopoiesis ». *Genetics* 211 (2): 367-417. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300223>.
- Barber, Bruce, et Roger Mann. 1994. « Growth And Mortality Of Eastern Oysters, *Crassostrea-Virginica* (Gmelin, 1791), And Pacific Oysters, *Crassostrea-Gigas*

- (Thunberg, 1793) Under Challenge From The Parasite, Perkinsus-Marinus ». *Journal Of Shellfish Research* 13 (1): 109-14.
- Barreau-Roumiguère, Catherine, Caroline Montagnani, et Jean-Michel Escoubas. 2003. « Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 27 (9): 793-800. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00075-2).
- Bassim, Sleiman, Bertrand Genard, Sophie Gauthier-Clerc, Dario Moraga, et Réjean Tremblay. 2015. « Ontogeny of Bivalve Immunity: Assessing the Potential of next-Generation Sequencing Techniques ». *Reviews in Aquaculture* 7 (3): 197-217. <https://doi.org/10.1111/raq.12064>.
- Batista, F. M., P. Boudry, A. Dos Santos, T. Renault, et F. Ruano. 2009. « Infestation of the Cupped Oysters *Crassostrea Angulata*, *C. Gigas* and Their First-Generation Hybrids by the Copepod *Myicola Ostreae*: Differences in Susceptibility and Host Response ». *Parasitology* 136 (5): 537-43. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005691>.
- Bauckman, Kyle A., Nana Owusu-Boaitey, et Indira U. Mysorekar. 2015. « Selective autophagy: Xenophagy ». *Methods, Autophagy*, 75 (mars):120-27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.005>.
- Bayly-Jones, Charles, Siew Siew Pang, Bradley A. Spicer, James C. Whisstock, et Michelle A. Dunstone. 2020. « Ancient but Not Forgotten: New Insights Into MPEG1, a Macrophage Perforin-Like Immune Effector ». *Frontiers in Immunology* 11 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581906>.
- Bayne, Brian. 2017. *Biology of Oysters*. <https://shop.elsevier.com/books/biology-of-oysters/bayne/978-0-12-803472-9>.
- Bergiers, Isabelle, Tallulah Andrews, Özge Vargel Bölükbaşı, Andreas Bunes, Ewa Janosz, Natalia Lopez-Angueta, Kerstin Ganter, et al. 2018. « Single-Cell Transcriptomics Reveals a New Dynamical Function of Transcription Factors during Embryonic Hematopoiesis ». *ELife* 7 (mars):e29312. <https://doi.org/10.7554/eLife.29312>.
- Birben, Esra, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, et Omer Kalayci. 2012. « Oxidative Stress and Antioxidant Defense ». *World Allergy Organization Journal* 5 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Bleidorn, Christoph. 2019. « Recent Progress in Reconstructing Lophotrochozoan (Spiralian) Phylogeny ». *Organisms Diversity & Evolution* 19 (4): 557-66. <https://doi.org/10.1007/s13127-019-00412-4>.
- Boehm, Thomas, Nathanael McCurley, Yoichi Sutoh, Michael Schorpp, Masanori Kasahara, et Max D. Cooper. 2012. « VLR-Based Adaptive Immunity ». *Annual Review of Immunology* 30:203-20. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075038>.
- Bohlson, Suzanne S., Sean D. O'Conner, Holly Jo Hulsebus, Minh-Minh Ho, et Deborah A. Fraser. 2014. « Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization ». *Frontiers in Immunology* 5:402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00402>.
- Bossel Ben-Moshe, Noa, Shelly Hen-Avivi, Natalia Levitin, Dror Yehezkel, Marije Oosting, Leo A. B. Joosten, Mihai G. Netea, et Roi Avraham. 2019. « Predicting Bacterial Infection Outcomes Using Single Cell RNA-Sequencing Analysis of Human Immune Cells ». *Nature Communications* 10 (1): 3266. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11257-y>.
- Botta, Robert, Frank Asche, J. Scott Borsum, et Edward V. Camp. 2020. « A review of global oyster aquaculture production and consumption ». *Marine Policy* 117 (juillet):103952. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103952>.
- Boulais, Jonathan, Matthias Trost, Christian R Landry, Régis Dieckmann, Emmanuel D Levy, Thierry Soldati, Stephen W Michnick, Pierre Thibault, et Michel Desjardins. 2010.

- « Molecular characterization of the evolution of phagosomes ». *Molecular Systems Biology* 6 (1): 423. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.80>.
- Broquard, Coralie, Anne-Sophie Martinez, Elise Maurouard, Jean-Baptiste Lamy, et Lionel Dégremont. 2020. « Sex determination in the oyster *Crassostrea gigas* - A large longitudinal study of population sex ratios and individual sex changes ». *Aquaculture* 515 (janvier):734555. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734555>.
- Bruijn, Marella de, et Elaine Dzierzak. 2017. « Runx Transcription Factors in the Development and Function of the Definitive Hematopoietic System ». *Blood* 129 (15): 2061-69. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-689109>.
- Bruto, Maxime, Adèle James, Bruno Petton, Yannick Labreuche, Sabine Chenivresse, Marianne Alunno-Bruscia, Martin F. Polz, et Frédérique Le Roux. 2017. « *Vibrio Crassostreae*, a Benign Oyster Colonizer Turned into a Pathogen after Plasmid Acquisition ». *The ISME Journal* 11 (4): 1043-52. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.162>.
- Buestel, Dominique, Michel Ropert, Jean Prou, Philippe Gouletquer, Jean Prou, et Philippe Gouletquer. 2009. « History, Status, and Future of Oyster Culture in France ». *Journal of Shellfish Research* 28 (4): 813-20. <https://doi.org/10.2983/035.028.0410>.
- Bülow, Sigrid, Lisa Zeller, Maren Werner, Martina Toelge, Jonas Holzinger, Clemens Entzian, Thomas Schubert, et al. 2018. « Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Is an Enhancer of Bacterial Lipoprotein Recognition ». *Frontiers in Immunology* 9 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02768>.
- Burioli, E. A. V., M. Prearo, et M. Houssin. 2017. « Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 μ Var isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland ». *Virology* 509 (septembre):239-51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.027>.
- Burreson, E. M., N. A. Stokes, et C. S. Friedman. 2000. « Increased Virulence in an Introduced Pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* ». *Journal of Aquatic Animal Health* 12 (1): 1-8. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0001:IVIAIP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0001:IVIAIP>2.0.CO;2).
- Callewaert, Lien, et Chris W. Michiels. 2010. « Lysozymes in the Animal Kingdom ». *Journal of Biosciences* 35 (1): 127-60. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>.
- Cao, Ruiwen, Yongliang Liu, Qing Wang, Qianqian Zhang, Dinglong Yang, Hui Liu, Yi Qu, et Jianmin Zhao. 2018a. « The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 81 (octobre):456-62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.055>.
- . 2018b. « The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 81 (octobre):456-62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.055>.
- Cao, Ruiwen, Qing Wang, Dinglong Yang, Yongliang Liu, Wen Ran, Yi Qu, Huifeng Wu, et al. 2018. « CO₂-induced ocean acidification impairs the immune function of the Pacific oyster against *Vibrio splendidus* challenge: An integrated study from a cellular and proteomic perspective ». *Science of The Total Environment* 625 (juin):1574-83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.056>.
- Cao, Ruiwen, Tianyu Zhang, Xiao Li, Yuting Zhao, Qing Wang, Dinglong Yang, Yi Qu, Hui Liu, Zhijun Dong, et Jianmin Zhao. 2019. « Seawater acidification increases copper toxicity: A multi-biomarker approach with a key marine invertebrate, the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* ». *Aquatic Toxicology* 210 (mai):167-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.002>.

- Castillo, J. C., A. E. Robertson, et M. R. Strand. 2006. « Characterization of Hemocytes from the Mosquitoes *Anopheles Gambiae* and *Aedes Aegypti* ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (12): 891-903. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.010>.
- Cerenius, Lage, Bok Luel Lee, et Kenneth Söderhäll. 2008. « The ProPO-System: Pros and Cons for Its Role in Invertebrate Immunity ». *Trends in Immunology* 29 (6): 263-71. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>.
- Cerenius, Lage, et Kenneth Söderhäll. 2021. « Immune properties of invertebrate phenoloxidases ». *Developmental & Comparative Immunology* 122 (septembre):104098. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>.
- Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, et Mark J. Shlomchik. 2001. « B-Cell Activation by Armed Helper T Cells ». In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/>.
- Chen, Guoqing, et David V. Goeddel. 2002. « TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573): 1634-35. <https://doi.org/10.1126/science.1071924>.
- Chen, Jinhui, Shu Xiao, et Ziniu Yu. 2011. « F-Type Lectin Involved in Defense against Bacterial Infection in the Pearl Oyster (*Pinctada Martensii*) ». *Fish & Shellfish Immunology* 30 (2): 750-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.025>.
- Chi, Yong, Chengxun Xu, et Qi Li. 2024. « Influence of ploidy, genetic and environment on production traits of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Aquaculture* 586 (mai):740756. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740756>.
- Chimini, Giovanna, et Philippe Chavrier. 2000. « Function of Rho Family Proteins in Actin Dynamics during Phagocytosis and Engulfment ». *Nature Cell Biology* 2 (10): E191-96. <https://doi.org/10.1038/35036454>.
- Cima, Francesca, et Valerio Matozzo. 2018. « Proliferation and Differentiation of Circulating Haemocytes of Ruditapes Philippinarum as a Response to Bacterial Challenge ». *Fish & Shellfish Immunology* 81 (octobre):73-82. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.010>.
- Clerissi, Camille, Julien de Lorgeril, Bruno Petton, Aude Lucasson, Jean-Michel Escoubas, Yannick Gueguen, Lionel Dégremont, Guillaume Mitta, et Eve Toulza. 2020. « Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome ». *Frontiers in Microbiology* 11:311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00311>.
- Combosch, David J., Timothy M. Collins, Emily A. Glover, Daniel L. Graf, Elizabeth M. Harper, John M. Healy, Gisele Y. Kawauchi, et al. 2017. « A Family-Level Tree of Life for Bivalves Based on a Sanger-Sequencing Approach ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107 (février):191-208. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.003>.
- Comesaña, Pilar, Sandra M. Casas, Asunción Cao, Elvira Abollo, Isabelle Arzul, Benjamin Morga, et Antonio Villalba. 2012. « Comparison of Haemocytic Parameters among Flat Oyster *Ostrea Edulis* Stocks with Different Susceptibility to Bonamiosis and the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (3): 274-86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.007>.
- Comps, Michel, et Jean-Louis Duthoit. 1979. « Infections Virales Chez Les Húîtres *Crassostrea Angulata* Lmk. et *Crassostrea Gigas* Th. ». *Haliotis* 8 (janvier):301-7.
- Cong, Ming, Huifeng Wu, Xiaoli Liu, Jianmin Zhao, Xuan Wang, Jiasen Lv, et Lin Hou. 2012. « Effects of Heavy Metals on the Expression of a Zinc-Inducible Metallothionein-III Gene and Antioxidant Enzyme Activities in *Crassostrea Gigas* ». *Ecotoxicology* 21 (7): 1928-36. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0926-z>.
- Crozatier, Michèle, et Marie Meister. 2007. « *Drosophila* Haematopoiesis ». *Cellular Microbiology* 9 (5): 1117-26. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00930.x>.

