



HAL
open science

Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture : caractérisation et modulation des communautés bactériennes

Garance Leroy

► To cite this version:

Garance Leroy. Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture : caractérisation et modulation des communautés bactériennes. Biotechnologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2024. Français. ⟨NNT : 2024BRES0067⟩. ⟨tel-05558752⟩

HAL Id: tel-05558752

<https://theses.hal.science/tel-05558752v1>

Submitted on 19 Mar 2026

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du Littoral
Spécialité : *Biotechnologies*

Par

Garance LEROY

Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture : caractérisation et modulation des communautés bactériennes

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 22 novembre 2024
Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EMR6076

Rapporteurs avant soutenance :

Céline COSSEAU Professeure des universités, Université de Perpignan Via Domitia
Sophie SABLÉ Maître de conférences, Université de La Rochelle

Composition du Jury :

Présidente : Gwenaëlle LE BLAY Professeure des universités, Université de Bretagne Occidentale
Examineurs : Julien VERDON Maître de conférences, Université de Poitiers
Céline COSSEAU Professeure des universités, Université de Perpignan Via Domitia
Sophie SABLÉ Maître de conférences, Université de La Rochelle

Dir. de thèse : Yannick FLEURY Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale
Co-Encadrant : Camille JÉGOU Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Invités

Co-Encadrante : Sandrine BARON Chargée de recherche, ANSES
Co-Encadrante : Lucie BEAULIEU Professeure des universités, Université de Laval

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Céline Cosseau et Sophie Sablé d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapportrices, et à Julien Verdon et Gwenaëlle Le Blay de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie également chaleureusement Laure Bellec et Yannick Gueguen pour avoir participé à mon CSI. Nos échanges m'auront beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont ensuite à mes encadrants, qui ont rendu possible la réalisation de ce travail. Merci pour toutes nos discussions et le temps que vous avez pu me dédier : vos conseils, corrections, remarques m'auront énormément aidé à avancer et progresser. Je remercie mon directeur de thèse Yannick Fleury, pour les heures passées à revoir mes présentations et mes travaux. Tu as toujours été exigeant, notamment concernant la manière d'amener les concepts que l'on voulait aborder et la discussion des résultats obtenus. J'ai beaucoup appris grâce à toi, merci ! Puis, je remercie Lucie Beaulieu pour mon séjour canadien inoubliable : merci de m'avoir fait découvrir un autre fonctionnement, et pour nos nombreuses discussions concernant mes travaux mais également ton métier, que j'ai beaucoup appréciées. J'ai adoré faire partie de ton équipe pendant ces quelques mois. Je ne peux bien entendu pas oublier Sandrine Baron, dont la bonne humeur a été indispensable pendant ces trois années. Sandrine, merci pour la confiance que tu m'as accordée dès ma première venue dans ton laboratoire, confiance qui m'a portée et a fait de moi la (presque) chercheuse que je suis aujourd'hui. Enfin, je remercie Camille Jégou d'avoir été mon pilier durant cette thèse. Tu m'as énormément appris, scientifiquement, humainement et toujours avec beaucoup de pédagogie. Je sais la chance que j'ai d'avoir pu te compter dans mon encadrement, merci.

Je dois changer de paragraphe pour quelqu'un qui n'est pas mon encadrant mais qui se reconnaîtra : Clément Offret. Merci Clément pour ton implication dans mon sujet et pour toutes les connaissances que tu as pu m'apporter. Cette thèse n'aurait pas été la même sans tes indications et conseils. Merci.

Au LBCM, je pense ensuite à Patrick, qui m'a permis d'entrer pour la première fois au laboratoire en M2 et qui a rendu possible tout le reste de cette histoire... Merci et surtout, ne change rien. Merci aussi à Benj, pour ton aide en biologie moléculaire mais aussi pour toutes

les discussions que l'on a eues et pour ton soutien. Je tiens à remercier Alexis et Sophie pour leur participation au projet et pour leur aide technique. Merci à Laure pour m'avoir permis de faire des analyses en spectrométrie et pour ton aide et ta bonne humeur : j'ai beaucoup apprécié ces moments passés avec toi. Je pense également à toutes les personnes qui sont passées par le LBCM et avec qui j'ai eu la chance de travailler : Leila, Baptiste, Laura, Grégoire, Laurianne et Louise. Je remercie tout particulièrement Fany pour les moments passés ensemble et son amitié. Merci d'avoir participé à l'entraide et la bonne ambiance qui a régné au laboratoire et qui m'auront beaucoup aidé à avancer. Je vous remercie surtout pour ce que vous avez apporté au projet, que ce soit votre participation aux expériences ou votre aide sur le traitement des données : merci !

Et puis, du LBCM, il y a des collègues qui sont devenus des amis. Mes premières pensées vont à Héléna, toi qui sais toujours quoi me dire. Tu as été formidable durant ces trois ans et je suis ravie d'avoir pu apprendre et échanger avec toi. Et puis Fanny, ma colocataire de bureau : tu m'as vue dans tous mes états et tu as toujours su me faire rire. Travailler à tes côtés va beaucoup me manquer, merci d'avoir été là. Et enfin, je l'entends déjà me dire « Garance » en insistant bien sur le « r » ... oui c'est bien toi Claire. Ensemble, on a traversé nos thèses et je suis heureuse que ça ait été avec toi. Merci pour ton amitié qui m'est très chère.

De mon séjour au Canada, mes premiers remerciements vont à Diane et Françoise, qui m'ont permis de réaliser mes expériences et qui ont toujours été là pour m'aider en cas de problème. Merci pour votre accueil et pour votre travail, j'ai adoré passer du temps avec vous. Merci à Bétina pour son amitié et le temps passé à m'aider pour mes expériences. Merci à Samuel et Pamela pour leur disponibilité. Merci à toute l'équipe ! Enfin, Doriane, je suis très heureuse d'avoir pu te connaître et de partager tant de choses avec toi, merci.

À l'ANSES, je dois mon accueil et tout ce que j'ai appris au laboratoire à Laëtitia, qui a été formidable. Merci pour ta patience et ton aide technique, j'ai toujours été impressionnée par ton efficacité. Je pense aussi à Gwen pour tous les moments passés ensemble et ta franchise rafraichissante, on peut dire qu'on s'est bien entendues là-dessus. Merci à vous. Je remercie également Éric pour son aide concernant les questions que j'ai pu avoir durant la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier Ricardo, Martin et Corentin du CRC pour leur aide précieuse et pour avoir pris soin des huîtres tout au long de l'expérimentation. Merci à vous !

Je remercie tous les collègues du bâtiment G pour vos encouragements et votre compagnie. Mes pensées vont particulièrement à Clément T., Loïc, Olivier, Barbara et Roua, merci pour tout ce que l'on a partagé durant ces trois années et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Je ne peux oublier le duo Noémie et Alexandra ! Kevin, je te remercie pour ta présence et ton soutien sur cette fin de thèse. Je suis très heureuse de te connaître.

Juste à côté, à l'IUT, je ne peux oublier Denis et Stéphanie, qui m'ont aidé à préparer les TPs ; c'était une superbe expérience. Denis, je te remercie pour toutes les discussions engagées qu'on a pu partager. Je pense aussi à Laure et Valérie, vous qui avez toujours pris des nouvelles et qui m'avez toujours encouragé. Enfin, merci à Charlotte et Sophie pour votre aide technique et votre gentillesse.

Vous avez été nombreux à croiser ma route pendant cette thèse et vous avez tous participé à son bon déroulement. Merci à vous.

Je tiens à remercier sur une note plus personnelle les personnes qui m'accompagnent et me soutiennent au quotidien. Merci à mes amis Marina, Mathilde, Clara, Gautier, Astrid, Romain, Cécile, Emma, Léo, Andrea et Macéo. Merci à mon acolyte Agathe, je pense que personne ne me connaît mieux que toi et je suis heureuse d'avoir fait cette thèse à tes côtés. Merci pour tous ces moments passés ensemble. Je remercie également Thomas pour sa gentillesse, sa patience et son soutien à toute épreuve.

Merci à ma famille pour tout ce que l'on partage : Chantal et Michel, Loïc et Caroline, sans oublier Arthur et Martin. Je remercie mes tantes Françoise et Sylvie, que j'adore. Mes derniers remerciements vont à mon grand-père, Daniel ainsi qu'à mon frère, Octave et ma mère, Christine. Daniel, merci d'être aussi formidable et de m'avoir transmis ta curiosité et ton envie d'apprendre ; tu m'impressionneras toujours. Merci Octave d'être un frère extraordinaire. Maman, merci pour tout ce que tu as fait pour nous et d'avoir cru en moi. Si j'ai pu arriver jusqu'ici, c'est bien grâce à toi. Les mots me manquent pour mesurer ma gratitude. De tout cœur, merci.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	7
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
1. L'AQUACULTURE : CONTEXTE ET PROBLEMATIQUES	15
1.1. <i>Production aquacole mondiale et épisodes infectieux</i>	15
1.2. <i>Le cas de la filière ostréicole en France</i>	16
1.3. <i>Pathogènes des huîtres</i>	17
1.4. <i>Usage d'antibiotiques</i>	19
2. L'HOLOBIONTE	22
3. PROBIOTIQUES : PERIMETRE D'ACTION ET REGLEMENTATIONS	23
3.1. <i>Incidences des probiotiques en élevages aquacoles</i>	24
3.2. <i>Réglementation européenne sur l'usage de probiotiques</i>	26
4. PROBIOTIQUES ET COMMUNAUTES BACTERIENNES.....	27
4.1. <i>Incidences sur les communautés microbiennes de l'environnement</i>	27
4.2. <i>Effets sur le microbiote bactérien des huîtres</i>	28
5. LE MICROBIOTE BACTERIEN CHEZ L'HUITRE	29
5.1. <i>Physiologie et facteurs abiotiques</i>	29
5.2. <i>Acquisition du microbiote : transmissions horizontales et verticales</i>	30
5.3. <i>Déséquilibres du microbiote bactérien</i>	32
6. INVESTIGATION DE SOUCHES DE <i>PSEUDOALTEROMONAS</i> PRODUCTRICES D'ALTERINES COMME PROBIOTIQUE EN OSTREICULTURE	32
CHAPITRE 1 - CARACTÉRISATION DES SOUCHES DU GENRE <i>PSEUDOALTEROMONAS</i> COMME POTENTIELS PROBIOTIQUES : ÉTUDES <i>IN SILICO</i> ET <i>IN VITRO</i>	35
1. INTRODUCTION	35
1.1. <i>Criblage de candidats probiotiques</i>	35
1.2. <i>Bactéries d'intérêt du genre <i>Pseudoalteromonas</i></i>	36
1.3. <i>Les altérines, famille de cyclolipopeptides antimicrobiens</i>	37
1.4. <i>Les polymyxines</i>	38
<i>Caractérisation des souches de <i>Pseudoalteromonas</i> comme potentiels probiotiques</i>	41
2. MATERIEL ET METHODES	41
2.1. <i>Analyse des génomes des souches de <i>Pseudoalteromonas</i></i>	41
2.2. <i>Antibiogrammes</i>	43
2.3. <i>Purification des altérines</i>	43