- Dantan, Luc, Eve Toulza, Bruno Petton, Caroline Montagnani, Lionel Degremont, Benjamin Morga, Yannick Fleury, et al. 2024. « Microbial Education for Marine Invertebrate Disease Prevention in Aquaculture ». *Reviews in Aquaculture* 16 (3): 1229-43. <https://doi.org/10.1111/raq.12893>.
- Davies, Luke C., Stephen J. Jenkins, Judith E. Allen, et Philip R. Taylor. 2013. « Tissue-Resident Macrophages ». *Nature Immunology* 14 (10): 986-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.
- De Decker, Sophie, Yann Reynaud, et Denis Saulnier. 2013. « First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system ». *Aquaculture* 392-395 (mai):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.033>.
- De San Nicolas, Noémie, Aromal Asokan, Rafael D. Rosa, Sébastien N. Voisin, Marie-Agnès Travers, Gustavo Rocha, Luc Dantan, et al. 2022. « Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota ». *Marine Drugs* 20 (12): 745. <https://doi.org/10.3390/md20120745>.
- Dégremont, Lionel, Patrick Azéma, Elise Maurouard, et Marie-Agnès Travers. 2020. « Enhancing resistance to *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas* by selection ». *Aquaculture* 526 (septembre):735429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735429>.
- Delisle, Lizenn, Marianna Pauletto, Jeremie Vidal-Dupiol, Bruno Petton, Luca Bargelloni, Caroline Montagnani, Fabrice Pernet, Charlotte Corporeau, et Elodie Fleury. 2020. « High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinder progress of ostreid herpesvirus (OsHV-1) and promote survival ». *Journal of Experimental Biology* 223 (20): jeb226233. <https://doi.org/10.1242/jeb.226233>.
- Deretic, Vojo, et Beth Levine. 2009. « Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations ». *Cell Host & Microbe* 5 (6): 527-49. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.016>.
- DerMardirossian, Céline, Gabriel Rocklin, Ji-Yeon Seo, et Gary M. Bokoch. 2006. « Phosphorylation of RhoGDI by Src Regulates Rho GTPase Binding and Cytosol-Membrane Cycling ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (11): 4760-68. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0533>.
- Des, M., D. Fernández-Nóvoa, M. deCastro, J. L. Gómez-Gesteira, M. C. Sousa, et M. Gómez-Gesteira. 2021. « Modeling salinity drop in estuarine areas under extreme precipitation events within a context of climate change: Effect on bivalve mortality in Galician Rías Baixas ». *Science of The Total Environment* 790 (octobre):148147. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148147>.
- Destoumieux-Garzón, Delphine, Caroline Montagnani, Luc Dantan, Noémie de San Nicolas, Marie-Agnès Travers, Léo Duperret, Guillaume M. Charrière, et al. 2024. « Cross-Talk and Mutual Shaping between the Immune System and the Microbiota during an Oyster's Life ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 379 (1901): 20230065. <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0065>.
- Di Meo, Sergio, Tanea T. Reed, Paola Venditti, et Victor Manuel Victor. 2016. « Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.
- Domínguez, Rula, Elsa Vázquez, Sarah A. Woodin, David S. Wethey, Laura G. Peteiro, Gonzalo Macho, et Celia Olabarria. 2020. « Sublethal responses of four commercially important bivalves to low salinity ». *Ecological Indicators* 111 (avril):106031. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.106031>.
- Donaghy, Ludovic, Hyun-Ki Hong, Hee-Jung Lee, Je-Cheon Jun, Young-Je Park, et Kwang-Sik Choi. 2010. « Hemocyte Parameters of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* a Year

- after the Hebei Spirit Oil Spill off the West Coast of Korea ». *Helgoland Marine Research* 64 (4): 349-55. <https://doi.org/10.1007/s10152-010-0190-7>.
- Donaghy, Ludovic, Edouard Kraffe, Nelly Le Goïc, Christophe Lambert, Aswani K. Volety, et Philippe Soudant. 2012. « Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*: A Mitochondrial Involvement ». *PLOS ONE* 7 (10): e46594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046594>.
- Doney, Scott C., Victoria J. Fabry, Richard A. Feely, et Joan A. Kleypas. 2009. « Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem ». *Annual Review of Marine Science* 1 (Volume 1, 2009): 169-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834>.
- Dong, Miren, Weilin Wang, Lingling Wang, Yu Liu, Youwen Ma, Meijia Li, Haipeng Liu, Kejian Wang, et Linsheng Song. 2022. « The Characterization of an Agranulocyte-Specific Marker (CgCD9) in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 127 (août):446-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.067>.
- Doni, Lapo, Giovanni Tassistro, Caterina Oliveri, Teresa Balbi, Manon Auguste, Alberto Pallavicini, Laura Canesi, Carla Pruzzo, et Luigi Vezzulli. 2023. « Plankton and Marine Aggregates as Transmission Vectors for *V. Aestuarianus* 02/041 Infecting the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Environmental Microbiology Reports* 15 (6): 631-41. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13206>.
- Doolittle, R. F. 1992. « A Detailed Consideration of a Principal Domain of Vertebrate Fibrinogen and Its Relatives ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 1 (12): 1563-77. <https://doi.org/10.1002/pro.5560011204>.
- Doolittle, Russell F, Kyle McNamara, et Kevin Lin. 2012. « Correlating structure and function during the evolution of fibrinogen-related domains ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 21 (12): 1808-23. <https://doi.org/10.1002/pro.2177>.
- Dubos, R. J. 1939. « STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : II. PROTECTIVE EFFECT OF THE BACTERICIDAL AGENT AGAINST EXPERIMENTAL PNEUMOCOCCUS INFECTIONS IN MICE ». *The Journal of Experimental Medicine* 70 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1084/jem.70.1.11>.
- Dubovskiy, I. M., N. A. Kryukova, V. V. Glupov, et N. A. Ratcliffe. 2016. « Encapsulation and Nodulation in Insects ». *Invertebrate Survival Journal* 13 (1): 229-46. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.229-246>.
- Duddu, Sushmitha, Rituparna Chakrabarti, Anuran Ghosh, et Praphulla Chandra Shukla. 2020. « Hematopoietic Stem Cell Transcription Factors in Cardiovascular Pathology ». *Frontiers in Genetics* 11 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.588602>.
- Duperthuy, M, J Binesse, F Le Roux, B Romestand, A Caro, Got P, Givaudan A, Mazel D, Bachère E, et Destoumieux-Garzón D. 2010. « The Major Outer Membrane Protein OmpU of *Vibrio Splendidus* Contributes to Host Antimicrobial Peptide Resistance and Is Required for Virulence in the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Environmental Microbiology* 12 (4). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x>.
- Duperthuy, Marylise, Paulina Schmitt, Edwin Garzón, Audrey Caro, Rafael D. Rosa, Frédérique Le Roux, Nicole Lautrédou-Audouy, et al. 2011. « Use of OmpU Porins for Attachment and Invasion of *Crassostrea Gigas* Immune Cells by the Oyster Pathogen *Vibrio Splendidus* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (7): 2993-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015326108>.
- Dupont, Christopher L, Gregor Grass, et Christopher Rensing. 2011. « Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications† ». *Metallomics* 3 (11): 1109-18. <https://doi.org/10.1039/c1mt00107h>.
- Dziarski, Roman. 2004. « Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) ». *Molecular Immunology, Innate Immunity*, 40 (12): 877-86. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.011>.

- Dziarski, Roman, et Dipika Gupta. 2006. « The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) ». *Genome Biology* 7 (8): 232. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-8-232>.
- Elmore, Susan. 2007. « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death ». *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Epelboin, Yanouk, Laure Quintric, Eric Guévelou, Pierre Boudry, Vianney Pichereau, et Charlotte Corporeau. 2016. « The Kinome of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*, Its Expression during Development and in Response to Environmental Factors ». *PLoS One* 11 (5): e0155435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155435>.
- Escoubas, Jean-Michel, Laurence Briant, Caroline Montagnani, Stephanie Hez, Christian Devaux, et Philippe Roch. 1999. « Oyster IKK-like Protein Shares Structural and Functional Properties with Its Mammalian Homologues ». *FEBS Letters* 453 (3): 293-98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00737-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00737-1).
- Estrada, Norma, Erick J. Núñez-Vázquez, Alejandra Palacios, Felipe Ascencio, Laura Guzmán-Villanueva, et Rubén G. Contreras. 2021. « In Vitro Evaluation of Programmed Cell Death in the Immune System of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* by the Effect of Marine Toxins ». *Frontiers in Immunology* 12 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.634497>.
- Etienne-Manneville, Sandrine, et Alan Hall. 2002. « Rho GTPases in Cell Biology ». *Nature* 420 (6916): 629-35. <https://doi.org/10.1038/nature01148>.
- Evariste, Lauris, Michel Auffret, Sandra Audonnet, Alain Geffard, Elise David, Pauline Brousseau, Michel Fournier, et Stéphane Betoulle. 2016. « Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha* ». *Fish & Shellfish Immunology* 56 (septembre):144-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.054>.
- Fallet, Manon, Caroline Montagnani, Bruno Petton, Luc Dantan, Julien de Lorgeril, Sébastien Comarmond, Cristian Chaparro, et al. 2022. « Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection ». *Microbiome* 10 (1): 85. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5>.
- Feng, S. Y., J. S. Feng, et T. Yamasu. 1977. « Roles of *Mytilus Coruscus* and *Crassostrea Gigas* Blood Cells in Defense and Nutrition ». In *Comparative Pathobiology: Volume 3 Invertebrate Immune Responses*, édité par Lee A. Bulla et Thomas C. Cheng, 31-67. Comparative Pathobiology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7299-2_3.
- Filipe, Sergio R., Alexander Tomasz, et Petros Ligoxygakis. 2005. « Requirements of Peptidoglycan Structure That Allow Detection by the *Drosophila* Toll Pathway ». *EMBO Reports* 6 (4): 327-33. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400371>.
- Fisher, William. 2004. « Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in eastern oyster amebocytes ». *Journal of Shellfish Research* 23 (août):321-51.
- Flannagan, Ronald S., Gabriela Cosío, et Sergio Grinstein. 2009. « Antimicrobial Mechanisms of Phagocytes and Bacterial Evasion Strategies ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (5): 355-66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>.
- Flemming, C. A., et J. T. Trevors. 1989. « Copper Toxicity and Chemistry in the Environment: A Review ». *Water, Air, and Soil Pollution* 44 (1): 143-58. <https://doi.org/10.1007/BF00228784>.
- Ford, Susan E., Kathryn A. Ashton-Alcox, et Sheila A. Kanaley. 1993. « In vitro Interactions between Bivalve Hemocytes and the Oyster Pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX) ». *The Journal of Parasitology* 79 (2): 255-65. <https://doi.org/10.2307/3283516>.

- Franchi, Luigi, Neil Warner, Kyle Viani, et Gabriel Nuñez. 2009. « Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense ». *Immunological Reviews* 227 (1): 106-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>.
- Fuhrmann, M., A. Castinel, D. Cheslett, D. Furones Nozal, et R. J. Whittington. 2019. « The Impacts of Ostreid Herpesvirus 1 Microvariants on Pacific Oyster Aquaculture in the Northern and Southern Hemispheres since 2008 », septembre. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.3000>.
- Fuhrmann, Marine, Bruno Petton, Virgile Quillien, Nicole Faury, Benjamin Morga, et Fabrice Pernet. 2016. « Salinity Influences Disease-Induced Mortality of the Oyster *Crassostrea Gigas* and Infectivity of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) ». *Aquaculture Environment Interactions* 8 (septembre):543-52. <https://doi.org/10.3354/aei00197>.
- Gagnaire, B, H Thomas-Guyon, et T Renault. 2004. « In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes ». *Fish & Shellfish Immunology* 16 (4): 501-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007>.
- Gagnaire, Beatrice, Heloise Frouin, Kevin Moreau, Helene Thomas-Guyon, et Tristan Renault. 2006. « Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) ». *Fish & Shellfish Immunology* 20 (4): 536-47. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>.
- Gan, Nin, Leisha Martin, et Wei Xu. 2021. « Impact of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation on Oyster Health ». *Frontiers in Physiology* 12 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.734463>.
- Garcia, Céline, Aurélie Mesnil, Delphine Tourbiez, Mirna Moussa, Christine Dubreuil, Amélie Gonçalves de Sa, Bruno Chollet, et al. 2021. « *Vibrio Aestuarianus* Subsp. *Cardii* Subsp. Nov., Pathogenic to the Edible Cockles *Cerastoderma Edule* in France, and Establishment of *Vibrio Aestuarianus* Subsp. *Aestuarianus* Subsp. Nov. and *Vibrio Aestuarianus* Subsp. *Francensis* Subsp. Nov. ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71 (2): 004654. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004654>.
- Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert, et J.-L. Nicolas. 2007. « Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Microbial Ecology* 53 (2): 187-96. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9>.
- Garnier, Matthieu, Yannick Labreuche, et Jean-Louis Nicolas. 2008. « Molecular and Phenotypic Characterization of *Vibrio Aestuarianus* Subsp. *Francensis* Subsp. Nov., a Pathogen of the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Systematic and Applied Microbiology* 31 (5): 358-65. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>.
- Gay, Mélanie, Tristan Renault, Anne-Marie Pons, et Frédérique Le Roux. 2004. « Two *Vibrio Splendidus* Related Strains Collaborate to Kill *Crassostrea Gigas*: Taxonomy and Host Alterations ». *Diseases of Aquatic Organisms* 62 (1-2): 65-74. <https://doi.org/10.3354/dao062065>.
- Gerard, Andre, Yamama Naciri-Graven, Pierre Boudry, Sophie Launey, Serge Heurtebise, Christophe Ledu, et Pascal Phelipot. 1995. « Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations reproduction et génétique ». In . <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3210/>.
- Gerdol, Marco, Marta Gomez-Chiarri, Maria G. Castillo, Antonio Figueras, Graziano Fiorito, Rebeca Moreira, Beatriz Novoa, et al. 2018. « Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a Focus on Bivalvia ». In *Advances in Comparative Immunology*, édité par Edwin L. Cooper, 225-341. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_11.