2.4.	<i>Spectre d'activité antibactérienne des altérines</i>	46
3.	RESULTATS	48
3.1.	<i>Analyse des génomes</i>	48
3.2.	<i>Résistance aux antibiotiques : analyses in silico et in vitro</i>	49
3.3.	<i>Recherche de facteurs de virulence</i>	52
3.4.	<i>Purification des isoformes d'altérines</i>	54
3.5.	<i>Concentrations Minimales Inhibitrices des altérines</i>	56
4.	DISCUSSION	60
4.1.	<i>Virulence et résistance aux antibiotiques chez les souches de Pseudoalteromonas</i>	60
4.2.	<i>Résistome, virulome et activité antibactérienne : similarités entre les souches de Pseudoalteromonas</i>	61
4.3.	<i>L'hydrophobicité des altérines impacte leur activité antibactérienne</i>	62
4.4.	<i>Éléments sur le mode d'action des altérines et la sensibilité des souches d'Aeromonas</i>	63
5.	CONCLUSION	64

CHAPITRE 2 – APPLICATION DES SOUCHES DE PSEUDOALTEROMONAS EN ÉLEVAGE DE L'HUÎTRE PLATE OSTREA EDULIS.....65

1.	INTRODUCTION	65
1.1.	<i>L'huître plate : anatomie et cycle de reproduction</i>	65
1.2.	<i>Élevages de l'huître plate Ostrea edulis</i>	67
1.3.	<i>Étude du microbiote : le séquençage nouvelle génération</i>	67
1.4.	<i>Étude de l'effet de probiotiques sur le microbiote en ostréiculture</i>	68
	<i>Application des souches de Pseudoalteromonas en élevage de l'huître plate Ostrea edulis</i>	70
2.	MATERIEL & METHODES	71
2.1.	<i>Caractéristiques des souches de Pseudoalteromonas</i>	71
2.2.	<i>Préparation des suspensions des souches de Pseudoalteromonas</i>	71
2.3.	<i>Maturation des huîtres plates Ostrea edulis</i>	71
2.4.	<i>Plan expérimental</i>	72
2.5.	<i>Échantillonnage</i>	72
2.6.	<i>Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)</i>	73
2.7.	<i>Analyses metabarcoding</i>	74
3.	RESULTATS	76
3.1.	<i>Séquençage et pipeline SAMBA</i>	76
3.2.	<i>Communautés bactériennes associées à l'huître plate et son environnement</i>	77
3.3.	<i>Incidence des souches de Pseudoalteromonas sur les communautés bactériennes en élevage de l'huître plate Ostrea edulis</i>	80
3.4.	<i>Effets de l'exposition aux souches de Pseudoalteromonas sur les huîtres plates et les biofilms</i>	84

4.	DISCUSSION	87
4.1.	<i>Description des communautés bactériennes associées à l'élevage de l'huître plate.....</i>	87
4.2.	<i>Incidence des souches de Pseudoalteromonas sur l'élevage de l'huître plate Ostrea edulis</i>	90
5.	CONCLUSION	92
CHAPITRE 3 – DEVENIR DES SOUCHES DU GENRE PSEUDOALTEROMONAS ET DES ALTÉRINES DANS UN SYSTÈME <i>IN VITRO</i> SIMULANT LA DIGESTION CHEZ L'HUMAIN		93
1.	INTRODUCTION	93
1.1.	<i>Simulation de la digestion humaine : modèles in vitro</i>	94
1.2.	<i>Digestibilité in vitro de souches probiotiques.....</i>	96
1.3.	<i>Digestibilité in vitro de peptides antimicrobiens.....</i>	97
	<i>Devenir des souches de Pseudoalteromonas et des altérines dans un système digestif in vitro</i>	102
2.	MATERIEL ET METHODES	102
2.1.	<i>Purification des altérines.....</i>	102
2.2.	<i>Protocole INFOGEST : digestion statique.....</i>	102
2.3.	<i>Digestion dynamique : utilisation du TIM-1, modèle in vitro.....</i>	105
2.4.	<i>Digestion des souches du genre Pseudoalteromonas : analyses (INFOGEST).....</i>	107
2.5.	<i>Digestion des altérines : analyses (INFOGEST et TIM-1).....</i>	108
3.	RESULTATS	111
3.1.	<i>Digestion des souches de Pseudoalteromonas : dénombrement des bactéries viables</i>	111
3.2.	<i>Suivi de la dégradation des altérines</i>	112
4.	DISCUSSION	115
4.1.	<i>Une inactivation rapide des souches de Pseudoalteromonas</i>	115
4.2.	<i>Dégradation des altérines dans l'intestin grêle</i>	116
4.3.	<i>Une activité antibactérienne conservée : effets potentiels et applications</i>	117
5.	CONCLUSION	118
CONCLUSION & PERSPECTIVES		119
COMMUNICATIONS		125
RÉFÉRENCES.....		127
ARTICLE EN PRÉPARATION		157
ANNEXES CHAPITRE 1.....		183
ANNEXES CHAPITRE 2.....		187
ANNEXES CHAPITRE 3.....		189

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Production ostréicole française (tonnes - poids vif) de 1950 à 2022.	16
Figure 2. La théorie de l'hologénome illustrée, adaptée de Theis et al., 2016.....	23
Figure 3. Structure des altérines d'après Offret et al., 2022.	37
Figure 4. Structures d'un isoforme de la famille des altérines et de la polymyxine B ₁	39
Figure 5. Structure schématique du LPS des bactéries à Gram négatif, adapté de Lin et al., 2020.....	40
Figure 6. Représentations circulaires du chromosome et des deux plasmides assemblés de la souche <i>Pseudoalteromonas rhizosphaerae</i> hCg-42.....	48
Figure 7. Chromatogramme obtenu par HPLC en phase inverse à une longueur d'onde de 220 nm..	55
Figure 8. Concentrations Minimales Inhibitrices (µg/mL) des altérines produites par les souches de <i>Pseudoalteromonas</i> et un témoin positif (Polymyxine B) contre différentes bactéries cibles.....	57
Figure 9. Concentrations Minimales Inhibitrices (µg/mL) de 5 isoformes d'altérines (ALT-952, ALT-954, ALT-970, ALT-980, ALT-984) ainsi que de deux polymyxines (polymyxine B et colistine) contre différentes bactéries cibles pathogènes.....	58
Figure 10. Concentrations Minimales Inhibitrices (µg/mL) d'isoformes d'altérines et de deux polymyxines (polymyxine B et la colistine) contre des souches de l'espèce <i>Aeromonas salmonicida</i>	59
Figure 11. Cycle de reproduction de l'huître plate <i>O. edulis</i> , tiré de NORA, 2024 et adapté de Fitzsimons et al., 2019.	66
Figure 12. Schéma récapitulatif du dispositif expérimental et de l'échantillonnage réalisé au centre technique du CRC Bretagne Nord.	72
Figure 13. Courbe de raréfaction des échantillons de biofilm (n =100, vert), d'hémolymphe (n =160, jaune) et d'eau de mer (n=20, bleu) utilisés pour l'étude.	76
Figure 14. Mesures d'α-diversité pour les échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer pour la condition contrôle.	77
Figure 15. Abondance relative (%) des ASVs majoritaires au sein des échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer de la condition contrôle au cours des 4 mois de l'expérimentation (M1 à M4)..	79
Figure 16. Analyses en coordonnées principales (PCoA) utilisant la mesure de distance de Bray-Curtis, des échantillons de la condition contrôle.	80
Figure 17. Mesures d'α-diversité (richesse observée et indice de Shannon) du microbiote hémolympatique.	81
Figure 18. Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) du microbiote hémolympatique des huîtres plates exposées à différentes souches de <i>Pseudoalteromonas</i>	82
Figure 19. Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) pour comparer l'impact des différentes expositions aux souches de <i>Pseudoalteromonas</i> sur les communautés bactériennes du biofilm. ...	83
Figure 20. Courbes de survie Kaplan-Meier des huîtres plates exposées à différentes souches de <i>Pseudoalteromonas</i> au cours de leur maturation sexuelle.....	84

Figure 21. Émissions larvaires cumulées de chaque condition expérimentale aux termes de la maturation de l'huître plate <i>O. edulis</i>	85
Figure 22. Photos des biofilms de chaque condition expérimentale au premier mois de l'expérimentation, analysés par microscopie confocale à balayage laser.....	86
Figure 23. Biovolume de biofilm formé au cours de l'expérimentation en fonction des conditions expérimentales.....	86
Figure 24. Schéma récapitulatif des deux méthodes de digestion <i>in vitro</i> (TIM-1 et INFOGEST) en lien avec les compartiments du tractus gastrointestinal humain.....	96
Figure 25. Schéma récapitulatif du protocole INFOGEST.....	104
Figure 26. Schéma récapitulatif de la digestion des altérines sur le TIM-1, modèle dynamique <i>in vitro</i> . ..	106
Figure 27. Dénombrement des souches hOe-125, hCg-42 et RA15 ^T (INFOGEST).....	111
Figure 28. EIC superposés des 5 altérines dont le [M+2H] ²⁺ a été détecté (INFOGEST) : ALT-926 (1), ALT-970 (2), ALT-940 (3), ALT-954 (4) et ALT-980 (5).	112
Figure 29. Détection des altérines (%) au sein de chaque phase de digestion (INFOGEST) par analyses LC-MS/MS.	113
Figure 30. EIC superposés des 5 altérines dont le [M+3H] ³⁺ a été détecté (TIM-1) : ALT-926 (1), ALT-970 (2), ALT-940 (3), ALT-954 (4) et ALT-980 (5).....	115
Figure 31. Structure des altérines d'après Offret et al., 2022.	117
Figure A1. Arbre phylogénétique des souches du genre <i>Pseudoalteromonas</i> (Cuny, 2021).....	183
Figure A2. Scans en électrospray positif et chromatogrammes des ions totaux de chaque altérine purifiée par RP-HPLC.	184
Figure A3. Structure des isoformes d'altérines purifiées : ALT-952 (A), ALT-954 (B), ALT-970 (C), ALT-980 (D), ALT-984 (E) d'après Offret et al., 2022.	185
Figure A4. Spectres RMN des O-polysaccharides de souches de l'espèce <i>Aeromonas salmonicida</i> . ..	186
Figure A5. Mesures d' α -diversité pour les échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer pour la condition contrôle au cours des 4 mois d'expérimentation (M1 à M4).....	187
Figure A6. Analyse LDA identifiant les biomarqueurs associés aux communautés bactériennes du biofilm de chaque condition expérimentale, prélevés le premier mois de la maturation.	188
Figure A7. Test antimicrobien des échantillons de la digestion INFOGEST. Les témoins positifs et négatifs sont indiqués avec le signe T+ et T- respectivement.	189