- Gerdol, Marco, Paulina Schmitt, Paola Venier, Gustavo Rocha, Rafael Diego Rosa, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2020. « Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins ». *Frontiers in Immunology* 11 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758>.
- Gerdol, Marco, Paola Venier, et Alberto Pallavicini. 2015. « The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia ». *Developmental & Comparative Immunology* 49 (1): 59-71. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.007>.
- Geret, F., T. Burgeot, J. Haure, B. Gagnaire, T. Renault, P. Y. Communal, et J. F. Samain. 2013. « Effects of Low-Dose Exposure to Pesticide Mixture on Physiological Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Environmental Toxicology* 28 (12): 689-99. <https://doi.org/10.1002/tox.20764>.
- Geslin, Valentin, Leila Parizadeh, Marie-Agnès Travers, Luca Tomasetti, et Thor Ole Gulsrud. 2024. *Detection, Quantification and Characterisation by Digital Image Analysis Method of Bacterial Infection by Vibrio Aestuarianus, Stained by Immunohistochemistry, in the Pacific Oyster Magallana Gigas*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4833230>.
- Gold, Katrina S., et Katja Brückner. 2015. « Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster* ». *Seminars in immunology* 27 (6): 357-68. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.010>.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, G. Desserre, J. de Lorgeril, B. Romestand, et E. Bachère. 2007. « Molecular Characterization of Two Isoforms of Defensin from Hemocytes of the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Developmental and Comparative Immunology* 31 (4): 332-39. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.006>.
- Gonzalez, Marcelo, Yannick Gueguen, Delphine Destoumieux-Garzón, Bernard Romestand, Julie Fievet, Martine Pugnère, Françoise Roquet, et al. 2007. « Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (45): 17759-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702281104>.
- Gonzalez, Marcelo, Bernard Romestand, Julie Fievet, Arnaud Huvet, Marie-Christine Lebart, Yannick Gueguen, et Evelyne Bachère. 2005. « Evidence in Oyster of a Plasma Extracellular Superoxide Dismutase Which Binds LPS ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (2): 1089-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.075>.
- Gordon, Siamon. 2016. « Phagocytosis: An Immunobiologic Process ». *Immunity* 44 (3): 463-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
- Goudenège, David, Marie Agnès Travers, Astrid Lemire, Bruno Petton, Philippe Haffner, Yannick Labreuche, Delphine Tourbiez, et al. 2015. « A Single Regulatory Gene Is Sufficient to Alter *Vibrio Aestuarianus* Pathogenicity in Oysters ». *Environmental Microbiology* 17 (11): 4189-99. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12699>.
- Gouletquer, Philippe, et Maurice Heral. 1997. « Marine Molluscan Production Trends in France: From Fisheries to Aquaculture ». *NOAA Tech. Rep. NMFS* 129 (janvier):137-64.
- Green, Timothy J., Karla Helbig, Peter Speck, et David A. Raftos. 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 (octobre):113-20. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.09.002>.
- Green, Timothy J., et Caroline Montagnani. 2013. « Poly I:C Induces a Protective Antiviral Immune Response in the Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) against Subsequent

- Challenge with Ostreid Herpesvirus (OsHV-1 Mvar) ». *Fish & Shellfish Immunology* 35 (2): 382-88. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051>.
- Green, Timothy J., David Raftos, Peter Speck, et Caroline Montagnani. 2015. « Antiviral Immunity in Marine Molluscs ». *The Journal of General Virology* 96 (9): 2471-82. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244>.
- Green, Timothy J., Agnes Vergnes, Caroline Montagnani, et Julien de Lorgeril. 2016. « Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections ». *Veterinary Research* 47 (1): 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0356-7>.
- Gueguen, Yannick, Romestand Bernard, Fievet Julie, Schmitt Paulina, Destoumieux-Garzón Delphine, Vandenbulcke Franck, Bulet Philippe, et Bachère Evelyne. 2009. « Oyster Hemocytes Express a Proline-Rich Peptide Displaying Synergistic Antimicrobial Activity with a Defensin ». *Molecular Immunology* 46 (4): 516-22. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.021>.
- Gueguen, Yannick, Jean-Paul Cadoret, Didier Flament, Catherine Barreau-Roumiguière, Anne-Laure Girardot, Julien Garnier, Alixe Hoareau, Evelyne Bachère, et Jean-Michel Escoubas. 2003. « Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas* ». *Gene* 303 (janvier): 139-45. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01149-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01149-6).
- Gueguen, Yannick, Amaury Herpin, André Aumelas, Julien Garnier, Julie Fievet, Jean-Michel Escoubas, Philippe Bulet, et al. 2006. « Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea Gigas*: RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, AND GENE EXPRESSION* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (1): 313-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510850200>.
- Guo, Ximing, Yan He, Linlin Zhang, Christophe Lelong, et Aude Jouaux. 2015. « Immune and Stress Responses in Oysters with Insights on Adaptation ». *Fish & Shellfish Immunology*, SI: Molluscan Immunity, 46 (1): 107-19. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.018>.
- Guo, Zhicheng, Jiejie Sun, Xiaoqian Lv, Tong Zhang, Hongsheng Yao, Wei Wu, Zhen Xing, Ning Kong, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2023. « The ferroptosis in haemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* upon erastin treatment ». *Fish & Shellfish Immunology* 133 (février):108556. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108556>.
- Haberkorn, Hansy, Christophe Lambert, Nelly Le Goïc, Claudie Quéré, Audrey Bruneau, Ricardo Riso, Michel Auffret, et Philippe Soudant. 2014. « Cellular and biochemical responses of the oyster *Crassostrea gigas* to controlled exposures to metals and *Alexandrium minutum* ». *Aquatic Toxicology* 147 (février):158-67. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.012>.
- Halpern, Benjamin S., Shaun Walbridge, Kimberly A. Selkoe, Carrie V. Kappel, Fiorenza Micheli, Caterina D'Agrosa, John F. Bruno, et al. 2008. « A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems ». *Science* 319 (5865): 948-52. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>.
- He, Xiaocui, Yang Zhang, et Ziniu Yu. 2011. « An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Molecular characterization and gene expression ». *Fish & Shellfish Immunology* 30 (3): 870-76. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.009>.
- Hellio, Claire, Anne Bado-Nilles, Béatrice Gagnaire, Tristan Renault, et Hélène Thomas-Guyon. 2007. « Demonstration of a True Phenoloxidase Activity and Activation of a ProPO Cascade in Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* (Thunberg) in Vitro ». *Fish & Shellfish Immunology* 22 (4): 433-40. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.014>.

- Higo, Shimpei, Hirotaka Ishii, et Hitoshi Ozawa. 2023. « Recent Advances in High-Sensitivity In Situ Hybridization and Costs and Benefits to Consider When Employing These Methods ». *Acta Histochemica et Cytochemica* 56 (3): 49. <https://doi.org/10.1267/ahc.23-00024>.
- Hine, P. M. 2020. « Haplosporidian host:parasite interactions ». *Fish & Shellfish Immunology* 103 (août):190-99. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.004>.
- Huang, Baoyu, Linlin Zhang, Yishuai Du, Fei Xu, Li Li, et Guofan Zhang. 2017. « Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates ». *Scientific Reports* 7 (1): 8217. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08566-x>.
- Huang, Wanjing, Qiang Xu, Jing Su, Lei Tang, Zhao-Zhe Hao, Chuan Xu, Ruifeng Liu, et al. 2022. « Linking Transcriptomes with Morphological and Functional Phenotypes in Mammalian Retinal Ganglion Cells ». *Cell Reports* 40 (11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111322>.
- Hurst, James K. 2012. « What really happens in the neutrophil phagosome? » *Free radical biology & medicine* 53 (3): 508-20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.008>.
- Iizuka, Masao, Toshihiro Nagasaki, Keisuke G. Takahashi, Makoto Osada, et Naoki Itoh. 2014. « Involvement of Pacific Oyster CgPGRP-S1S in Bacterial Recognition, Agglutination and Granulocyte Degranulation ». *Developmental and Comparative Immunology* 43 (1): 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.011>.
- Inohara, Naohiro, Takeyoshi Koseki, Luis del Peso, Yuanming Hu, Christina Yee, Shu Chen, Roberto Carrio, et al. 1999. « Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor-KB * ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (21): 14560-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14560>.
- Itoh, Naoki, Ryo Kamitaka, Keisuke G. Takahashi, et Makoto Osada. 2010. « Identification and Characterization of Multiple Beta-Glucan Binding Proteins in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Developmental and Comparative Immunology* 34 (4): 445-54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.003>.
- Itoh, Naoki, et Keisuke G. Takahashi. 2007. « CDNA Cloning and in Situ Hybridization of a Novel Lysozyme in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148 (2): 160-66. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.05.005>.
- . 2008. « Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150 (4): 409-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.011>.
- Ivanina, Anna V., Halina I. Falfushynska, Elia Beniash, Helen Piontkivska, et Inna M. Sokolova. 2017. « Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Journal of Experimental Biology* 220 (18): 3209-21. <https://doi.org/10.1242/jeb.160861>.
- Ivanina, Anna V., Chelsea Hawkins, et Inna M. Sokolova. 2016. « Interactive effects of copper exposure and environmental hypercapnia on immune functions of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* ». *Fish & Shellfish Immunology* 49 (février):54-65. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.011>.
- Jang, Jeyoun, Kyung-Tae Jung, Jungchan Park, Cheon-Kwon Yoo, et Gi-Eun Rhie. 2011. « The *Vibrio Cholerae* VarS/VarA Two-Component System Controls the Expression of Virulence Proteins through ToxT Regulation ». *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 5): 1466-73. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043737-0>.

- Jarzebowski, Léonard, Marie Le Bouteiller, Sabrina Coqueran, Aurélien Raveux, Sandrine Vandormael-Pournin, Alexandre David, Ana Cumano, et Michel Cohen-Tannoudji. 2018. « Mouse Adult Hematopoietic Stem Cells Actively Synthesize Ribosomal RNA ». *RNA (New York, N.Y.)* 24 (12): 1803-12. <https://doi.org/10.1261/rna.067843.118>.
- Jemaà, Mohamed, Nathalie Morin, Patricia Cavelier, Julien Cau, Jean Marc Strub, et Claude Delsert. 2014. « Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters ». *Journal of Experimental Biology* 217 (17): 3067-77. <https://doi.org/10.1242/jeb.106575>.
- Jeong, Woo-Geon, et Sang-Man Cho. 2005. « EFFECTS OF POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS ON HEMOCYTE CHARACTERISTICS OF THE PACIFIC OYSTER, CRASSOSTREA GIGAS ». *Journal of Shellfish Research* 24 (2): 451-56. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[451:EOPAHO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[451:EOPAHO]2.0.CO;2).
- Jeschke, Andreas, et Albert Haas. 2018. « Sequential actions of phosphatidylinositol phosphates regulate phagosome-lysosome fusion ». *Molecular Biology of the Cell* 29 (4): 452-65. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-07-0464>.
- Jf, Montes, Durfort M, et García-Valero J. 1996. « When the Venerid Clam *Tapes Decussatus* Is Parasitized by the Protozoan *Perkinsus* Sp. It Synthesizes a Defensive Polypeptide That Is Closely Related to P225 ». *Diseases of Aquatic Organisms* 26 (2): 149-57. <https://doi.org/10.3354/dao026149>.
- Jia, Zhihao, Huan Zhang, Shuai Jiang, Mengqiang Wang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2016. « Comparative Study of Two Single CRD C-Type Lectins, CgCLec-4 and CgCLec-5, from Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 59 (décembre):220-32. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.030>.
- Jia, Zhihao, Tao Zhang, Shuai Jiang, Mengqiang Wang, Qi Cheng, Mingzhe Sun, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2015. « An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity ». *Developmental & Comparative Immunology* 53 (1): 253-64. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.014>.
- Jiang, Chunqi, Mami Tanaka, Sayo Nishikawa, Sayaka Mino, Jesús L. Romalde, Fabiano L. Thompson, Bruno Gomez-Gil, et Tomoo Sawabe. 2021. « *Vibrio* Clade 3.0: New Vibrionaceae Evolutionary Units Using Genome-Based Approach ». *Current Microbiology* 79 (1): 10. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02725-0>.
- Jiang, Shuai, Zhihao Jia, Tao Zhang, Lingling Wang, Limei Qiu, Jinsheng Sun, et Linsheng Song. 2016. « Functional Characterisation of Phagocytes in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *PeerJ* 4 (décembre):e2590. <https://doi.org/10.7717/peerj.2590>.
- Jiang, Shuai, Limei Qiu, Lingling Wang, Zhihao Jia, Zhao Lv, Mengqiang Wang, Conghui Liu, Jiachao Xu, et Linsheng Song. 2018. « Transcriptomic and Quantitative Proteomic Analyses Provide Insights Into the Phagocytic Killing of Hemocytes in the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Frontiers in Immunology* 9 (juin). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01280>.
- Jonathan, M. P., N. P. Muñoz-Sevilla, Andrés Martín Góngora-Gómez, Raquel Gabriela Luna Varela, S. B. Sujitha, D. C. Escobedo-Urías, P. F. Rodríguez-Espinosa, et Lorena Elizabeth Campos Villegas. 2017. « Bioaccumulation of trace metals in farmed pacific oysters *Crassostrea gigas* from SW Gulf of California coast, Mexico ». *Chemosphere* 187 (novembre):311-19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.098>.
- Jørgensen, Louise von Gersdorff, Johan Wedel Nielsen, Mikkel Kehler Villadsen, Bent Vismann, Sussie Dalvin, Heidi Mathiessen, Lone Madsen, Per Walter Kania, et Kurt Buchmann. 2020. « A Non-Lethal Method for Detection of *Bonamia Ostreae* in Flat