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Gradient d'élution utilisé en HPLC semi-préparative pour séparer les altérines.	45
Tableau 2. Gradient d'élution utilisé en UPLC pour séparer les altérines.	45
Tableau 3. Caractéristiques des bactéries cibles utilisées lors de la détermination des CMI.	47
Tableau 4. Résultats de l'assemblage des génomes des souches de <i>Pseudoalteromonas</i>	48
Tableau 5. CDS identifiés comme potentiels gènes de résistance par la base de données CARD.	49
Tableau 6. Résultats obtenus pour les souches de <i>Pseudoalteromonas</i> contre divers antibiotiques.	51
Tableau 7. CDS identifiés comme potentiels facteurs de virulence par la base de données VFDB.	52
Tableau 8. Caractéristiques structurales des isoformes d'altérines utilisés pour les tests de CMI.	63
Tableau 9. Digestion <i>in vitro</i> de peptides antimicrobiens et suivi de leur dégradation au sein du tractus gastrointestinal (GI).	100
Tableau 10. Préparation des solutions mères (mL) des différents fluides de digestions.	104
Tableau 11. Composition et pH des différentes phases de digestion (INFOGEST).	105
Tableau 12. Composition des solutions mères d'électrolytes gastriques et de l'intestin grêle utilisées pour le modèle de digestion <i>in vitro</i> , le TIM-1.	107
Tableau 13. Contenu et sécrétions des différents compartiments du TIM-1 adapté de (Cordonnier et al., 2015)	107
Tableau 14. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse de la digestion statique INFOGEST des altérines par LC-MS/MS.	109
Tableau 15. Diamètres des halos d'inhibition (cm) à la fin de chaque phase de la digestion des altérines (INFOGEST).	112
Tableau 16. Diamètres des halos d'inhibition (cm) au cours de la digestion des altérines (TIM-1).	114
Tableau A1. Analyse de la variance par permutations (PERMANOVA) observant l'impact des conditions expérimentales au cours des différents mois de la maturation sur le microbiote hémostatique des huîtres plates.	187
Tableau A2. Analyse de la variance par permutations (PERMANOVA) observant l'impact des conditions expérimentales au cours des différents mois de la maturation sur les biofilms formés.	188
Tableau A3. Aires obtenues pour chaque altérine analysée en spectrométrie de masse détectée au cours de différentes phases de digestion (INFOGEST).	189
Tableau A4. Aires obtenues pour chaque altérine analysée en spectrométrie de masse détectée au cours de différentes phases de digestion (TIM-1).	190

AVANT-PROPOS

Le projet de thèse « Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotiques en ostréiculture : caractérisation et modulation des communautés bactériennes » a été co-financé par la Région Bretagne (dispositif ARED – Allocation de Recherche Doctorale) et par l'École Universitaire de Recherche ISblue (*Interdisciplinary graduate school for the blue planet*).

Dans le cadre de ce projet, une mobilité de trois mois a été effectuée sous l'encadrement du Pr. Lucie Beaulieu au Département des Sciences des aliments de la Faculté des Sciences de l'Agriculture de l'Alimentation de l'Université Laval à Québec, Canada de septembre à décembre 2023. Cette mobilité a été soutenue par le projet ISblue co-financé par une aide de l'État gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme *Investissements d'avenir* intégré à France 2013, portant la référence ANR-17-EURE-0015.

Au cours de cette thèse, des séjours d'une durée totale de six semaines ont également été effectués sous l'encadrement du Dr. Sandrine Baron à l'Unité Mycoplasmiologie, Bactériologie et Antibiorésistance du Laboratoire de Ploufragan, rattaché à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES).

Les expérimentations sur l'huître plate ont été rendues possible par le Centre technique conchylicole de Porscave (Lampaul-Plouarzel), affilié au Comité Régional de la Conchyliculture de Bretagne-Nord (CRC BN). Cette partie du projet a été financée par les Fonds Européen pour les affaires maritimes, la pêche et l'aquaculture (FEAMPA mesure 47) dans le cadre du projet *Développement de Probiotiques Innovants pour l'Aquaculture MAriNe* (PAQMAN).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. L'aquaculture : contexte et problématiques

1.1. Production aquacole mondiale et épisodes infectieux

La croissance démographique mondiale génère de nouvelles problématiques et de nouveaux enjeux, notamment du point de vue de la sécurité alimentaire. L'aquaculture, secteur en plein essor, est un domaine prometteur pour répondre à la demande alimentaire mondiale. L'aquaculture est un secteur en plein essor, avec un taux de croissance annuel moyen de 6,7% entre les années 1990 et 2020 (FAO, 2022). En 2022, la production d'animaux aquatiques par élevage a dépassé pour la première fois la pêche avec 94,4 millions de tonnes produites, représentant une valeur de première vente de 296 milliards de dollars USD (FAO, 2024a). Les principaux producteurs en aquaculture sont la Chine (36% de la production mondiale en 2022) suivie de l'Inde (8%), l'Indonésie (7%), le Vietnam (5%) et le Pérou (3%) (FAO, 2024a). La pisciculture domine la production mondiale d'animaux aquatiques avec 61,6 Mt produites en 2022 (FAO, 2024b), suivie de la production des mollusques (18,9 Mt) et des crustacés (12,8 Mt). La production aquacole française est en revanche principalement axée sur la conchyliculture, avec 149kt de produits vendus en 2021. Cette production est suivie par la pisciculture qui ne représente que 44kt (FranceAgriMer, 2023).

Les capacités de production aquacole sont toutefois limitées par la survenue d'épisodes infectieux qui provoquent de fortes mortalités et donc des pertes économiques importantes même si difficilement chiffrables (Lafferty *et al.*, 2015). Figurent parmi ces épisodes des infections bactériennes, virales ou encore parasitaires (Dantan *et al.*, 2024). Différentes espèces d'intérêt économique sont touchées par ce phénomène :

- La palourde, avec le syndrome de l'anneau brun causé par l'agent infectieux *Vibrio tapetis* (Allam *et al.*, 2002) ;
- Les huîtres, victimes du parasite *Bonamia ostreae* (Lane *et al.*, 2016) ou encore d'un variant du virus *ostreid herpesvirus type 1* (OsHV-1 μ Var) pour les huîtres creuses (de Lorgeril *et al.*, 2018) ;
- Les salmonidés et les poissons ornementaux sont sensibles à la bactérie *Aeromonas salmonicida*, responsable d'infections en élevages (Lamy *et al.*, 2022).

L'intensification des élevages participe aux pertes observées en augmentant les risques d'infection et de transmission entre les individus (Martínez Cruz *et al.*, 2012). En effet, une haute densité d'animaux favorise le développement et la transmission rapide d'infections qui peuvent être liées à un déséquilibre dans la relation pathogène - hôte - environnement (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

1.2. Le cas de la filière ostréicole en France

La conchyliculture, ou l'élevage des coquillages, comprend l'élevage des coques (cérastoculture), des palourdes (vénériculture), des moules (mytiliculture) et des huîtres (ostréiculture). Les valeurs de vente de produits issus de la conchyliculture et de la pisciculture s'élèvent à 565 millions et 235 millions d'euros, respectivement. De plus, la filière conchylicole représentait plus de 18 000 emplois dans le pays en 2021 (FranceAgriMer, 2023). L'ostréiculture en France est axée sur deux espèces : l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'huître plate *Ostrea edulis* (Figure 1). Au XIX^e siècle, la production ostréicole française était basée uniquement sur l'élevage de l'espèce *O. edulis*.

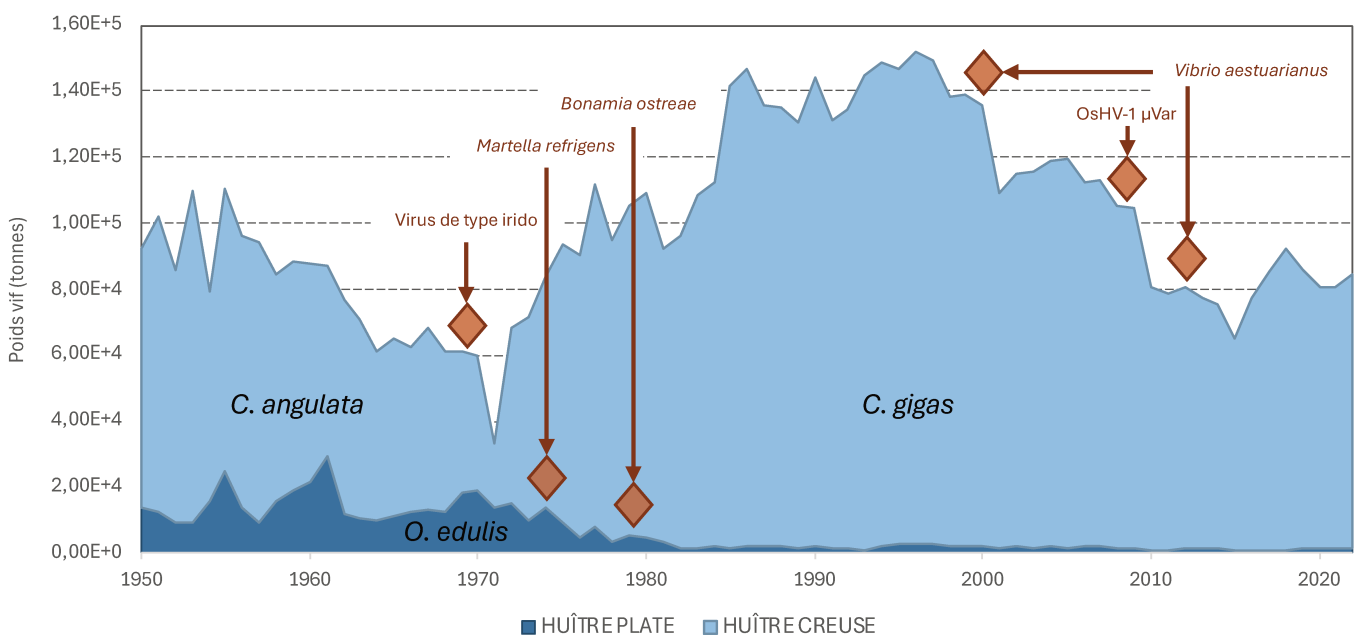


Figure 1. Production ostréicole française (tonnes - poids vif) de 1950 à 2022. Les agents infectieux principaux ayant affecté la production sont indiqués par des losanges marrons. Données de FishStatJ (FAO, 2024a) et graphique adapté d'après Azéma *et al.*, 2015.

Cette espèce autochtone des côtes françaises était uniquement élevée en Bretagne, provenant majoritairement de la rivière du Belon, ce qui lui a valu son appellation *huître belon* (CNC, 2019; Pogoda, 2019). Depuis le début du XX^e siècle avec la survenue d'un épisode de mortalité massif conduisant à une extinction quasi-totale de l'espèce, l'huître plate *O. edulis* est aujourd'hui recensée parmi les espèces en danger par la commission OSPAR et par l'Union Européenne (zu Ermgassen *et al.*, 2020). Suite à ces mortalités, les acteurs de la filière se sont tournés vers une espèce portugaise d'huître creuse, *Crassostrea angulata*, qui fut décimée à son tour dans les années 70 par un iridovirus (Batista *et al.*, 2015). C'est alors qu'a été introduite l'espèce japonaise *C. gigas*, qui est aujourd'hui l'espèce la plus cultivée et la plus consommée en France. Mais les épisodes infectieux continuent à sévir dans les parcs ostréicoles et à perturber l'élevage des huîtres. La culture de l'huître du pacifique *C. gigas* est impactée par des épisodes de mortalité causés notamment par la bactérie pathogène *Vibrio aestuarianus* et le virus OsH-V1 μ Var (Figure 1).