- Oyster (*Ostrea Edulis*) Using Environmental DNA ». *Scientific Reports* 10 (1): 16143. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72715-y>.
- Kanaley, Sheila A., et Susan E. Ford. 1990. « Lectin Binding Characteristics of Haemocytes and Parasites in the Oyster, *Crassostrea Virginica*, Infected with *Haplosporidium Nelsoni* (MSX) ». *Parasite Immunology* 12 (6): 633-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1990.tb00993.x>.
- Kang, Daiwu, Gang Liu, Annika Lundström, Eva Gelius, et Håkan Steiner. 1998. « A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17): 10078-82.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2007. « Signaling to NF-KappaB by Toll-like Receptors ». *Trends in Molecular Medicine* 13 (11): 460-69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.
- Kawai, Taro, Moe Ikegawa, Daisuke Ori, et Shizuo Akira. 2024. « Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity ». *Immunity* 57 (4): 649-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.004>.
- Kim, Y. S., J. H. Ryu, S. J. Han, K. H. Choi, K. B. Nam, I. H. Jang, B. Lemaitre, P. T. Brey, et W. J. Lee. 2000. « Gram-Negative Bacteria-Binding Protein, a Pattern Recognition Receptor for Lipopolysaccharide and Beta-1,3-Glucan That Mediates the Signaling for the Induction of Innate Immune Genes in *Drosophila Melanogaster* Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32721-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003934200>.
- Kim, Y.-J., et H. Uyama. 2005. « Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources: Structure, Inhibition Mechanism and Perspective for the Future ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (15): 1707-23. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>.
- King, William L., Cheryl Jenkins, Justin R. Seymour, et Maurizio Labbate. 2019. « Oyster Disease in a Changing Environment: Decrypting the Link between Pathogen, Microbiome and Environment ». *Marine Environmental Research* 143 (janvier):124-40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007>.
- Kiselev, Vladimir Yu, Tallulah S. Andrews, et Martin Hemberg. 2019. « Challenges in Unsupervised Clustering of Single-Cell RNA-Seq Data ». *Nature Reviews Genetics* 20 (5): 273-82. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0088-9>.
- Kobayashi, Toshihide, Ulrich M. Vischer, Corinne Rosnoblet, Cécile Lebrand, Margaret Lindsay, Robert G. Parton, Egbert K. O. Kruithof, et Jean Gruenberg. 2000. « The Tetraspanin CD63/lamp3 Cycles between Endocytic and Secretory Compartments in Human Endothelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (5): 1829-43.
- Koiwai, Keiichiro, Takashi Koyama, Soichiro Tsuda, Atsushi Toyoda, Kiyoshi Kikuchi, Hiroaki Suzuki, et Ryuji Kawano. 2021. « Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process ». Édité par Jiwon Shim et Utpal Banerjee. *eLife* 10 (juin):e66954. <https://doi.org/10.7554/eLife.66954>.
- Kwon, Hyeogsun, Mubasher Mohammed, Oscar Franzén, Johan Ankarklev, et Ryan C Smith. 2021. « Single-Cell Analysis of Mosquito Hemocytes Identifies Signatures of Immune Cell Subtypes and Cell Differentiation ». *ELife* 10 (juillet):e66192. <https://doi.org/10.7554/eLife.66192>.
- Labreuche, Yannick, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Viviane Boulo, Arnaud Huvet, et Jean-Louis Nicolas. 2006a. « Cellular and Molecular Hemocyte Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*, Following Bacterial Infection with *Vibrio*

- Aestuarianus Strain 01/32 ». *Microbes and Infection* 8 (12-13): 2715-24.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>.
- . 2006b. « Cellular and Molecular Hemocyte Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*, Following Bacterial Infection with *Vibrio Aestuarianus* Strain 01/32 ». *Microbes and Infection* 8 (12): 2715-24.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>.
- Labreuche, Yannick, Frédérique Le Roux, Joël Henry, Céline Zatylny, Arnaud Huvet, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Didier Mazel, et Jean-Louis Nicolas. 2010. « *Vibrio Aestuarianus* Zinc Metalloprotease Causes Lethality in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* and Impairs the Host Cellular Immune Defenses ». *Fish & Shellfish Immunology* 29 (5): 753-58. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.007>.
- Labreuche, Yannick, Philippe Soudant, Madeleine Gonçalves, Christophe Lambert, et Jean-Louis Nicolas. 2006. « Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 30 (4): 367-79.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003>.
- Lafont, Maxime, Agnès Vergnes, Jeremie Vidal-Dupiol, Julien de Lorgeril, Yannick Gueguen, Philippe Haffner, Bruno Petton, et al. 2020. « A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* ». *mBio* 11 (2): 10.1128/mbio.02777-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.02777-19>.
- Lambert, Christophe, Philippe Soudant, Gwénaëlle Choquet, et Christine Paillard. 2003a. « Measurement of *Crassostrea Gigas* Hemocyte Oxidative Metabolism by Flow Cytometry and the Inhibiting Capacity of Pathogenic Vibrios ». *Fish & Shellfish Immunology* 15 (3): 225-40. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00160-2).
- . 2003b. « Measurement of *Crassostrea Gigas* Hemocyte Oxidative Metabolism by Flow Cytometry and the Inhibiting Capacity of Pathogenic Vibrios ». *Fish & Shellfish Immunology* 15 (3): 225-40. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00160-2).
- Lambert, Christophe, Philippe Soudant, Marine Jegaden, Maryse Delaporte, Yannick Labreuche, Jeanne Moal, et Jean-François Samain. 2007. « In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes ». *Aquaculture* 270:413-21.
- Lanz-Mendoza, Humberto, et Jorge Contreras-Garduño. 2022. « Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms ». *Developmental & Comparative Immunology* 127 (février):104285. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104285>.
- Lee, W J, J D Lee, V V Kravchenko, R J Ulevitch, et P T Brey. 1996. « Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15): 7888-93.
- Lehotay, Steven J, Jennifer A Harman-Fetcho, et Laura L McConnell. 1998. « Agricultural pesticide residues in oysters and water from two chesapeake bay tributaries ». *Marine Pollution Bulletin* 37 (1): 32-44. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00129-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00129-5).
- Lejeusne, Christophe, Pierre Chevaldonné, Christine Pergent-Martini, Charles F. Boudouresque, et Thierry Pérez. 2010. « Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea ». *Trends in Ecology & Evolution* 25 (4): 250-60. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.009>.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, et J. A. Hoffmann. 1996. « The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spätzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults ». *Cell* 86 (6): 973-83.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5).

- Lenz, Derrick H., Melissa B. Miller, Jun Zhu, Rahul V. Kulkarni, et Bonnie L. Bassler. 2005. « CsrA and Three Redundant Small RNAs Regulate Quorum Sensing in *Vibrio Cholerae* ». *Molecular Microbiology* 58 (4): 1186-1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04902.x>.
- Li, Chunyan, Tao Qu, Baoyu Huang, Peng Ji, Wen Huang, Huayong Que, Li Li, et Guofan Zhang. 2015. « Cloning and characterization of a novel *caspase-8*-like gene in *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 46 (2): 486-92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.035>.
- Li, Huan, Ning Kong, Jiejie Sun, Weilin Wang, Meijia Li, Changhao Gong, Miren Dong, Min Wang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2019. « A C1qDC (CgC1qDC-6) with a collagen-like domain mediates hemocyte phagocytosis and migration in oysters ». *Developmental & Comparative Immunology* 98 (septembre):157-65. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.04.010>.
- Li, Hui, Huan Zhang, Shuai Jiang, Weilin Wang, Lusheng Xin, Hao Wang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2015. « A Single-CRD C-Type Lectin from Oyster *Crassostrea Gigas* Mediates Immune Recognition and Pathogen Elimination with a Potential Role in the Activation of Complement System ». *Fish & Shellfish Immunology* 44 (2): 566-75. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.011>.
- Li, Jun, Yuehuan Zhang, Fan Mao, Yue Lin, Shu Xiao, Zhiming Xiang, Haitao Ma, Yang Zhang, et Ziniu Yu. 2018. « The First Morphologic and Functional Characterization of Hemocytes in Hong Kong Oyster, *Crassostrea Hongkongensis* ». *Fish & Shellfish Immunology* 81 (octobre):423-29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.062>.
- Li, Wenyi, Julien Tailhades, Neil M. O'Brien-Simpson, Frances Separovic, Laszlo Otvos, M. Akhter Hossain, et John D. Wade. 2014. « Proline-Rich Antimicrobial Peptides: Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant Bacteria ». *Amino Acids* 46 (10): 2287-94. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1820-1>.
- Li, Xin, Chenyu Shi, Ben Yang, Qi Li, et Shikai Liu. 2023. « High temperature aggravates mortalities of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with *Vibrio*: A perspective from homeostasis of digestive microbiota and immune response ». *Aquaculture* 568 (avril):739309. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739309>.
- Li, Yiqun, Xiaorui Song, Weilin Wang, Lingling Wang, Qilin Yi, Shuai Jiang, Zhihao Jia, Xinyu Du, Limei Qiu, et Linsheng Song. 2017. « The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus* ». *Developmental & Comparative Immunology* 71 (juin):59-69. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.024>.
- Li, Yongguo, et Qi Li. 2022. « The growth, survival and ploidy of diploid, triploid and tetraploid of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in larval and juvenile stages ». *Aquaculture* 553 (mai):738083. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738083>.
- Li, Zhen, et Leyi Wang. 2017. « Metagenomic 16S rRNA Sequencing Analysis of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Microbiota from the Puget Sound Region in the United States ». *Genome Announcements* 5 (23): 10.1128/genomea.00468-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00468-17>.
- Liggett, L. Alexander, et Vijay G. Sankaran. 2020. « Unraveling Hematopoiesis through the Lens of Genomics ». *Cell* 182 (6): 1384-1400. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.030>.
- Liu, Conghui, Shuai Jiang, Mengqiang Wang, Lingling Wang, Hao Chen, Jiachao Xu, Zhao Lv, et Linsheng Song. 2016. « A Novel Siglec (CgSiglec-1) from the Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) with Broad Recognition Spectrum and Inhibitory Activity to Apoptosis, Phagocytosis and Cytokine Release ». *Developmental and Comparative Immunology* 61 (août):136-44. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.026>.

- Liu, Conghui, Chuanyan Yang, Mengqiang Wang, Shuai Jiang, Qilin Yi, Weilin Wang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2020. « A CD63 Homolog Specially Recruited to the Fungi-Contained Phagosomes Is Involved in the Cellular Immune Response of Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01379>.
- Loken, Michael R., et Leonard A. Herzenberg. 1975. « ANALYSIS OF CELL POPULATIONS WITH A FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 254 (1): 163-71. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29166.x>.
- Loo, Yueh-Ming, et Michael Gale. 2011. « Immune Signaling by RIG-I-like Receptors ». *Immunity* 34 (5): 680-92. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>.
- Lorgeril, Julien de, Aude Lucasson, Bruno Petton, Eve Toulza, Caroline Montagnani, Camille Clerissi, Jeremie Vidal-Dupirol, et al. 2018a. « Immune-Suppression by OsHV-1 Viral Infection Causes Fatal Bacteraemia in Pacific Oysters ». *Nature Communications* 9 (1): 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>.
- . 2018b. « Immune-Suppression by OsHV-1 Viral Infection Causes Fatal Bacteraemia in Pacific Oysters ». *Nature Communications* 9 (1): 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>.
- Lorgeril, Julien de, Bruno Petton, Aude Lucasson, Valérie Perez, Pierre-Louis Stenger, Lionel Dégremont, Caroline Montagnani, et al. 2020. « Differential Basal Expression of Immune Genes Confers *Crassostrea Gigas* Resistance to Pacific Oyster Mortality Syndrome ». *BMC Genomics* 21 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6471-x>.
- Lorgeril, Julien de, Reda Zenagui, Rafael D. Rosa, David Piquemal, et Evelyne Bachère. 2011. « Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea Gigas* by Digital Gene Expression Analysis ». *PLOS ONE* 6 (8): e23142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023142>.
- Loth, Karine, Agnès Vergnes, Cairé Barreto, Sébastien N. Voisin, Hervé Meudal, Jennifer Da Silva, Albert Bressan, et al. 2019. « The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets ». *mBio* 10 (5): e01821-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01821-19>.
- Lucasson, Aude, Xing Luo, Shogofa Mortaza, Julien De Lorgeril, Eve Toulza, Bruno Petton, Jean-Michel Escoubas, et al. 2020. « A core of functionally complementary bacteria colonizes oysters in Pacific Oyster Mortality Syndrome ». <https://doi.org/10.1101/2020.11.16.384644>.
- Luna-Acosta, Andrea, Denis Saulnier, Mylène Pommier, Philippe Haffner, Sophie De Decker, Tristan Renault, et Hélène Thomas-Guyon. 2011. « First Evidence of a Potential Antibacterial Activity Involving a Laccase-Type Enzyme of the Phenoloxidase System in Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* Haemocytes ». *Fish & Shellfish Immunology* 31 (6): 795-800. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.016>.
- Luo, Yali, Aidan T. Pezacki, Carson D. Matier, et Wen-Xiong Wang. 2024. « A novel route of intercellular copper transport and detoxification in oyster hemocytes ». *Journal of Hazardous Materials* 476 (septembre):135003. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135003>.
- Luo, Yali, et Wen-Xiong Wang. 2023. « Increasing Intercellular Communication and Directional Organelle Transfer in Oyster Hemocytes under Copper Stress ». *Environmental Science & Technology Letters* 10 (10): 831-37. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.3c00625>.
- Lv, Zhao, Limei Qiu, Zhihao Jia, Weilin Wang, Zhaoqun Liu, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2019. « The activated β -integrin (Cg β V) enhances RGD-binding and phagocytic

- capabilities of hemocytes in *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 87 (avril):638-49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.047>.
- Lv, Zhao, Limei Qiu, Zhaoqun Liu, Weilin Wang, Hao Chen, Yunke Jia, Zhihao Jia, Shuai Jiang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2018. « Molecular Characterization of a Cathepsin L1 Highly Expressed in Phagocytes of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 89 (décembre):152-62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.014>.
- Lv, Zhao, Lingling Wang, Zhihao Jia, Jiejie Sun, Weilin Wang, Zhaoqun Liu, Limei Qiu, Mengqiang Wang, et Linsheng Song. 2019. « Hemolymph C1qDC promotes the phagocytosis of oyster *Crassostrea gigas* hemocytes by interacting with the membrane receptor β -integrin ». *Developmental & Comparative Immunology* 98 (septembre):42-53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.04.004>.
- Lynch, S. A., A. Villalba, E. Abollo, M. Engelsma, N. A. Stokes, et S. C. Culloty. 2013. « The occurrence of haplosporidian parasites, *Haplosporidium nelsoni* and *Haplosporidium* sp., in oysters in Ireland ». *Journal of Invertebrate Pathology* 112 (3): 208-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.013>.
- Ma, Peijun, Haley M. Amemiya, Lorrie L. He, Shivam J. Gandhi, Robert Nicol, Roby P. Bhattacharyya, Christopher S. Smillie, et Deborah T. Hung. 2023. « Bacterial Droplet-Based Single-Cell RNA-Seq Reveals Antibiotic-Associated Heterogeneous Cellular States ». *Cell* 186 (4): 877-891.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.002>.
- Mandas, Daniela, Fulvio Salati, Marta Polinas, Marina Antonella Sanna, Rosanna Zobba, Giovanni Pietro Burrai, Alberto Alberti, et Elisabetta Antuofermo. 2020. « Histopathological and Molecular Study of Pacific Oyster Tissues Provides Insights into *V. Aestuarianus* Infection Related to Oyster Mortality ». *Pathogens* 9 (6): 492. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060492>.
- Mao, Fan, Huawei Mu, Nai-Kei Wong, Kunna Liu, Jingchen Song, Jianwen Qiu, Yue Lin, et al. 2020. « Hemocyte Phagosomal Proteome Is Dynamically Shaped by Cytoskeleton Remodeling and Interorganellar Communication with Endoplasmic Reticulum during Phagocytosis in a Marine Invertebrate, *Crassostrea Gigas* ». *Scientific Reports* 10 (1): 6577. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63676-3>.
- Marigómez, Ionan, Manu Soto, Miren P. Cajaraville, Eduardo Angulo, et Laure Giamberini. 2002. « Cellular and Subcellular Distribution of Metals in Molluscs ». *Microscopy Research and Technique* 56 (5): 358-92. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>.
- Martenot, Claire, Ophélie Gervais, Bruno Chollet, Maryline Houssin, et Tristan Renault. 2017. « Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis ». *PLoS ONE* 12 (5): e0177448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177448>.
- Martenot, Claire, Elise Oden, Emmanuelle Travaillé, Jean-Paul Malas, et Maryline Houssin. 2011. « Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010 ». *Virus Research* 160 (1): 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.012>.
- Matsumoto, Toshie, Akifumi M. Nakamura, et Keisuke G. Takahashi. 2006. « Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145 (3): 325-30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.003>.
- McCausland, Megan, Yi-Dong Lin, Tania Nevers, Christopher Groves, et Vilma Decman. 2021. « With Great Power Comes Great Responsibility: High-Dimensional Spectral

- Flow Cytometry to Support Clinical Trials ». *Bioanalysis* 13 (21): 1597-1616.
<https://doi.org/10.4155/bio-2021-0201>.
- Meng, Jie, et Wen-Xiong Wang. 2022. « Highly Sensitive and Specific Responses of Oyster Hemocytes to Copper Exposure: Single-Cell Transcriptomic Analysis of Different Cell Populations ». *Environmental Science & Technology* 56 (4): 2497-2510.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07510>.
- Meng, Jie, Guofan Zhang, et Wen-Xiong Wang. 2022. « Functional Heterogeneity of Immune Defenses in Molluscan Oysters *Crassostrea hongkongensis* Revealed by High-Throughput Single-Cell Transcriptome ». *Fish & Shellfish Immunology* 120 (janvier):202-13. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.027>.
- Mercer, M., L. Gennari, et A. Lovatelli. 2024. *Pacific Oyster Farming*. FAO ;
<https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cc9396en>.
- Merle, Nicolas S., Remi Noe, Lise Halbwachs-Mecarelli, Veronique Fremeaux-Bacchi, et Lubka T. Roumenina. 2015. « Complement System Part II: Role in Immunity ». *Frontiers in Immunology* 6 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
- Mesnil, Aurélie, Maude Jacquot, Céline Garcia, Delphine Tourbiez, Lydie Canier, Audrey Bidois, Lionel Dégrement, et al. 2023. « Emergence and Clonal Expansion of *Vibrio aestuarianus* Lineages Pathogenic for Oysters in Europe ». *Molecular Ecology* 32 (11): 2869-83. <https://doi.org/10.1111/mec.16910>.
- Meylan, Etienne, Joseph Curran, Kay Hofmann, Darius Moradpour, Marco Binder, Ralf Bartenschlager, et Jürg Tschopp. 2005. « Cardif Is an Adaptor Protein in the RIG-I Antiviral Pathway and Is Targeted by Hepatitis C Virus ». *Nature* 437 (7062): 1167-72. <https://doi.org/10.1038/nature04193>.
- Miossec, Laurence, Rose-Marie Le Deuff, et Philippe Gouletquer. 2009. « Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific Oyster) ». *ICES Cooperative Research Report* 299 (novembre). <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6945/>.
- Moncada, Reuben, Dalia Barkley, Florian Wagner, Marta Chiodin, Joseph C. Devlin, Maayan Baron, Cristina H. Hajdu, Diane M. Simeone, et Itai Yanai. 2020. « Integrating Microarray-Based Spatial Transcriptomics and Single-Cell RNA-Seq Reveals Tissue Architecture in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas ». *Nature Biotechnology* 38 (3): 333-42. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0392-8>.
- Moné, Yves, Benjamin Gourbal, David Duval, Louis Du Pasquier, Sylvie Kieffer-Jaquinod, et Guillaume Mitta. 2010. « A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4 (9): e813.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000813>.
- Montagnani, C., C. Kappler, J. M. Reichhart, et J. M. Escoubas. 2004. « Cg-Rel, the First Rel/NF-KappaB Homolog Characterized in a Mollusk, the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* ». *FEBS Letters* 561 (1-3): 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00124-3).
- Montagnani, C., Y. Labreuche, et J. M. Escoubas. 2008. « Cg-Ik β , a New Member of the Ik β Protein Family Characterized in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 32 (3): 182-90.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.06.001>.
- Montagnani, Caroline, Benjamin Morga, Beatriz Novoa, Benjamin Gourbal, Amaro Saco, Magali Rey-campos, Marion Bourhis, et al. 2024. « Trained Immunity: Perspectives for Disease Control Strategy in Marine Mollusc Aquaculture ». *Reviews in Aquaculture*, avril. <https://doi.org/10.1111/raq.12906>.

- Montes, J., R. Anadón, et C. Azevedo. 1994. « A Possible Life Cycle for *Bonamia ostreae* on the Basis of Electron Microscopy Studies ». *Journal of Invertebrate Pathology* 63 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1001>.
- Mora, Camilo, Tristan McKenzie, Isabella M. Gaw, Jacqueline M. Dean, Hannah von Hammerstein, Tabatha A. Knudson, Renee O. Setter, et al. 2022. « Over Half of Known Human Pathogenic Diseases Can Be Aggravated by Climate Change ». *Nature Climate Change* 12 (9): 869-75. <https://doi.org/10.1038/s41558-022-01426-1>.
- Moreau, Pierrick, Thierry Burgeot, et Tristan Renault. 2014. « Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) Hemocyte Are Not Affected by a Mixture of Pesticides in Short-Term in Vitro Assays ». *Environmental Science and Pollution Research International* 21 (7): 4940-49. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1931-3>.
- Moreau, Pierrick, Kevin Moreau, Amélie Segarra, Delphine Tourbiez, Marie-Agnès Travers, David C. Rubinsztein, et Tristan Renault. 2015. « Autophagy Plays an Important Role in Protecting Pacific Oysters from OsHV-1 and *Vibrio Aestuarianus* Infections ». *Autophagy* 11 (3): 516-26. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188>.
- Mount, Andrew S., A. P. Wheeler, Rajesh P. Paradkar, et D. Snider. 2004. « Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster ». *Science* 304 (5668): 297-300. <https://doi.org/10.1126/science.1090506>.
- Murphy, Kenneth M., et Casey Weaver. 2017. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. New York : Garland Science. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:002339990>.
- Neokye, Emmanuel Okine, Xiuquan Wang, Krishna K. Thakur, Pedro Quijon, Rana Ali Nawaz, et Sana Basheer. 2024. « Climate change impacts on oyster aquaculture - Part I: Identification of key factors ». *Environmental Research* 251 (juin):118561. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118561>.
- Netea, Mihai G., Andreas Schlitzer, Katarzyna Placek, Leo A. B. Joosten, et Joachim L. Schultze. 2019. « Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens ». *Cell Host & Microbe* 25 (1): 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>.
- Ng, Nicole, et Charles A. Powell. 2021. « Targeting the Complement Cascade in the Pathophysiology of COVID-19 Disease ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (10): 2188. <https://doi.org/10.3390/jcm10102188>.
- Nguyen, Thao V., et Andrea C. Alfaro. 2020. « Applications of omics to investigate responses of bivalve haemocytes to pathogen infections and environmental stress ». *Aquaculture* 518 (mars):734488. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734488>.
- Nüsslein-Volhard, Christiane, et Eric Wieschaus. 1980. « Mutations Affecting Segment Number and Polarity in *Drosophila* ». *Nature* 287 (5785): 795-801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>.
- Oden, E., C. Martenot, M. Berthaux, E. Travaillé, J. P. Malas, et M. Houssin. 2011. « Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities ». *Aquaculture* 317 (1): 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.001>.
- Oikonomopoulou, Katerina, Edimara S Reis, et John D Lambris. 2012. « Complement System and Its Role in Immune Responses ». In *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000508.pub3>.
- Okazaki, Robert K. 1976. « Copper Toxicity in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16 (6): 658-64. <https://doi.org/10.1007/BF01685570>.
- Orr, James C., Victoria J. Fabry, Olivier Aumont, Laurent Bopp, Scott C. Doney, Richard A. Feely, Anand Gnanadesikan, et al. 2005. « Anthropogenic Ocean Acidification over