1.3. Pathogènes des huîtres

1.3.1. Les parasitoses

Les huîtres sont sensibles à divers pathogènes dont les parasites qui ont causé par le passé de fortes mortalités dans les élevages (Buestel *et al.*, 2009) :

- *Bonamia exitiosa* est un parasite uniquement pathogène pour *Ostrea* spp. ;
- *B. ostreae*, parasite protozoaire touchant à la fois les espèces du genre *Ostrea* et l'huître du pacifique *C. gigas* (Lane *et al.*, 2016).
- Le parasite *Haplosporidium nelsoni* est spécifique des huîtres *C. gigas* et *C. virginica* (Frank-Lawale *et al.*, 2014; Hine, 2020) ;

Le parasite *B. ostreae* infecte et se multiplie dans les hémocytes et sa présence est associée à des lésions sur le tissu conjonctif des branchies, du manteau et de la glande digestive (Arzul *et al.*, 2009). Les huîtres infectées peuvent présenter une décoloration de leurs tissus, des indentations au niveau de leurs branchies ou encore des ulcères. Cependant, la plupart des individus infectés sont asymptomatiques (Chevignon *et al.*, 2022).

1.3.2. Mortalités au stade larvaire de bivalves

Les huîtres sont également sensibles à certaines bactéries opportunistes du genre *Vibrio* (Prado *et al.*, 2015), particulièrement au stade larvaire. Actuellement, l'élevage en éclosion est une pratique indispensable à l'obtention de naissains d'huîtres destinés à l'aquaculture (zu Ermgassen *et al.*, 2023a). Cependant, des épisodes infectieux causés par certaines espèces du genre *Vibrio* constituent le principal frein à la production en éclosion de bivalves. La vibriose, caractérisée par une diminution soudaine de la motilité des larves de bivalves, le détachement du velum et la nécrose du corps mou, provoque des taux de mortalité très élevés, pouvant dépasser 90 % en 24 à 48 heures (Prado *et al.*, 2015).

Lors d'épisodes de mortalités observés en éclosion, des prélèvements ont permis d'isoler chez différentes espèces de bivalves des bactéries du genre *Vibrio* responsables d'infections :

- Des huîtres creuses (*C. gigas*) d'écloseries et d'élevages ont été infectées en 2007 par des souches de l'espèce *Vibrio tubiashii* (Travers *et al.*, 2014) ;
- Des isolats obtenus à partir de larves et de l'eau de mer d'un élevage de praires durant un épisode infectieux ont mis en évidence un nouveau pathogène, *Vibrio bivalvicida* ; la pathogénicité de ces isolats a également été observée sur des larves d'*O. edulis* en laboratoire (Dubert *et al.*, 2016) ;
- Les espèces *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus* sont également associées aux épisodes de mortalité de l'huître *C. gigas* qui se produisent l'été en France (Garnier *et al.*, 2008).

1.3.3. Syndrome de mortalité des huîtres du pacifique

L'huître creuse est fortement impactée par un virus, OshV-1 μ Var, responsable du syndrome de mortalité des huîtres du pacifique (de Lorgeril *et al.*, 2018). Le syndrome de mortalité des huîtres du pacifique ou POMS (de l'anglais *Pacific Oyster Mortality Syndrome*) a la particularité d'impliquer à la fois le virus OshV-1 μ Var et des bactéries du genre *Vibrio* (Clerissi *et al.*, 2020). Ce syndrome affecte l'huître creuse *C. gigas* et plus particulièrement les naissains et les juvéniles (Segarra *et al.*, 2010). La compréhension de ce syndrome nécessite d'adopter une approche holistique, prenant en compte le système immunitaire de l'hôte et son microbiote (de Lorgeril *et al.*, 2018). De plus, d'autres facteurs comme les interactions entre les agents

infectieux et la température de l'eau de mer, la disponibilité des aliments ou encore la génétique et l'âge des huîtres font partie des facteurs contribuant à ce syndrome (Petton *et al.*, 2021).

L'infection des huîtres par le virus OsHV-1 μ Var est la première étape du processus d'infection. Ce virus altère les cellules hémocytaires et affecte leur réponse immunitaire (Petton *et al.*, 2021). Cette altération est suivie par une dysbiose du microbiote bactérien, ce qui mène à une deuxième étape d'infection par des bactéries opportunistes. Parmi ces bactéries, on compte de nombreuses espèces du genre *Vibrio* dont *V. crassostreae*, bactérie particulièrement virulente chez les huîtres creuses juvéniles (Bruto *et al.*, 2017).

Suite à l'injection du virus OsHV-1, des lésions ont été observées sur les tissus des branchies des huîtres creuses juvéniles, suivies de la dégradation de ces tissus 78 heures après l'infection (de Lorgeril *et al.*, 2018). De plus, des bactéries du genre *Arcobacter*, *Salinirepens*, *Psychrobium*, *Marinobacterium*, *Psychrilyobacter*, *Marinomonas*, *Vibrio*, *Fusibacter*, *Cryomorphaceae* et *Psychromonas* ont été fréquemment observées dans les tissus des huîtres infectées (Petton *et al.*, 2021). Ainsi, ces bactéries associées représentaient 59% du microbiote total des huîtres infectées au bout de 72h d'infection, contre 2% au début de l'expérimentation (de Lorgeril *et al.*, 2018).

Le lien entre instabilité du microbiote bactérien et infection bactérienne reste en effet une problématique dans la compréhension de la santé de l'hôte et des mécanismes infectieux. Dans certains cas, l'altération du microbiote peut être le résultat d'une infection et dans d'autres la cause (de Lorgeril *et al.*, 2018; Lasa *et al.*, 2019). La sensibilité d'une espèce à un épisode infectieux peut être corrélée à la composition de son microbiote et notamment à son microbiote hémolympatique (Vezzulli *et al.*, 2018). Le microbiote devient alors un marqueur de l'état de santé de l'hôte et doit être considéré au même titre que sa physiologie ou son système immunitaire.

1.4. Usage d'antibiotiques

Afin d'empêcher la progression de telles infections bactériennes et ainsi limiter les pertes au sein des élevages, des antibiotiques sont utilisés en aquaculture, particulièrement en pisciculture (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). Cet usage d'antibiotiques est réglementé en Europe, en Amérique du Nord et également au Japon : très peu d'antibiotiques sont autorisés (Watts *et*

al., 2017). En Europe, l'usage d'antibiotiques dans le but d'améliorer la croissance et le rendement des animaux est interdit depuis 2006 (règlement (CE) n°1831/2003). De plus, l'usage d'antibiotiques en traitement prophylactique (préventif) ou métaphylactique (traitement de tous les animaux d'un même groupe lorsque certains sont malades) n'est autorisé qu'exceptionnellement. Le traitement curatif, *i.e.* d'animaux présentant des symptômes, est autorisé sous ordonnance d'un vétérinaire (règlement (UE) n°2019/6). Cependant, ces réglementations ne sont pas effectives dans d'autres régions du monde (Gao *et al.*, 2012), notamment les pays d'Asie qui, en 2022, généraient 70% de la production mondiale en animaux aquatiques (FAO, 2024a). Malgré un progrès notable des méthodes de diagnostic pour identifier les agents infectieux impliqués dans des épisodes de mortalité, le manque d'informations et de capacités de diagnostic dans ces pays peut conduire à une mauvaise utilisation des antibiotiques (Chowdhury *et al.*, 2022).

Les antibiotiques sont administrés aux poissons par ingestion, injections ou encore par baignades (Cabello, 2006). La méthode de baignade consiste à placer les animaux d'élevage en immersion dans des bassins contenant le traitement souhaité (Evans *et al.*, 2004). Les aliments non-consommés et les excréments de poissons chargés d'antibiotiques se déposent alors dans les sédiments au fond des enclos d'élevage et peuvent ensuite être transportés dans d'autres zones après nettoyage (Gordon *et al.*, 2007). Les résidus d'antibiotiques libérés dans l'environnement sont ainsi susceptibles d'être consommés par d'autres organismes, notamment des filtreurs comme les mollusques (Cabello, 2006). De plus, la persistance d'antibiotiques dans les produits aquacoles n'est pas sans conséquences sur le consommateur qui, *in fine*, les ingère. Une étude a ainsi mis en évidence la présence de 5 antibiotiques différents dans les tissus de produits d'origine aquacoles de 11 pays différents à des concentrations supérieures aux limites de détection (Done and Halden, 2015). Cet exemple rend compte d'une problématique plus globale de bioaccumulation d'antibiotiques dans les tissus des animaux d'élevage (El-Saadony *et al.*, 2021).

Les bactéries présentent naturellement des résistances aux antibiotiques : certains mécanismes innés et indispensables à leur fonctionnement, comme les pompes à efflux, peuvent être activés en présence d'antibiotiques et ainsi induire une résistance (Reygaert, 2018). D'autre part, les bactéries à Gram négatif sont naturellement résistantes aux antibiotiques qui ciblent le peptidoglycane de la paroi cellulaire comme les pénicillines

naturelles, car ce mécanisme est inefficace contre la membrane externe de ces bactéries (Miller, 2016).

La forte utilisation des antibiotiques induit une pression de sélection qui s'établit dans l'environnement et conduit à la mobilisation et au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui participe au phénomène d'antibiorésistance (*AntiMicrobial Resistance* ou AMR) (Preena et al., 2020; Santos and Ramos, 2018). Différents mécanismes d'acquisition de gènes de résistance sont mis en place par les bactéries exposées aux antibiotiques : ces gènes peuvent être le fruit de mutations (transmission verticale) ou être transmis entre bactéries par transmission horizontale si présents sur des éléments mobiles comme des plasmides (Roux and Blokesch, 2018). Les animaux d'aquaculture hébergent des bactéries commensales, ce qui en fait des *genetic hotspots* pour ce type de transfert (Watts et al., 2017). L'émergence de ces résistances a des conséquences sanitaires directes sur les élevages mais également indirectes en santé publique (OMS, 2023).

Il est donc impératif aujourd'hui de proposer des alternatives à l'utilisation des antibiotiques pour endiguer ce phénomène d'antibiorésistance. Parmi ces solutions on peut trouver la vaccination (Kumar et al., 2008; Li et al., 2013; Martínez Cruz et al., 2012; Newaj-Fyzul and Austin, 2015), l'utilisation de bactériophages (Jun et al., 2013; Pires et al., 2016), des méthodes d'inhibition du quorum sensing (Mion et al., 2019; Rutherford et al., 2011) ou encore le recours à des compléments alimentaires tels que les additifs phytogéniques (Ahmadifar et al., 2021), les huiles essentielles (Dawood et al., 2021), les prébiotiques (Gibson et al., 2004) ainsi que les probiotiques (Abdel-Latif et al., 2023; Nayak, 2021; Offret et al., 2019c).

La composante bactérienne des communautés microbiennes, environnementales ou associées aux animaux, joue un rôle capital dans la santé des animaux en structure aquacole. Si l'on peut considérer ces communautés bactériennes sous un prisme négatif, du fait de leur rôle dans les phénomènes infectieux et les épisodes de mortalité, elles s'observent sous un jour plus favorable au regard du rôle du microbiote dans l'homéostasie de l'hôte et de la pertinence des probiotiques en système aquacole. Pour mieux comprendre les interactions entre les animaux, leur environnement et les communautés microbiennes associées, il apparaît nécessaire de recourir à une approche intégrative qui considère l'hôte et les microorganismes associés dans leur ensemble.

2. L'holobionte

Le terme *holobionte* a été pour la première fois utilisé par Meyer-Abich en 1943 puis par Lynn Margulis en 1991 (Margulis and Fester, 1991), pour décrire un phénomène d'évolution se basant majoritairement sur des interactions indéfectibles entre des microorganismes et des organismes hôtes conduisant à la création de nouvelles entités uniques (Baedke *et al.*, 2020). Les plantes et les animaux ont tous un microbiote qui leur est associé, et sont alors considérés comme des holobiontes (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). La notion d'holobionte sera ensuite utilisée plus largement dans des études, portant notamment sur la description des coraux, leurs microalgues et microorganismes associés, comme une seule entité complexe et évolutive (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2024).

Le terme d'*hologénome* a ensuite été proposé afin de décrire ce phénomène par le prisme de sa composition génétique ; ainsi les génomes de l'hôte et du microbiome qui lui sont associés forment un hologénome (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018). Les variations observées au sein de l'hologénome peuvent être dues à des changements au niveau du génome de l'hôte et/ou au niveau du microbiome dans une dynamique de coévolution (Theis *et al.*, 2016).

Le microbiote associé à l'holobionte comprend des microorganismes permanents et transitoires, transmis par l'environnement (transmission horizontale) ou encore par les parents (transmission verticale) (Berg *et al.*, 2020). Une variation du microbiote peut jouer un rôle important dans l'évolution et l'adaptation dynamique de l'holobionte (Figure 2). L'holobionte serait donc une entité soumise à une pression de sélection au même titre qu'un individu au sein d'une espèce (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018).

Cette théorie rencontre de nombreuses critiques et reste aujourd'hui controversée : peut-on parler de coévolution, ou simplement d'une pression de sélection exercée par l'hôte ou par les microorganismes ? Une autre approche de l'étude des interactions hôte-microorganismes est proposée par Moran and Sloan, 2015. Ces derniers proposent d'appréhender la coévolution hôte-microorganismes en décryptant les bénéfices mutuels des adaptations observées sans considérer la théorie de l'hologénome comme un postulat naturel.

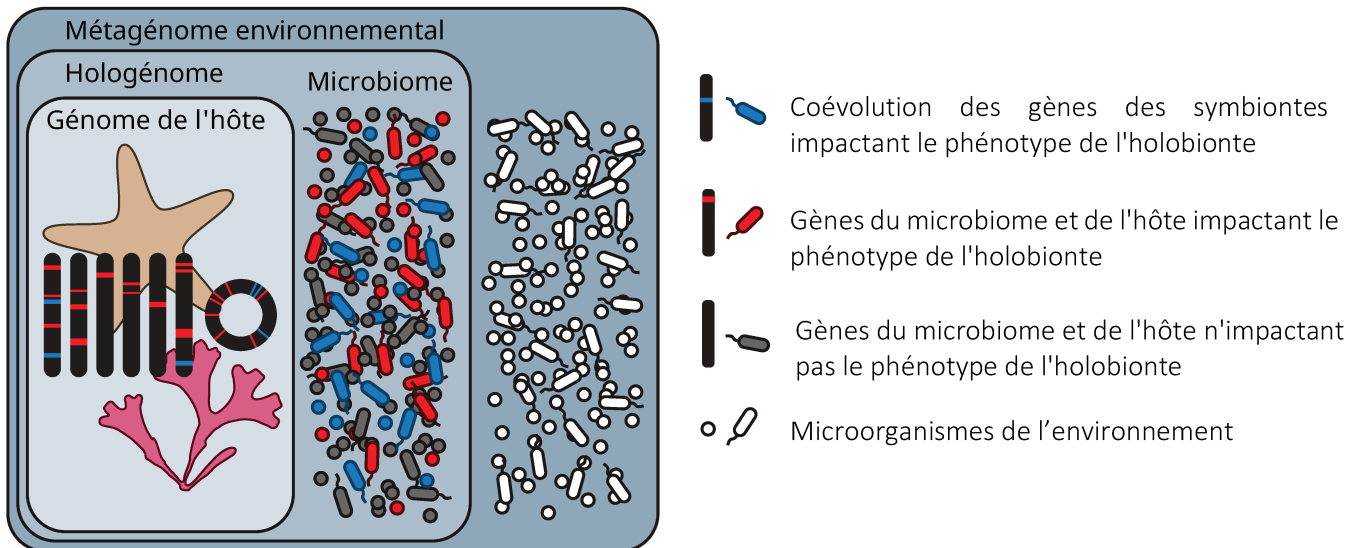


Figure 2. La théorie de l'hologénome illustrée, adaptée de Theis *et al.*, 2016.

Néanmoins, la théorie de l'hologénome et notamment la définition du microbiome ne cessent d'être redéfinis : une vision holistique du microbiome a été récemment proposée (Berg *et al.*, 2020). Le microbiome est alors défini comme le microbiote composé de bactéries, archées, champignons, protistes et d'algues associés et son *théâtre d'activité*. Ce *théâtre d'activité* est composé d'éléments structuraux comme les acides nucléiques, protéines, lipides, polysaccharides. Il est également constitué de métabolites d'origine microbienne : toxines, molécules organiques, molécules de signal et molécules produites par les hôtes. Par exemple, les composés organiques volatils émis par des champignons peuvent modifier la motilité des bactéries et contribuent ainsi aux interactions entre ces deux composantes du microbiote (Schmidt *et al.*, 2016). Ainsi, la considération du *théâtre d'activité* du microbiote peut fournir des éléments supplémentaires pour la compréhension des interactions qui s'y déroulent.

3. Probiotiques : périmètre d'action et réglementations

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes ayant un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte ou environnementale, en garantissant une amélioration de l'utilisation de l'alimentation, en améliorant la réponse de l'hôte face à une maladie ou encore en améliorant la qualité de l'environnement (Hotel, 2001). Différents effets bénéfiques des probiotiques ont pu être observés lors d'expérimentations en élevage aquacole (Martínez Cruz *et al.*, 2012).

3.1. Incidences des probiotiques en élevages aquacoles

3.1.1. Une optimisation des performances digestives et de la reproduction

Certains probiotiques participent à la bonne digestion des nutriments du fait de la production de nombreuses enzymes (protéases, lipases, amylases) qui facilitent l'assimilation de ces nutriments par l'hôte (El-Saadony *et al.*, 2021; Verschuere *et al.*, 2000). De nombreuses bactéries probiotiques du genre *Bacillus* (Hidalgo *et al.*, 2006) ou encore une levure *Debaryomyces hansenii* (Tovar *et al.*, 2002) ont présenté une capacité à faciliter la digestion et l'assimilation des nutriments chez le bar et la truite arc-en-ciel, respectivement. Des enzymes produites par ces probiotiques telles que l'amylase, la trypsine ou encore des enzymes anti-oxydatives pourraient expliquer leurs effets (Merrifield *et al.*, 2010).

L'ajout de probiotiques en élevage peut également améliorer la fécondité et la santé des larves (Rohani *et al.*, 2022). Cette amélioration a été observée lors de l'apport de *Bacillus subtilis* au régime de différentes espèces de poissons ornementaux (Ghosh *et al.*, 2007) ou encore chez le poisson porte-épée (*Xiphophorus hellerii*) à l'ajout d'un mélange commercial de souches de *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Bifidobacterium* (Abasali and Mohamad, 2010).

3.1.2. L'amélioration de la croissance

Les probiotiques utilisés dans les différents élevages peuvent également contribuer à une meilleure croissance des espèces cultivées (Verschuere *et al.*, 2000). Cette amélioration de croissance peut se faire de façon directe ou indirecte. Différentes études témoignent en effet de l'impact direct d'aliments supplémentés en probiotiques sur la croissance de différentes espèces de poissons notamment le tilapia du Nil ou encore le porte-épée *X. hellerii* (Dharmaraj and Dhevendaran, 2010; EL-Haroun *et al.*, 2006). Les probiotiques peuvent également stimuler la croissance d'une espèce planctonique utilisée pour l'alimentation d'une espèce produite en aquaculture et ainsi stimuler la croissance de l'espèce d'élevage de manière indirecte. Par exemple, des bactéries lactiques améliorent significativement la croissance du rotifère *Brachionus plicatilis*, une espèce planctonique (Planas *et al.*, 2004). Ce résultat est d'autant plus pertinent que les rotifères font partie des zooplanctons les plus communément utilisés dans l'élevage larvaire de poissons et de crustacés (Dhont *et al.*, 2013).

3.1.3. L'augmentation de la tolérance au stress

Les pratiques d'aquaculture intensives augmentent considérablement le risque de stress chronique, avec des effets délétères sur l'ensemble de l'élevage. Les probiotiques peuvent contribuer à augmenter le seuil de tolérance des animaux au stress afin d'améliorer l'état de santé global des individus et, par conséquent, optimiser la résistance aux infections, l'assimilation des nutriments ou la croissance (Hanke *et al.*, 2020). Ainsi, un élevage de bars communs (*Dicentrarchus labrax*) supplémenté avec une souche du genre *Lactobacillus* a présenté un niveau de cortisol significativement inférieur au contrôle (Carnevali *et al.*, 2006). D'autre part, le niveau de stress oxydatif d'un élevage de crevettes *Litopenaeus stylirostris* infecté par le *Vibrio* pathogène *V. nigripulchitrudo* était plus faible en présence de la souche probiotique *Pediococcus acidilactici* MA 18/5 ajoutée (Castex *et al.*, 2009).

3.1.4. Une meilleure résistance aux épisodes infectieux

La capacité des probiotiques à favoriser la résistance des animaux d'aquaculture lors d'épisodes infectieux justifie en grande partie l'intérêt qui leur est porté. En effet, ils peuvent améliorer la réponse immunitaire de l'hôte et ainsi diminuer significativement la mortalité d'un élevage en cas d'infections. L'ajout de deux souches probiotiques de l'espèce *Bacillus subtilis* a amélioré la survie (de + 30% à + 43%) de crevettes à pattes blanches *Litopenaeus vannamei* lors d'un challenge infectieux avec la souche *Vibrio harveyi* ATCC14126 (Zokaeifar *et al.*, 2012). De plus, une balnéation d'un élevage d'ormeaux avec la souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 a permis d'augmenter la survie des animaux de 24% en cas d'infection expérimentale par *V. harveyi* ORM4 (Offret *et al.*, 2019c). De plus, l'ajout de souches de *Pseudoalteromonas* (D16 et DM14) et *Epibacterium* B11, isolées à partir de l'huître creuse *C. gigas*, augmente la survie de larves d'huître creuse en cas d'infection à *Vibrio coralliilyticus* (Madison *et al.*, 2022). Une augmentation de la survie de larves d'huître *C. virginica* avec addition du probiotique *Bacillus pumilus* (RI06-95) a également été observée en présence du même *Vibrio* pathogène (Stevick *et al.*, 2019).