- the Twenty-First Century and Its Impact on Calcifying Organisms ». *Nature* 437 (7059): 681-86. <https://doi.org/10.1038/nature04095>.
- Oyanedel, Daniel, Arnaud Lagorce, Maxime Bruto, Philippe Haffner, Amandine Morot, Yannick Labreuche, Yann Dorant, et al. 2023. « Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (40): e2305195120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2305195120>.
- Parizadeh, Leila, Delphine Tourbiez, Céline Garcia, Philippe Haffner, Lionel Dégremont, Frédérique Le Roux, et Marie-Agnès Travers. 2018. « Ecologically Realistic Model of Infection for Exploring the Host Damage Caused by *Vibrio Aestuarianus* ». *Environmental Microbiology* 20 (12): 4343-55. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350>.
- Parsons, Brendon, et Edan Foley. 2016. « Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster* ». *Developmental & Comparative Immunology*, Special Issue: Hematopoiesis and Immunity, 58 (mai):95-101. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.019>.
- Pelletier, Camille, Germain Chevignon, Nicole Faury, Isabelle Arzul, Céline Garcia, Bruno Chollet, Tristan Renault, Benjamin Morga, et Maude Jacquot. 2023. « Genetic Differentiation and Host Specialization among OsHV-1 Infecting Two Oyster Species in France ». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.08.23.554398>.
- Petton, Bruno, Delphine Destoumieux-Garzón, Fabrice Pernet, Eve Toulza, Julien de Lorgeril, Lionel Degremont, et Guillaume Mitta. 2021. « The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of Knowledge and Future Directions ». *Frontiers in Immunology* 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>.
- Pichon, Rémi, Silvain Pinaud, Emmanuel Vignal, Cristian Chaparro, Marine Pratlong, Anaïs Portet, David Duval, Richard Galinier, et Benjamin Gourbal. 2022. « Single Cell RNA Sequencing Reveals Hemocyte Heterogeneity in *Biomphalaria Glabrata*: Plasticity over Diversity ». *Frontiers in Immunology* 13:956871. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956871>.
- Picot, Sandy, Nicole Faury, Isabelle Arzul, Bruno Chollet, Tristan Renault, et Benjamin Morga. 2020. « Identification of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, *Crassostrea gigas* ». *Autophagy* 16 (11): 2017-35. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713643>.
- Piel, Damien, Maxime Bruto, Adèle James, Yannick Labreuche, Christophe Lambert, Adrian Janicot, Sabine Chenivresse, et al. 2020. « Selection of *Vibrio Crassostreae* Relies on a Plasmid Expressing a Type 6 Secretion System Cytotoxic for Host Immune Cells ». *Environmental Microbiology* 22 (10): 4198-4211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14776>.
- Pila, E. A., J. T. Sullivan, X. Z. Wu, J. Fang, S. P. Rudko, M. A. Gordy, et P. C. Hanington. 2016. « Haematopoiesis in Molluscs: A Review of Haemocyte Development and Function in Gastropods, Cephalopods and Bivalves ». *Developmental and Comparative Immunology* 58 (mai):119-28. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.11.010>.
- Piovani, Laura, Daniel J. Leite, Luis Alfonso Yañez Guerra, Fraser Simpson, Jacob M. Musser, Irepan Salvador-Martínez, Ferdinand Marlétaz, Gáspár Jékely, et Maximilian J. Telford. 2023. « Single-cell atlases of two lophotrochozoan larvae highlight their complex evolutionary histories ». *Science Advances* 9 (31): eadg6034. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg6034>.
- Poirier, Aurore C., Paulina Schmitt, Rafael D. Rosa, Audrey S. Vanhove, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Tristan P. Rubio, Guillaume M. Charrière, et Delphine Destoumieux-

- Garzón. 2014. « Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity: Evidences in *Crassostrea Gigas* ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (36): 24821-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546>.
- Polinski, Mark, Geoff Lowe, Gary Meyer, Serge Corbeil, Axel Colling, Charles Caraguel, et Cathryn L. Abbott. 2015. « Molecular detection of *Mikrocytos mackini* in Pacific oysters using quantitative PCR ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 200 (1): 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.04.004>.
- Pollard, Thomas Dean, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, et Graham T. Johnson. 2017. *Cell biology*. Elsevier. <https://bibliotheque.utc.fr/Default/doc/SYRACUSE/582128/cell-biology>.
- Ponder, Winston Frank, David R. Lindberg, et Juliet Mary Ponder. 2020. *Biology and Evolution of the Mollusca, Volume 1*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351115667>.
- Qu, Fufa, Zhiming Xiang, Fuxuan Wang, Yang Zhang, Jun Li, Yuehuan Zhang, Shu Xiao, et Ziniu Yu. 2015. « Identification and Function of an Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathways (ECSIT) from *Crassostrea Hongkongensis* ». *Developmental and Comparative Immunology* 53 (1): 244-52. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.015>.
- Qu, Fufa, Zhiming Xiang, Shu Xiao, Fuxuan Wang, Jun Li, Yang Zhang, Yuehuan Zhang, Yanping Qin, et Ziniu Yu. 2017. « c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in immune defense against bacterial infection in *Crassostrea hongkongensis* ». *Developmental & Comparative Immunology* 67 (février):77-85. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.11.011>.
- Qu, Fufa, Zhiming Xiang, Yang Zhang, Jun Li, Shu Xiao, Yuehuan Zhang, Fan Mao, Haitao Ma, et Ziniu Yu. 2016. « A novel p38 MAPK indentified from *Crassostrea hongkongensis* and its involvement in host response to immune challenges ». *Molecular Immunology* 79 (novembre):113-24. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.10.001>.
- Rahman, M. A., S. Henderson, P. Miller-Ezzy, X. X. Li, et J. G. Qin. 2019. « Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katelysia rhytiphora* ». *Fish & Shellfish Immunology* 86 (mars):868-74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.017>.
- Rathinam, R. Bharathi, Arpit Acharya, A. Jancy Robina, Husne Banu, et Gayatri Tripathi. 2024. « The immune system of marine invertebrates: Earliest adaptation of animals ». *Comparative Immunology Reports* 7 (décembre):200163. <https://doi.org/10.1016/j.cirep.2024.200163>.
- Rawson, Ashley, Vijay Saxena, Hongyu Gao, Jenaya Hooks, Xiaoling Xuei, Patrick McGuire, Takashi Hato, David S. Hains, Ryan M. Anderson, et Andrew L. Schwaderer. 2022. « A Pilot Single Cell Analysis of the Zebrafish Embryo Cellular Responses to Uropathogenic Escherichia Coli Infection ». *Pathogens and Immunity* 7 (1): 1. <https://doi.org/10.20411/pai.v7i1.479>.
- Reis, Isis Mayna Martins dos, Marília Nardelli Siebert, Flávia Lucena Zacchi, Jacó Joaquim Mattos, Fabrício Flores-Nunes, Guilherme de Toledo-Silva, Clei Endrigo Piazza, et al. 2020. « Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: Molecular, biochemical and histological approach – Part II ». *Aquatic Toxicology* 226 (septembre):105565. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105565>.
- Rick, Torben C., Leslie A. Reeder-Myers, Courtney A. Hofman, Denise Breitburg, Rowan Lockwood, Gregory Henkes, Lisa Kellogg, et al. 2016. « Millennial-scale

- sustainability of the Chesapeake Bay Native American oyster fishery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (23): 6568-73.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600019113>.
- Riera Romo, Mario. 2021. « Cell death as part of innate immunity: Cause or consequence? » *Immunology* 163 (4): 399-415. <https://doi.org/10.1111/imm.13325>.
- Riera Romo, Mario, Dayana Pérez-Martínez, et Camila Castillo Ferrer. 2016. « Innate Immunity in Vertebrates: An Overview ». *Immunology* 148 (2): 125-39.
<https://doi.org/10.1111/imm.12597>.
- Robinson, J Paul. 2022. « Flow Cytometry: Past and Future ». *BioTechniques* 72 (4): 159-69.
<https://doi.org/10.2144/btn-2022-0005>.
- Romero, A., B. Novoa, et A. Figueras. 2015. « The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update ». *Fish & Shellfish Immunology*, SI: Molluscan Immunity, 46 (1): 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.038>.
- Romestand, B., F. Corbier, et P. Roch. 2002. « Protease Inhibitors and Haemagglutinins Associated with Resistance to the Protozoan Parasite, Perkinsus Marinus, in the Pacific Oyster, Crassostrea Gigas ». *Parasitology* 125 (Pt 4): 323-29.
<https://doi.org/10.1017/s0031182002002135>.
- Rosa, Rafael D., Pascal Alonso, Adrien Santini, Agnès Vergnes, et Evelyne Bachère. 2015. « High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence–absence gene variability (PAV) in the oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 49 (2): 231-38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.12.002>.
- Rosa, Rafael D., Adrien Santini, Julie Fievet, Philippe Bulet, Delphine Destoumieux-Garzón, et Evelyne Bachère. 2011. « Big Defensins, a Diverse Family of Antimicrobial Peptides That Follows Different Patterns of Expression in Hemocytes of the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *PLOS ONE* 6 (9): e25594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025594>.
- Rosales, Carlos, et Eileen Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity ». *BioMed Research International* 2017 (1): 9042851.
<https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- Rosowski, Emily E. 2020. « Determining Macrophage versus Neutrophil Contributions to Innate Immunity Using Larval Zebrafish ». *Disease Models & Mechanisms* 13 (1): dmm041889. <https://doi.org/10.1242/dmm.041889>.
- Rowley, Andrew F., Craig Baker-Austin, Annette S. Boerlage, Coline Caillon, Charlotte E. Davies, Léo Duperret, Samuel A. M. Martin, et al. 2024. « Diseases of marine fish and shellfish in an age of rapid climate change ». *iScience*, août, 110838.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110838>.
- Rubio, Tristan, Daniel Oyanedel, Yannick Labreuche, Eve Toulza, Xing Luo, Maxime Bruto, Cristian Chaparro, et al. 2019a. « Species-Specific Mechanisms of Cytotoxicity toward Immune Cells Determine the Successful Outcome of *Vibrio* Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (28): 14238-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>.
- . 2019b. « Species-Specific Mechanisms of Cytotoxicity toward Immune Cells Determine the Successful Outcome of *Vibrio* Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (28): 14238-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>.
- Ruddell, Craig L. 1971. « The Fine Structure of the Granular Amebocytes of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Journal of Invertebrate Pathology* 18 (2): 269-75.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90155-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90155-8).
- Rustom, Amin, Rainer Saffrich, Ivanka Markovic, Paul Walther, et Hans-Hermann Gerdes. 2004. « Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport ». *Science* 303 (5660): 1007-10. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>.

- Salvi, Daniele, et Paolo Mariottini. 2016. « Molecular Taxonomy in 2D: A Novel ITS2 RRNA Sequence-Structure Approach Guides the Description of the Oysters' Subfamily Saccostreinae and the Genus Magallana (Bivalvia: Ostreidae) ». *Zoological Journal of the Linnean Society* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1111/zoj.12455>.
- . 2021. « Revision shock in Pacific oysters taxonomy: the genus Magallana (formerly Crassostrea in part) is well-founded and necessary ». *Zoological Journal of the Linnean Society* 192 (1): 43-58. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa112>.
- Sasagawa, Yohei, Hiroki Danno, Hitomi Takada, Masashi Ebisawa, Kaori Tanaka, Tetsutaro Hayashi, Akira Kurisaki, et Itoshi Nikaido. 2018. « Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads ». *Genome Biology* 19 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1407-3>.
- Sawabe, Tomoo, Yoshitoshi Ogura, Yuta Matsumura, Gao Feng, AKM Rohul Amin, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, et al. 2013. « Updating the Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of Vibrio tritonius sp. nov. » *Frontiers in Microbiology* 4 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, et M. S. Schlissel. 1992. « V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation ». *Annual Review of Immunology* 10 (Volume 10, 1992): 359-83. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.002043>.
- Schmitt, Paulina, Marylise Duperthuy, Caroline Montagnani, Evelyne Bachère, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2012. « Immune Responses in the Pacific Oyster Crassostrea Gigas : An Overview with Focus on Summer Mortalities ». In , 227-73. Nova Science Publishers, Inc. <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-209414>.
- Schmitt, Paulina, Yannick Gueguen, Erick Desmarais, Evelyne Bachère, et Julien de Lorgeril. 2010. « Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster Crassostrea gigas ». *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-23>.
- Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi, et H. Singh. 1994. « Requirement of Transcription Factor PU.1 in the Development of Multiple Hematopoietic Lineages ». *Science (New York, N.Y.)* 265 (5178): 1573-77. <https://doi.org/10.1126/science.8079170>.
- Segarra, Amélie, Jean François Pépin, Isabelle Arzul, Benjamin Morga, Nicole Faury, et Tristan Renault. 2010. « Detection and Description of a Particular Ostreid Herpesvirus 1 Genotype Associated with Massive Mortality Outbreaks of Pacific Oysters, Crassostrea Gigas, in France in 2008 ». *Virus Research* 153 (1): 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>.
- Seilacher, Adolf. 1985. « Bivalve Morphology and Function ». *Series in Geology, Notes for Short Course* 13 (janvier):88-101. <https://doi.org/10.1017/S0271164800001111>.
- Seo, Jung-Kil, Min Jeong Lee, Bo-Hye Nam, et Nam Gyu Park. 2013. « CgMolluscidin, a Novel Dibasic Residue Repeat Rich Antimicrobial Peptide, Purified from the Gill of the Pacific Oyster, Crassostrea Gigas ». *Fish & Shellfish Immunology* 35 (2): 480-88. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.010>.
- Shapiro, Ehud, Tamir Biezuner, et Sten Linnarsson. 2013. « Single-Cell Sequencing-Based Technologies Will Revolutionize Whole-Organism Science ». *Nature Reviews Genetics* 14 (9): 618-30. <https://doi.org/10.1038/nrg3542>.
- Sigwart, Julia D., et David R. Lindberg. 2015. « Consensus and Confusion in Molluscan Trees: Evaluating Morphological and Molecular Phylogenies ». *Systematic Biology* 64 (3): 384-95. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu105>.
- Simon, A. Katharina, Georg A. Hollander, et Andrew McMichael. 2015. « Evolution of the immune system in humans from infancy to old age ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1821): 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>.