Dans certains cas, une meilleure résistance aux épisodes infectieux en présence d'un probiotique et un effet sur des marqueurs de l'immunité ont été observés simultanément (Torres-Maravilla *et al.*, 2024). C'est par exemple le cas du flet japonais (*Paralychtis olivaceus*), dont l'exposition à des probiotiques a entraîné une augmentation significative de l'activité des

lysozymes, ainsi qu'une amélioration de la survie lors d'une infection par *Vibrio anguillarum* (Taoka *et al.*, 2006).

3.2. Réglementation européenne sur l'usage de probiotiques

L'*European Food Safety Authority* (EFSA) est l'autorité européenne de sécurité des aliments, qui contrôle la mise sur le marché de nouveaux produits et publie des recommandations scientifiques cruciales pour garantir la sécurité de la chaîne alimentaire en Europe (EFSA, 2024). Sont ciblés par certaines recommandations les microorganismes vivants utilisés durant la production tout comme les additifs microbiens. Ainsi, l'innocuité de ces microorganismes vivants (ou probiotiques) doit être vérifiée non seulement pour l'élevage mais également pour le consommateur des produits obtenus (Rychen *et al.*, 2018).

Le concept de Qualified Presumption of Safety ou QPS a été développé en 2003 afin de fournir une évaluation générique permettant une étude préalable de l'innocuité de ces additifs. Cette évaluation fait partie des étapes indispensables en cas de commercialisation en Europe (Herman *et al.*, 2019) et est basée sur quatre piliers : l'identification taxinomique, l'ensemble des connaissances disponibles concernant le microorganisme identifié, la possible pathogénicité de ce dernier ainsi que l'usage ciblé (EFSA, 2007).

L'identification taxinomique se fait par séquençage et étude des génomes des microorganismes (Bourdichon *et al.*, 2021). À partir de cette identification, une étude bibliographique peut être réalisée : sont investigués l'historique d'utilisation, l'écologie du microorganisme dans son environnement naturel ou encore les aspects cliniques et industriels. L'étude de la pathogénicité des microorganismes étudiés passe principalement par des analyses de génome et la recherche de possibles facteurs de virulence et d'îlots de pathogénicité. La recherche de gènes de résistance aux antibiotiques acquis est également préconisée afin d'éviter les risques de transmission de résistances (EFSA, 2013 ; Chapitre 1). Toutes ces études doivent être réalisées en prenant en compte l'effet de l'additif sur son environnement, en fonction de son usage. Dans ce cadre, l'étude de l'interaction du microorganisme avec d'autres éléments de son environnement peut ainsi être considérée, ainsi que ses voies de colonisation et de dispersion (Herman *et al.*, 2019).

Lors de l'utilisation d'un additif microbien pour des produits destinés à la consommation, les effets potentiels sur le consommateur et sur la digestion de ces produits sont à envisager, aux plus hautes concentrations de l'additif utilisé (EFSA (FEEDAP) *et al.*, 2017). L'EFSA recommande ainsi d'établir le devenir de l'additif et des métabolites dérivés via des expérimentations *in vitro* mais également sur des modèles d'animaux *in vivo*. L'objectif est de déterminer la concentration de l'additif à laquelle le consommateur risque d'être exposé et ainsi d'adapter les doses d'additif ajoutées aux produits en conséquence (EFSA (FEEDAP) *et al.*, 2017). Afin de répondre à cette recommandation et d'obtenir des premières données concernant le devenir de l'additif chez le consommateur, des essais de digestion *in vitro* de ces additifs sont souhaitables (Wang *et al.*, 2024).

4. Probiotiques et communautés bactériennes

L'action des probiotiques en aquaculture s'articule particulièrement autour du microbiote intestinal. Ils sont alors définis comme des microorganismes vivants bénéfiques introduits au sein du tractus gastro-intestinal (Verschuere *et al.*, 2000). Le mode d'action des probiotiques est en effet intimement lié aux dynamiques des communautés microbiennes et à l'étude du microbiote (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Martínez Cruz *et al.*, 2012). Les microorganismes utilisés disposent en retour d'une niche écologique favorable à leur établissement voire à leur développement (Pierce and Ward, 2018).

4.1. Incidences sur les communautés microbiennes de l'environnement

Les probiotiques sont notamment étudiés pour l'impact qu'ils peuvent avoir sur l'environnement de l'hôte et donc sur les communautés bactériennes associées à l'eau de mer ou encore aux biofilms.

Les probiotiques peuvent en effet améliorer la qualité de l'eau en élevage (Tabassum *et al.*, 2021) et cette amélioration peut passer par une modulation des communautés bactériennes en présence. Ainsi, l'apport d'une souche probiotique *Bacillus pumilus* RI06-95 à un élevage larvaire d'huîtres creuses (*C. virginica*) a induit une augmentation de l'abondance relative des communautés bactériennes affiliées aux genres *Oceanospirillales* et *Bacillus* présentes dans l'eau de mer (Stevick *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'augmentation de la diversité de *Vibrio* spp. dans cet environnement indique, d'après cette étude, une réduction de l'abondance des souches de

Vibrio pathogènes et, par conséquent, une diminution des risques d'épisodes infectieux en aquaculture.

Les probiotiques peuvent également être étudiés pour leurs effets potentiels sur les biofilms se formant dans les bassins d'aquaculture (Rahman *et al.*, 2023). Les biofilms bactériens sont définis comme des microorganismes enveloppés dans une matrice extracellulaire (*Extracellular Polymeric Substance* ou EPS) composée de polysaccharides, protéines, acides nucléiques (ADN, ARN) et autres biomolécules (Irie *et al.*, 2012). Cette matrice extracellulaire constitue le squelette de l'architecture tridimensionnelle du biofilm et conditionne sa cohésion ainsi que son adhésion à des surfaces (Flemming and Wingender, 2010). La diversité des bactéries composant les biofilms est un facteur important pour maintenir leur survie : les interactions entre les différents microorganismes passent par des échanges de substrat, des transferts horizontaux de gènes ou encore des interactions métaboliques (Muhammad *et al.*, 2020). De ces interactions résultent de meilleures fixation, adhésion et dispersion du biofilm (Luo *et al.*, 2022). Ces mêmes interactions entre les communautés du biofilm les rend également plus difficiles à éliminer : les traitements antibiotiques sont moins efficaces que pour les cellules planctoniques, avec des concentrations minimales inhibitrices pouvant être entre 100 à 800 fois plus élevées (Grooters *et al.*, 2024). De plus, les transferts de gène de résistance aux antibiotiques entre les microorganismes composant le biofilm participent au phénomène d'antibiorésistance.

Une seule étude publiée, à notre connaissance, a cherché à caractériser l'impact d'un probiotique sur les biofilms en aquaculture, sans constater d'incidence sur la diversité ou la structure des communautés bactériennes (Stevick *et al.*, 2019).

4.2. Effets sur le microbiote bactérien des huîtres

L'utilisation de probiotiques est actuellement étudiée notamment afin d'améliorer la santé des huîtres et notamment leur capacité à résister à des épisodes infectieux en aquaculture (Paillard *et al.*, 2022).

Une étude du microbiome larvaire de l'huître *C. virginica* en présence du probiotique *Phaobacter inhibens* S4 (10^4 UFC/mL) a été réalisée (Takyi *et al.*, 2024). La présence du probiotique n'a pas eu d'incidence sur la richesse et la diversité du microbiote larvaire. En

revanche, des modifications ont été observées au niveau de la composition bactérienne de ce microbiote en matière d'abondances relatives. L'ajout d'une souche de *Bacillus pumilus* n'a pas impacté la structure ou la diversité du microbiote larvaire de l'espèce *C. virginica* (Stevick *et al.*, 2019). La présence de cette souche est cependant corrélée à une abondance relative moins importante de *Vibrio* spp., suggérant un effet bénéfique sur le microbiote des larves traitées.

Le microbiote d'huîtres creuses juvéniles (*Crassostrea sikamea*) a également été étudié en présence de souches du genre *Streptomyces* (García Bernal *et al.*, 2017). L'impact sur le microbiote des huîtres se traduit par une diversité augmentée et une structure modifiée.

Les probiotiques sont employés à des fins préventives, dans le but d'assurer que les modifications induites par leur utilisation soient durables (Verschuere *et al.*, 2000). Ainsi, une modulation pérenne du microbiote générant un impact bénéfique sur l'hôte est recherchée lors de l'utilisation de ces additifs microbiens. L'objectif est d'obtenir une modulation durable et bénéfique du microbiote : on peut alors parler d'*éducation microbienne*. Le microbiote est façonné tôt dans le cycle de vie de l'huître, afin d'adapter et de produire un phénotype désiré et adapté à l'environnement de l'holobionte. Cette *éducation microbienne* participerait alors au bon développement de l'hôte, et en particulier de son immunité qui aurait été stimulée dès les premiers stades larvaires (Dantan *et al.*, 2024).

5. Le microbiote bactérien chez l'huître

5.1. Physiologie et facteurs abiotiques

Le patrimoine génétique et le stade de développement de l'hôte sont corrélés à une structuration spécifique du microbiote au sein d'une seule et unique population. Au sein d'une même population, il existe des différences inter-individuelles de microbiote qui s'expliquent notamment par le stade de développement de l'huître. Les communautés bactériennes associées aux larves d'huîtres creuses vont par exemple perdre en richesse et en diversité dès le stade post-larvaire (Arfken *et al.*, 2021). Cette perte de richesse et de diversité sera également observée entre ce même stade post-larvaire et le stade adulte (Trabal Fernández *et al.*, 2014). De plus, les différents compartiments de l'huître abritent des microbiotes distincts non seulement par leur composition mais également leur diversité. Lokmer *et al.*, 2016b ont par exemple montré que le microbiote hémolympatique de l'huître creuse *C. gigas* présente une

diversité plus importante que d'autres compartiments étudiés comme la glande digestive, les branchies et le manteau. Ces résultats indiquent que le microbiote varie en fonction du rôle physiologique du compartiment étudié (King *et al.*, 2020; Pierce, 2016).

D'autre part, le mode de vie des huîtres les expose à une forte variabilité des facteurs abiotiques, principalement la température et la salinité (Paillard *et al.*, 2022). Ces facteurs participent en effet à la médiation du microbiote des huîtres. La température de l'eau et plus généralement, l'évolution des conditions environnementales au fil des saisons, sont des facteurs qui modifient la structuration du microbiote des différents compartiments de l'huître (Fraune and Bosch, 2007; Lokmer and Mathias Wegner, 2015; McLoughlin *et al.*, 2016; Offret *et al.*, 2020). D'autre part, le microbiote est spécifique de la provenance géographique des huîtres : par exemple, des individus des espèces *Crassostrea corteziensis* et *C. sikamea* présentes sur le même site partageaient des microbiotes de leurs glandes digestives plus proches entre eux qu'avec des individus de leurs espèces respectives présents sur d'autres sites (Trabal Fernández *et al.*, 2014, 2012). Le transfert d'huîtres d'un site à un autre a par conséquent un effet significatif sur le microbiote de l'huître, et notamment sur le microbiote dit transitoire (Dupont *et al.*, 2020; Lokmer *et al.*, 2016a; Nguyen *et al.*, 2020). Certains taxons sont par exemple présents chez certaines populations et absents chez d'autres : des différences de diversité intraspécifiques en résultent (Lokmer *et al.*, 2016a; Wegner *et al.*, 2013).

5.2. Acquisition du microbiote : transmissions horizontales et verticales

Les huîtres sont également exposées à des facteurs biotiques tels que les microorganismes de la colonne d'eau : leur diversité et leur abondance module la composition et la structure de leur microbiote (Pierce and Ward, 2018). Ainsi, certains microorganismes retrouvés libres dans l'environnement peuvent s'associer à un hôte qui regroupe les conditions idéales pour leur établissement : on parle alors de transmission horizontale (Unzueta-Martínez *et al.*, 2022a). Cette association peut d'une certaine manière être médiée par l'hôte de façon active ou passive, et plus globalement par l'holobionte. Ainsi, l'huître creuse *C. gigas* présentait un microbiote hémolympatique qui variait davantage entre des individus d'un même site qu'entre les individus de différents sites (Lokmer *et al.*, 2016a). Une sélection des microorganismes présents dans la colonne d'eau et dans les sédiments peut également être réalisée par les bivalves en fonction de leurs compartiments (Paillard *et al.*, 2022). Cette sélection peut être dite *passive*

par l'hôte, car dépendant de facteurs extérieurs comme les nutriments disponibles, le cycle de vie ou encore son état de santé. La sélection *active* de certains microorganismes pourrait être corrélée à un contrôle du système immunitaire, comme la sélection de microorganismes produisant des peptides antimicrobiens (PAMs), jouant un rôle dans la réponse immunitaire de l'huître (Defer et al., 2013). Chez les huîtres, les familles de PAMs sont diversifiées et sont exprimées par des cellules immunitaires, épithéliales ainsi que les hémocytes (Schmitt *et al.*, 2012). Parmi ces familles de peptides, les Big-défensines sont par exemple impactées par le syndrome du POMS, ce qui suggère leur rôle dans la résistance des huîtres à cette maladie et dans la médiation des communautés bactériennes en présence (De San Nicolas *et al.*, 2022).

Le microbiote peut également être transmis verticalement, i.e. par transfert générationnel, ce qui englobe également le concept de *transfert maternel* (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Par exemple, le microbiote de larves d'huîtres *Saccostrea glomerata* est influencé partiellement par le microbiote maternel, plus précisément par les communautés bactériennes des gamètes femelles de l'huître (Unzueta-Martínez *et al.*, 2022a). D'autre part, une modulation du microbiote observé chez des larves d'huître creuse *C. gigas* exposées à une eau enrichie en microorganismes a également été observée pour le microbiote de la génération suivante, suggérant un transfert intergénérationnel (Fallet *et al.*, 2022).

Le microbiote des huîtres peut être acquis par transfert horizontal et/ou par transfert vertical. D'autre part, cette transmission peut être permanente ou transitoire. On parle alors de *core-microbiote* et de microbiote transitoire, respectivement. Le *core-microbiote* peut être défini comme les communautés bactériennes systématiquement associées à un génotype et à un environnement donné (Berg *et al.*, 2020). La notion de *core-microbiote* est en constante évolution et est souvent remise en cause car souvent considérée comme un ensemble de communautés bactériennes associées à un rang taxinomique donné, et non à un ensemble de fonctions essentielles à l'homéostasie de l'holobionte (Lemanceau *et al.*, 2017). À l'inverse, le microbiote transitoire varie en fonction du temps, des conditions environnementales, de la disponibilité en nutriments ou encore du stade de développement et du cycle de vie de l'hôte (Berg *et al.*, 2020).

5.3. Déséquilibres du microbiote bactérien

Les organismes marins atteints par une infection peuvent présenter des microbiotes modifiés. Le microbiote hémolympatique d'huîtres creuses touchées par une infection à *Vibrio* sp. présente une diversité particulièrement faible accompagnée par la prolifération de quelques taxons appartenant au genre *Arcobacter* (Lokmer and Mathias Wegner, 2015). Dans le cadre d'une infection d'huîtres creuses juvéniles au POMS, certains taxons ont pu être associés à la sensibilité/résistance des huîtres au syndrome (Delisle *et al.*, 2022). D'autre part, une perturbation importante du microbiote digestif d'huître creuse a été observée lors d'une infection par *Vibrio alginolyticus*, avec une prolifération de certains taxons (Li *et al.*, 2022).

De plus, la salinité et la température sont deux facteurs environnementaux qui peuvent favoriser le développement d'infections chez l'huître (Gignoux-Wolfsohn *et al.*, 2020). Les facteurs environnementaux impactent en effet les communautés bactériennes en place. L'augmentation de la température d'acclimatation d'huîtres creuses de 8 à 22°C cause une modification des dynamiques de structure du microbiote hémolympatique avec des changements d'abondances relatives des communautés, ce qui montre bien la plasticité de ce dernier face à un stress environnemental (Lokmer and Mathias Wegner, 2015). De plus, une baisse de la salinité de l'eau de mer a engendré une réduction significative de la richesse et de la diversité du microbiote digestif d'huîtres creuses (Li *et al.*, 2022).

La chaîne de causalité entre déséquilibre du microbiote, développement d'une infection et mortalité est une problématique au centre de l'étude de ces épisodes infectieux. Pour démêler ces intrications hôte-microbiote-environnement, il est nécessaire d'adopter une vision holistique intégrant des études qui s'intéressent à l'hôte et son microbiote comme une seule et unique entité.

6. Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture

Les organismes marins sont exposés à une grande concentration de microorganismes présents dans l'eau de mer : ces concentrations sont estimées à 10^4 UFC/mL pour les bactéries (Zweifel and Hagstrom, 1995), 10^3 UFC/mL pour les champignons (Zinger *et al.*, 2012) et 3.10^6 virus/mL (Suttle, 2005). Cette forte pression microbienne, notamment appliquée sur les

invertébrés marins, en font des modèles d'études particulièrement intéressants afin d'explorer la théorie de l'hologénome (Offret *et al.*, 2019b). Le microbiote cultivable des liquides circulatoires d'huîtres (*C. gigas* et *O. edulis*), de mollusques (*Mytilus edulis* et *Haliotis tuberculata*) et d'échinodermes (*Echinus esculentus* et *Holothuria forskali*) a été exploré (Defer *et al.*, 2013; Offret *et al.*, 2019b). Ainsi, l'hémolymphe des huîtres abrite de nombreuses souches qui présentent une activité antibactérienne contre des pathogènes aquacoles comme les bactéries du genre *Vibrio* ou encore *Aeromonas* (Defer *et al.*, 2013).

Parmi ces souches, des bactéries du genre *Pseudoalteromonas* produisant des peptides antimicrobiens, les altérines, ont pu être isolées et caractérisées. Ces souches de *Pseudoalteromonas* ont été étudiées pour leur potentiel probiotiques en élevage d'ormeaux (Offret *et al.*, 2019c) et également chez le bar commun (Rahmani *et al.*, 2023). Dans les deux cas, ces souches potentielles probiotiques ont été mises en présence des espèces d'élevage par balnéation (10^6 UFC/mL pendant 4h) en usage préventif, avant épreuve infectieuse par une souche de l'espèce *Vibrio harveyi*. Une augmentation significative de la survie de l'ordre de 25% a pu être observée pour ces deux espèces. De plus, l'addition des souches probiotiques de *Pseudoalteromonas* a permis la réduction de l'épaisseur maximale du biofilm dans les bassins d'élevage (Rahmani *et al.*, 2023). Les souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines présentent donc une activité antibactérienne *in vitro* et un effet probiotique en élevage d'ormeaux et de bars.

Ce projet de thèse étudie l'effet des souches de *Pseudoalteromonas* en élevage ostréicole. Dans un premier temps, des analyses *in silico* des génomes des souches de *Pseudoalteromonas* ont été réalisées afin d'évaluer si ces souches respectent les critères réglementaires pour pouvoir prétendre au statut de probiotique : sont également caractérisés les peptides antimicrobiens produits par ces souches. Ensuite, un essai *in vivo* sur une maturation sexuelle de l'huître plate *Ostrea edulis* a permis une première observation des communautés bactériennes associées à cet élevage et également d'évaluer l'incidence des souches de *Pseudoalteromonas* sur ces communautés ainsi que sur d'autres paramètres comme la survie des huîtres et la formation du biofilm. Enfin, le devenir des souches de *Pseudoalteromonas* ainsi que des altérines qu'elles produisent a pu être observée chez l'Humain grâce à des essais de digestion *in vitro* permettant de suivre leur digestion dans différents compartiments du tractus gastro-intestinal.

CHAPITRE 1 - CARACTÉRISATION DES SOUCHES DU GENRE *PSEUDOALTEROMONAS* COMME POTENTIELS PROBIOTIQUES : ÉTUDES *IN SILICO* ET *IN VITRO*

1. Introduction

1.1. Criblage de candidats probiotiques

L'un des critères communément utilisés pour la sélection d'une souche bactérienne comme probiotique est une activité antimicrobienne et/ou antibiofilm *in vitro* contre des bactéries pathogènes humains ou aquacoles pour l'hôte (Contente et al., 2024; Defer et al., 2013). En effet, de nombreux probiotiques produisent des composés antimicrobiens comme des bactériocines ou encore des lipopeptides (El-Saadony et al., 2021). Ces composés peuvent participer activement à la bioprotection d'une espèce en cas d'infection (Pérez-Sánchez et al., 2018). C'est le cas de la nisine Z produite par une souche de *Lactococcus lactis*. Cette dernière améliore la survie de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) lors d'une infection à *Lactococcus garvieae* (Araújo et al., 2015). La caractérisation d'un probiotique ne se limite cependant pas à son action antimicrobienne. Un probiotique peut également être sélectionné pour (i) sa capacité à coloniser le tractus gastro-intestinal, (ii) la production d'enzymes pouvant améliorer la digestibilité des nutriments par les espèces d'élevage, (iii) la production de molécules qui améliorent indirectement la tolérance de l'hôte au stress (Shokryazdan et al., 2017).

Des analyses de génomes des souches étudiées comme probiotiques sont également réalisées en complément des études *in vitro/in vivo* (Dindhoria et al., 2022; Panthee et al., 2021; Rizzo et al., 2022; Wang et al., 2024). Ces études permettent d'explorer les génomes pour identifier des gènes putatifs impliqués dans la pathogénicité d'une bactérie, ou de supposer la production d'enzymes d'intérêt ou de métabolites secondaires (Contente et al., 2024). Dans le cadre d'une mise sur le marché d'un probiotique en tant qu'additif alimentaire, des recommandations ont en effet été publiées par l'EFSA (*European Food Safety Authority*) concernant des vérifications à réaliser sur les génomes entiers des microorganismes (EFSA, 2021) pour prétendre à une autorisation de mise sur le marché. Ces analyses *in silico* participent ainsi à l'évaluation de l'innocuité d'un microorganisme, en permettant une identification taxinomique fine en complément des études phénotypiques (Shokryazdan et al., 2017), et

d'autre part de détecter d'éventuels gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des facteurs de virulence.