- Sm, Bower, Hervio D, et Meyer Gr. 1997. « Infectivity of Mikrocytos Mackini, the Causative Agent of Denman Island Disease in Pacific Oysters *Crassostrea Gigas*, to Various Species of Oysters ». *Diseases of Aquatic Organisms* 29 (2): 111-16.
<https://doi.org/10.3354/dao029111>.
- Sokolova, I. M. 2009. « Apoptosis in Molluscan Immune Defense ». *Invertebrate Survival Journal* 6 (1): 49-58.
- Song, Xiaorui, Ying Song, Miren Dong, Zhaoqun Liu, Weilin Wang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2019. « A new member of the runt domain family from Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgRunx) potentially involved in immune response and larvae hematopoiesis ». *Fish & Shellfish Immunology* 89 (juin):228-36.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.066>.
- Song, Xiaorui, Hao Wang, Lusheng Xin, Jiachao Xu, Zhihao Jia, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2016. « The immunological capacity in the larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 49 (février):461-69.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.009>.
- Soudant, Philippe, Fu-Lin E. Chu, et Aswani Volety. 2013. « Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species ». *Journal of Invertebrate Pathology* 114 (2): 196-216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>.
- SuJung, Chang, Tseng SuMin, et Chou Hsin Yiu. 2005. « Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of Two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix Lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*). » *Zoological Studies* 44 (1): 144-52.
- Sun, Jie-Jie, Jiang-Feng Lan, Xiu-Zhen Shi, Ming-Chong Yang, Hui-Ting Yang, Xiao-Fan Zhao, et Jin-Xing Wang. 2014. « A Fibrinogen-Related Protein (FREP) Is Involved in the Antibacterial Immunity of *Marsupenaeus Japonicus* ». *Fish & Shellfish Immunology* 39 (2): 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.005>.
- Sun, Jiejie, Yanan Li, Meijia Li, Yu Liu, Chen Qu, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2018. « A novel JNK is involved in immune response by regulating IL expression in oyster *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 79 (août):93-101.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.017>.
- Sun, Jiejie, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2023. « The primitive complement system in molluscs ». *Developmental & Comparative Immunology* 139 (février):104565.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104565>.
- Sun, Jiejie, Lingling Wang, Zhaojun Wu, Shuo Han, Liyan Wang, Meijia Li, Zhaoqun Liu, et Linsheng Song. 2019. « P38 is involved in immune response by regulating inflammatory cytokine expressions in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 91 (février):108-14.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.10.011>.
- Sun, Jiejie, Liyan Wang, Wenwen Yang, Yanan Li, Yingnan Jin, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2021. « A novel C-type lectin activates the complement cascade in the primitive oyster *Crassostrea gigas* ». *The Journal of Biological Chemistry* 297 (6): 101352.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101352>.
- Sun, Ying, Zhi Zhou, Lingling Wang, Chuanyan Yang, Shuai Jianga, et Linsheng Song. 2014. « The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 45 (2): 291-99.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.007>.
- Takada, Yoshikazu, Xiaojing Ye, et Scott Simon. 2007. « The Integrins ». *Genome Biology* 8 (5): 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- Takahashi, Keisuke G., Nakako Izumi-Nakajima, et Katsuyoshi Mori. 2017. « Unique phagocytic properties of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against yeast

- and yeast cell-wall derivatives ». *Fish & Shellfish Immunology* 70 (novembre):575-82. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.027>.
- Takahashi, Keisuke, et Katsuyoshi MORI. 2000. « Functional Profiles of Hemocytes in the bio-defense Process of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* ». *Tohoku J. Agric. Res.* 51 (janvier).
- Tan, Karsoon, Peng Ya, Kianann Tan, Kit-Leong Cheong, et Hanafiah Fazhan. 2023. « Ecological impact of invasive species and pathogens introduced through bivalve aquaculture ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 294 (novembre):108541. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2023.108541>.
- Tanaka, K, T Takasugi, et H Maoka. 1961. « Morphological characteristics of the blood corpuscles of the common oyster, *Gryphea gigas* ». *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1961, 27 édition.
- Tang, Fuchou, Catalin Barbacioru, Yangzhou Wang, Ellen Nordman, Clarence Lee, Nanlan Xu, Xiaohui Wang, et al. 2009. « MRNA-Seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell ». *Nature Methods* 6 (5): 377-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>.
- Tassanakajon, Anchalee, Kunlaya Somboonwiwat, Premruethai Supungul, et Sureerat Tang. 2013. « Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity ». *Fish & Shellfish Immunology*, Innate Immune System of Shrimp, 34 (4): 954-67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>.
- Tattikota, Sudhir Gopal, Bumsik Cho, Yifang Liu, Yanhui Hu, Victor Barrera, Michael J. Steinbaugh, Sang-Ho Yoon, et al. 2020. « A Single-Cell Survey of Drosophila Blood ». *ELife* 9 (mai):e54818. <https://doi.org/10.7554/eLife.54818>.
- Terahara, Kazutaka, et Keisuke G. Takahashi. 2008. « Mechanisms and Immunological Roles of Apoptosis in Molluscs ». *Current Pharmaceutical Design* 14 (2): 131-37. <https://doi.org/10.2174/138161208783378725>.
- Terahara, Kazutaka, Keisuke G. Takahashi, Akifumi Nakamura, Makoto Osada, Masaki Yoda, Takachika Hiroi, Masatomo Hirasawa, et Katsuyoshi Mori. 2006. « Differences in Integrin-Dependent Phagocytosis among Three Hemocyte Subpopulations of the Pacific Oyster “*Crassostrea Gigas*” ». *Developmental and Comparative Immunology* 30 (8): 667-83. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.09.009>.
- Thébault, A., S. Bergman, R. Pouillot, F. Le Roux, et F. C. J. Berthe. 2005. « Validation of in Situ Hybridisation and Histology Assays for the Detection of the Oyster Parasite *Marteilia Refringens* ». *Diseases of Aquatic Organisms* 65 (1): 9-16. <https://doi.org/10.3354/dao065009>.
- Timmins-Schiffman, Emma, William D. Coffey, Wilber Hua, Brook L. Nunn, Gary H. Dickinson, et Steven B. Roberts. 2014. « Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas* ». *BMC Genomics* 15 (1): 951. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-951>.
- Tirape, Ana, Coralie Bacque, Raphael Brizard, Franck Vandembulcke, et Viviane Boulo. 2007. « Expression of Immune-Related Genes in the Oyster *Crassostrea Gigas* during Ontogenesis ». *Developmental & Comparative Immunology* 31 (9): 859-73. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.005>.
- Travers, Marie-Agnès, Katherine Boettcher Miller, Ana Roque, et Carolyn S. Friedman. 2015. « Bacterial diseases in marine bivalves ». *Journal of Invertebrate Pathology, Pathogens and Disease Processes in Marine Molluscs*, 131 (octobre):11-31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>.
- Travers, Marie-Agnès, Delphine Tourbiez, Leïla Parizadeh, Philippe Haffner, Angélique Kozic-Djellouli, Mohamed Aboubaker, Marcel Koken, Lionel Dégremont, et Coralie Lupo. 2017. « Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio*

- aestuarianus infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* ». *Veterinary Research* 48 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0438-1>.
- Tsou, Amy M., Zhi Liu, Tao Cai, et Jun Zhu. 2011. « The VarS/VarA two-component system modulates the activity of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing transcriptional regulator HapR ». *Microbiology* 157 (6): 1620-28. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046235-0>.
- Turley, C. M., J. C. Blackford, S. Widdicombe, D. M. Lowe, P. D. Nightingale, et A. P. Rees. 2006. « Reviewing the Impact of Increased Atmospheric CO₂ on Oceanic pH and the Marine Ecosystem ». *Proceedings of the Avoiding Dangerous Climate Change Symposium*, avril, 65-70.
- Turvey, Stuart E., et David H. Broide. 2010. « Innate immunity ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010 Primer on Allergic and Immunologic Diseases, 125 (2, Supplement 2): S24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>.
- Vallejo, Jenifer, Clément Cochain, Alma Zerneck, et Klaus Ley. 2021. « Heterogeneity of immune cells in human atherosclerosis revealed by scRNA-Seq ». *Cardiovascular Research* 117 (13): 2537-43. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab260>.
- Vandepas, Lauren E., Caroline Stefani, Phillip P. Domeier, Nikki Traylor-Knowles, Frederick W. Goetz, William E. Browne, et Adam Lacy-Hulbert. 2024. « Extracellular DNA Traps in a Ctenophore Demonstrate Immune Cell Behaviors in a Non-Bilaterian ». *Nature Communications* 15 (1): 2990. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46807-6>.
- Vanhove, Audrey S., Tristan P. Rubio, An N. Nguyen, Astrid Lemire, David Roche, Julie Nicod, Agnès Vergnes, et al. 2016. « Copper Homeostasis at the Host *Vibrio* Interface: Lessons from Intracellular *Vibrio* Transcriptomics: Copper Homeostasis at the Host *Vibrio* Interface ». *Environmental Microbiology* 18 (3): 875-88. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13083>.
- Vanhove, Audrey Sophie, Marylise Duperthuy, Guillaume M. Charrière, Frédérique Le Roux, David Goudenège, Benjamin Gourbal, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Yohann Couté, Sun Nyunt Wai, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2015. « Outer Membrane Vesicles Are Vehicles for the Delivery of *Vibrio tasmaniensis* Virulence Factors to Oyster Immune Cells ». *Environmental Microbiology* 17 (4): 1152-65. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12535>.
- Vasta, Gerardo R., Hafiz Ahmed, Satoshi Tasumi, Eric W. Odom, et Keiko Saito. 2007. « Biological Roles of Lectins in Innate Immunity: Molecular and Structural Basis for Diversity in Self/Non-Self Recognition ». In *Current Topics in Innate Immunity*, édité par John D. Lambris, 389-406. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71767-8_27.
- Vezzulli, Luigi, Elisabetta Pezzati, Monica Stauder, Laura Stagnaro, Paola Venier, et Carla Pruzzo. 2015. « Aquatic Ecology of the Oyster Pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus* ». *Environmental Microbiology* 17 (4): 1065-80. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12484>.
- Villalba, Antonio, Kimberly S. Reece, M. Camino Ordás, Sandra M. Casas, et Antonio Figueras. 2004. « Perkinsosis in Molluscs: A Review ». *Aquatic Living Resources* 17 (4): 411-32. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>.
- Villarino, Alejandro V., Yuka Kanno, et John J. O'Shea. 2017. « Mechanisms and Consequences of Jak-STAT Signaling in the Immune System ». *Nature Immunology* 18 (4): 374-84. <https://doi.org/10.1038/ni.3691>.
- Vogeler, Susanne, Tim P. Bean, Brett P. Lyons, et Tamara S. Galloway. 2016. « Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development ». *BMC Developmental Biology* 16 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0129-6>.

- Wagner, Daniel E., et Allon M. Klein. 2020. « Lineage Tracing Meets Single-Cell Omics: Opportunities and Challenges ». *Nature Reviews Genetics* 21 (7): 410-27. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0223-2>.
- Wang, Hebing, Ben Yang, Qi Li, et Shikai Liu. 2024. « Low-dose of formalin-inactivated *Vibrio alginolyticus* protects *Crassostrea gigas* from secondary infection and confers broad-spectrum *Vibrio* resistance on offspring ». *Developmental & Comparative Immunology* 152 (mars):105122. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.105122>.
- Wang, Lingling, Xiaorui Song, et Linsheng Song. 2018. « The Oyster Immunity ». *Developmental and Comparative Immunology* 80 (mars):99-118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025>.
- Wang, Lingling, Huan Zhang, Leilei Wang, Daoxiang Zhang, Zhao Lv, Zhaoqun Liu, Weilin Wang, et al. 2017. « The RNA-seq analysis suggests a potential multi-component complement system in oyster *Crassostrea gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 76 (novembre):209-19. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.06.009>.
- Wang, Qing, Ruiwen Cao, Xuanxuan Ning, Liping You, Changkao Mu, Chunlin Wang, Lei Wei, Ming Cong, Huifeng Wu, et Jianmin Zhao. 2016. « Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 49 (février):24-33. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.025>.
- Wang, Weilin, Meijia Li, Lingling Wang, Hao Chen, Zhaoqun Liu, Zhihao Jia, Limei Qiu, et Linsheng Song. 2017a. « The Granulocytes Are the Main Immunocompetent Hemocytes in *Crassostrea Gigas* ». *Developmental and Comparative Immunology* 67 (février):221-28. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>.
- . 2017b. « The Granulocytes Are the Main Immunocompetent Hemocytes in *Crassostrea Gigas* ». *Developmental & Comparative Immunology* 67 (février):221-28. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>.
- Wang, Weilin, Rui Liu, Tao Zhang, Ran Zhang, Xuan Song, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2015. « A novel phagocytic receptor (CgNimC) from Pacific oyster *Crassostrea gigas* with lipopolysaccharide and gram-negative bacteria binding activity ». *Fish & Shellfish Immunology* 43 (1): 103-10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.019>.
- Wang, Xiudan, Changmei Li, Zhihao Jia, Tongxiao Xu, Yilin Wang, Mingzhu Sun, Shuhui Han, Xia Wang, et Limei Qiu. 2021. « Regulation of apoptosis by Pacific oyster *Crassostrea gigas* reveals acclimation strategy to CO₂ driven acidification ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 217 (juillet):112235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112235>.
- Wei, Ping, Wenwen Yang, Wei Wang, Yinan Li, Xiaoxue Yan, Wei Wu, Sicong Wang, Jiejie Sun, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2023. « A MASP-like functions as PRR to regulate the mRNA expressions of inflammatory factors in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 138 (juillet):108829. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108829>.
- Xu, Liang-Guo, Yan-Yi Wang, Ke-Jun Han, Lian-Yun Li, Zhonghe Zhai, et Hong-Bing Shu. 2005. « VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN-Beta Signaling ». *Molecular Cell* 19 (6): 727-40. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.014>.
- Yamaura, Kunihiro, Keisuke G. Takahashi, et Tohru Suzuki. 2008. « Identification and Tissue Expression Analysis of C-Type Lectin and Galectin in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149 (1): 168-75. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.09.004>.
- Yang, C. -Y., M. T. Sierp, C. A. Abbott, Yan Li, et J. G. Qin. 2016. « Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas* ». *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 201 (novembre):22-29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.024>.
- Yang, Wenwen, Xiaoqian Lv, Jinyuan Leng, Yinan Li, Jiejie Sun, Chuanyan Yang, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2021. « A fibrinogen-related protein mediates the recognition of various bacteria and haemocyte phagocytosis in oyster *Crassostrea gigas* ». *Fish & Shellfish Immunology* 114 (juillet):161-70. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.022>.
- Yoneyama, Mitsutoshi, Mika Kikuchi, Takashi Natsukawa, Noriaki Shinobu, Tadaatsu Imaizumi, Makoto Miyagishi, Kazunari Taira, Shizuo Akira, et Takashi Fujita. 2004. « The RNA Helicase RIG-I Has an Essential Function in Double-Stranded RNA-Induced Innate Antiviral Responses ». *Nature Immunology* 5 (7): 730-37. <https://doi.org/10.1038/ni1087>.
- Zaczek-Moczydłowska, Maja A., Letitia Mohamed-Smith, Anna Toldrà, Chantelle Hooper, Mònica Campàs, M. Dolors Furones, Tim P. Bean, et Katrina Campbell. 2020. « A Single-Tube HNB-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Robust Detection of the Ostreid Herpesvirus 1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18): 6605. <https://doi.org/10.3390/ijms21186605>.
- Zamora-Ledezma, Camilo, Daniela Negrete-Bolagay, Freddy Figueroa, Ezequiel Zamora-Ledezma, Ming Ni, Frank Alexis, et Victor H. Guerrero. 2021. « Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods ». *Environmental Technology & Innovation* 22 (mai):101504. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>.
- Zanette, Juliano, Eduardo Alves de Almeida, Angela Zaccaron da Silva, João Guzenski, Jaime Fernando Ferreira, Paolo Di Mascio, Maria Risoleta Freire Marques, et Afonso Celso Dias Bairy. 2011. « Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil ». *Science of The Total Environment* 409 (10): 1976-83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.048>.
- Zaroogian, G., et P. Yevich. 1993. « Cytology and Biochemistry of Brown Cells in *Crassostrea Virginica* Collected at Clean and Contaminated Stations ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 79 (2): 191-97. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90069-z](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90069-z).
- Zhang, Guofan, Xiaodong Fang, Ximing Guo, Li Li, Ruibang Luo, Fei Xu, Pengcheng Yang, et al. 2012. « The Oyster Genome Reveals Stress Adaptation and Complexity of Shell Formation ». *Nature* 490 (7418): 49-54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>.
- Zhang, Linlin, Li Li, Ximing Guo, Gary W. Litman, Larry J. Dishaw, et Guofan Zhang. 2015. « Massive Expansion and Functional Divergence of Innate Immune Genes in a Protostome ». *Scientific Reports* 5 (1): 8693. <https://doi.org/10.1038/srep08693>.
- Zhang, Linlin, Li Li, et Guofan Zhang. 2011a. « A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates ». *Fish & Shellfish Immunology* 30 (2): 653-60. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.023>.
- . 2011b. « Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system ». *Developmental & Comparative Immunology* 35 (5): 603-10. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.005>.
- Zhang, LinLin, Li Li, et GuoFan Zhang. 2012. « Sequence Variability of Fibrinogen-Related Proteins (FREPs) in *Crassostrea Gigas* ». *Chinese Science Bulletin* 57 (25): 3312-19. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5155-6>.
- Zhang, Ran, Rui Liu, Lusheng Xin, Hao Chen, Chenghua Li, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2016. « A CgIFNLP receptor from *Crassostrea gigas* and its activation of the related genes in human JAK/STAT signaling pathway ». *Developmental &*

- Comparative Immunology* 65 (décembre):98-106.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.010>.
- Zhang, Tao, Limei Qiu, Zhibin Sun, Lingling Wang, Zhi Zhou, Rui Liu, Feng Yue, Rui Sun, et Linsheng Song. 2014. « The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus* ». *Developmental & Comparative Immunology* 45 (1): 141-50.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015>.
- Zhao, Xuelin, Hong Yu, Lingfeng Kong, et Qi Li. 2012. « Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* ». *PLOS ONE* 7 (9): e46244.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046244>.
- Zheng, Grace X. Y., Jessica M. Terry, Phillip Belgrader, Paul Ryvkin, Zachary W. Bent, Ryan Wilson, Solongo B. Ziraldo, et al. 2017. « Massively Parallel Digital Transcriptional Profiling of Single Cells ». *Nature Communications* 8 (1): 14049.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14049>.
- Zhong, Yifei, Anna Kinio, et Maya Saleh. 2013. « Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases ». *Frontiers in Immunology* 4 (octobre).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333>.
- Zhou, Yaru, Hong Yu, Qi Li, Lingfeng Kong, Shikai Liu, et Chengxun Xu. 2024. « Characterization of PiRNAs in Diploid and Triploid Pacific Oyster Gonads: Exploring Their Potential Roles in Triploid Sterility ». *Marine Biotechnology*, juillet.
<https://doi.org/10.1007/s10126-024-10351-7>.
- Zhu, Xiaofei, Kang Mu, Yi Wan, et Linlin Zhang. 2022. « Evolutionary history of the *NLR* gene families across lophotrochozoans ». *Gene* 843 (novembre):146807.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146807>.
- Ziegenhain, Christoph, Beate Vieth, Swati Parekh, Björn Reinius, Amy Guillaumet-Adkins, Martha Smets, Heinrich Leonhardt, Holger Heyn, Ines Hellmann, et Wolfgang Enard. 2017. « Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods ». *Molecular Cell* 65 (4): 631-643.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>.
- Zong, Yanan, Zhaoqun Liu, Zhaojun Wu, Zirong Han, Lingling Wang, et Linsheng Song. 2019. « A novel globular C1q domain containing protein (C1qDC-7) from *Crassostrea gigas* acts as pattern recognition receptor with broad recognition spectrum ». *Fish & Shellfish Immunology* 84 (janvier):920-26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.079>.

Résumé

L'huître du Pacifique, *Crassostrea (Magallana) gigas*, est un mollusque bivalve d'une importance écologique et économique majeure, et constitue désormais une espèce modèle émergente dans l'étude de l'immunité innée des bivalves. Ces dernières années, les élevages d'huîtres ont été confrontés à des épisodes de mortalités massives, exacerbés par le changement climatique et les activités anthropiques. Ces mortalités, bien que multifactorielles, partagent un point commun : la capacité des pathogènes (virus et bactéries) à échapper aux défenses immunitaires des huîtres, entraînant des septicémies souvent fatales. Alors que chez les vertébrés, et particulièrement l'Homme, les cellules immunitaires sont bien caractérisées, la diversité et la spécialisation fonctionnelle des hémocytes chez *C. gigas* restent encore une boîte noire âprement débattue au sein de la communauté scientifique. Ce manque de connaissances entrave la compréhension des interactions hôte-pathogènes, limitant ainsi le développement de stratégies pour réduire les mortalités en ostréiculture. Dans ce contexte, l'objectif principal de mon projet de thèse a été de caractériser les types hémocytaires circulants de *C. gigas*, en utilisant des approches cytologiques, fonctionnelles et de transcriptomique sur cellules uniques (scRNA-Seq). Ces méthodes ont permis dans un premier temps d'identifier sept types hémocytaires distincts constitutifs chez les animaux naïfs. Ces populations hémocytaires ont été caractérisées par leurs propriétés morphologiques, leurs profils d'expression génique et leurs fonctions biologiques spécifiques. De plus, nous avons établi une ontologie des hémocytes, suggérant des voies potentielles de différenciation des lignages cellulaires. Grâce à cet atlas hémocytaire, nous avons alors pu évaluer l'impact différentiel d'une infection par *Vibrio aestuarianus* sur les populations hémocytaires, à la fois du point de vue cytologique et transcriptomique, révélant des altérations dépendantes de la charge bactérienne circulante. Ces travaux apportent une contribution significative à la compréhension de l'immunité chez *C. gigas*, en permettant une définition précise des types hémocytaires. Nos résultats proposent un atlas hémocytaire de référence et soulignent l'importance de l'étude de l'homéostasie hémocytaire des mollusques pour mieux comprendre et anticiper les crises ostréicoles lors d'épisodes de mortalité.

Abstract

The Pacific oyster, *Crassostrea (Magallana) gigas*, is a bivalve mollusk of significant ecological and economic importance, and it has recently emerged as a model species for studying the innate immunity of bivalves. In recent years, oyster farming has been confronted with episodes of massive mortality, exacerbated by climate change and human activities. These mortalities, though multifactorial, share a common factor: the ability of pathogens (viruses and bacteria) to evade the oysters' immune defenses, often leading to fatal septicemia. While immune cells in vertebrates, particularly humans, are well characterized, the diversity and functional specialization of hemocytes in *C. gigas* remain a black box and are hotly debated within the scientific community. This knowledge gap hampers our understanding of host-pathogen interactions, thus limiting the development of strategies to reduce oyster mortality in aquaculture. In this context, the main objective of my thesis project was to characterize the circulating hemocyte types in *C. gigas* using cytological, functional, and single-cell transcriptomic approaches (scRNA-seq). These methods first allowed us to identify seven distinct constitutive hemocyte types in naïve animals. These hemocyte populations were characterized based on their morphological properties, gene expression profiles, and specific biological functions. Furthermore, we established a hemocyte ontology, suggesting potential differentiation pathways for the cell lineages. Using this hemocyte atlas, we then assessed the differential impact of *Vibrio aestuarianus* infection on hemocyte populations, both from a cytological and transcriptomic perspective, revealing alterations dependent on the circulating bacterial load. This work provides a significant contribution to the understanding of immunity in *C. gigas*, by offering a precise definition of hemocyte types. Our results propose a reference hemocyte atlas and emphasize the importance of studying hemocyte homeostasis in mollusks to better understand and anticipate oyster mortality crises during epizootic episodes.