1.2. Bactéries d'intérêt du genre *Pseudoalteromonas*

Le genre *Pseudoalteromonas* appartient à l'ordre *Alteromonadales* de la classe des γ -*Proteobacteria*. Ce genre a été défini pour la première fois par Gauthier *et al.*, 1995 qui ont alors suggéré la division du genre *Alteromonas* avec la création d'un nouveau genre: le genre *Pseudoalteromonas*. Le genre *Pseudoalteromonas* rassemble des bactéries marines à Gram négatif, aérobies, hétérotrophes et présentant un flagelle. Les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* sont des bactéries commensales associées à des animaux et des végétaux marins (Ivanova *et al.*, 1998; Offret *et al.*, 2016). Le fait que ces bactéries soient associées à des macroorganismes suggère un rôle écologique important (Bowman, 2007). De plus, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* se distinguent par leur production notable de métabolites secondaires, notamment antimicrobiens (Bowman, 2007; Offret *et al.*, 2016).

Des souches du genre *Pseudoalteromonas*, phylogénétiquement proches (Annexes, Figure A1) et présentant des activités antibactériennes ont été isolées à partir de l'hémolymphe de bivalves sains :

- Les souches hCg-6 et hCg-42 appartenant à l'espèce *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* (Defer *et al.*, 2013) ont été isolées à partir de l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* ;
- Les souches hOe-66^T, hOe-124 et hOe-125 appartenant à l'espèce *Pseudoalteromonas ostreae* (Cuny *et al.*, 2021) ont été isolées à partir de l'hémolymphe de l'huître plate *Ostrea edulis*.

1.3. Les altérines, famille de cyclolipopeptides antimicrobiens

Les souches de *Pseudoalteromonas* hOe-66, hOe-124, hOe-125, hCg-6 et hCg-42 produisent une famille de cyclolipopeptides cationiques antibactériens appelés altérines (Figure 3).

1.3.1. Structure et chimiodiversité

Les altérines présentent une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram négatif (Offret *et al.*, 2022). Ces peptides sont composés d'un cycle heptapeptidique cationique et d'une chaîne hydrocarbonée liés par une liaison peptidique. Le cycle est composé de 5 résidus d'acides aminés exotiques et de 2 résidus d'acides aminés standards. Il présente quatre charges positives à pH 7 : sur l'arginine de la position 5, sur les deux acides β -hydroxy-diaminobutyrique (β -HO-Dab) en positions 6 et 7 et sur l'acide diaminobutyrique (Dab) de la position 3. Ces charges positives sont dues à la présence d'une fonction amine libre sur la chaîne latérale des acides aminés. De plus, dans le cycle figurent deux résidus hydrophobes : la Leucine en position 4 et la déhydrobutyrine (Dhb) en position 2 (Desriac *et al.*, 2020).

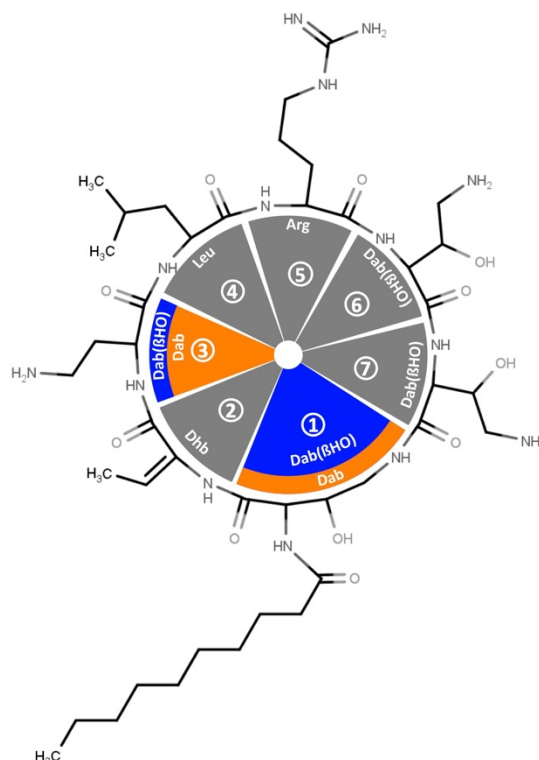


Figure 3. Structure des altérines d'après Offret *et al.*, 2022.

La chimiodiversité de ces peptides a été caractérisée : 37 analogues ont été caractérisés par MS/MS (Figure 3). Ces variations concernent la longueur de la chaîne hydrocarbonée et la composition en acides aminés sur le cycle heptapeptidique. En effet, les acides aminés en position 1 et 3 sont soit des β -HO-Dab soit des Dab. En revanche, la Dab en position 3 n'est jamais présente sous forme hydroxylée.

La longueur de la chaîne hydrocarbonée varie de C₈ à C₁₃. Ainsi, les masses moléculaires des altérines caractérisées sont comprises entre 926 et 998 Da (Offret *et al.*, 2022).

1.3.2. Résidus β -HO-Dab chez d'autres familles de peptides

Les résidus β -HO-Dab sont très rarement décrits dans les structures primaires de peptides naturels. Ces derniers sont également présents au sein de deux autres familles de peptides, les ogipeptines et les odilorhabdines :

- Les ogipeptines présentent une structure très similaire à celle des altérines et ne diffèrent que par la configuration de la double liaison présente sur la chaîne latérale de la Dhb. Ces peptides sont également produits par une souche du genre *Pseudoalteromonas*, la souche SANK 71903, avec trois β -HO-Dab au sein de leur cycle heptapeptidique liés par une liaison peptidique à une chaîne hydrocarbonée de longueur variable (ogipeptines A, B, C et D). Elles interagissent avec les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif et inhibent leur interaction avec des récepteurs cellulaires. Cette interaction est une étape-clé dans le déclenchement de chocs septiques car elle entraîne une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Hirota-Takahata *et al.*, 2017; Takiguchi *et al.*, 2022) ;
- Les odilorhabdines sont des peptides produits par la bactérie à Gram négatif *Xenorhabdus nematophila*, qui ont une activité antimicrobienne à large spectre (bactéries à Gram négatif et à Gram positif). Ces peptides agissent en interférant avec la biosynthèse des protéines au niveau du ribosome de leur cible. Ces peptides linéaires sont composés de 11 résidus et présentent en positions 2 et 3 des β -HO-Dab. Le résidu β -HO-Dab en position 2 joue un rôle important dans l'activité de ces peptides puisque sa substitution par une alanine entraîne une perte importante d'activité (Pantel *et al.*, 2018; Sarciaux *et al.*, 2018).

1.4. Les polymyxines

1.4.1. Structure

Les altérines présentent des analogies structurales avec la famille des polymyxines, antibiotiques conventionnels produits par les bactéries du genre *Paenibacillus*. Ces peptides cationiques ont des effets antibactériens contre la plupart des bactéries à Gram négatif, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou encore *Acinetobacter baumannii* (Alfei and Schito, 2020). La polymyxine B (mélange de polymyxine B₁ et B₂) est isolée à partir de *Paenibacillus polymyxa* (Trimble *et al.*, 2016) qui, comme les altérines, est composée d'un cycle

heptapeptidique et d'une chaîne hydrocarbonée (Figure 4). Cependant, la polymyxine B ne présente pas de résidus β -HO-Dab mais de nombreux résidus Dab, à la fois sur son cycle heptapeptidique et sur le tripeptide de connexion qui fait la liaison entre le cycle et la chaîne hydrocarbonée et qui n'est pas présent chez les altérines.

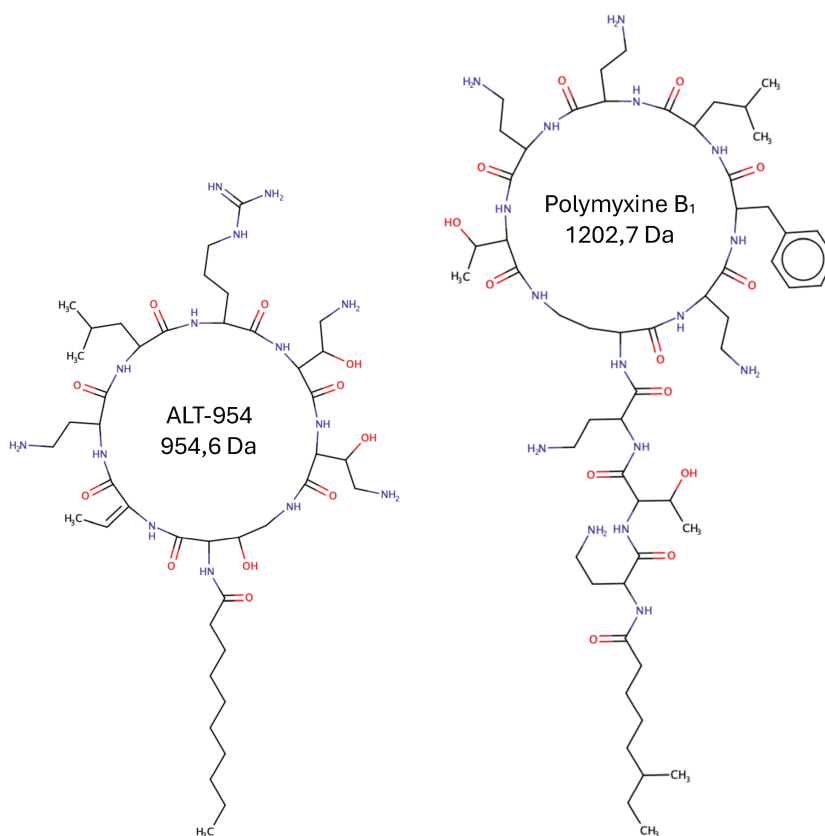


Figure 4. Structures d'un isoforme de la famille des altérines et de la polymyxine B₁. Les poids moléculaires indiquées correspondent aux masses mono-isotopiques de ces peptides. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel MarvinSketch (24.3.0 ; Chemaxon, 2024).

Les relations structure-activité des polymyxines ont fait l'objet de nombreuses études (Sakura *et al.*, 2004; Slingerland and Martin, 2024; Velkov *et al.*, 2010). Cinq éléments structuraux essentiels ont pu être décrits : (i) le cycle heptapeptidique, (ii) la répartition des résidus cationiques et (iii) hydrophobes, (iv) le tripeptide de connexion et (v) la chaîne hydrocarbonée. Bien que des homologies de structure avec les altérines soient évidentes, les éléments (ii), (iii) et (v) indispensables à l'activité de polymyxines diffèrent dans la structure des altérines.

La polymyxine B et la colistine (polymyxine E) se distinguent au niveau d'un acide aminé du cycle heptapeptidique : la phénylalanine de la polymyxine B est remplacée par une leucine pour la colistine (Poirel *et al.*, 2017). Ces deux polymyxines (B et E) sont utilisées comme antibiotiques de dernière intention, notamment lorsque la souche ciblée présente une multirésistance à différents antibiotiques comme les β -lactamines (carbapénèmes et céphalosporines troisième génération), les aminosides et les fluoroquinolones (Mohapatra *et al.*, 2021). Leur usage clinique est en effet limité par leur néphrotoxicité, due à une accumulation de ces antibiotiques dans les cellules rénales (Zavascki and Nation, 2017).

1.4.2. Mode d'action et spectre d'activité

Le mode d'action des polymyxines implique une interaction avec le lipopolysaccharide ou LPS (Poirel *et al.*, 2017). Le LPS est composé de trois domaines (Lin *et al.*, 2020) : le lipide A, le noyau polysaccharidique et l'antigène O (ou O-polysaccharide). Il est situé sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Bertani and Ruiz, 2018).

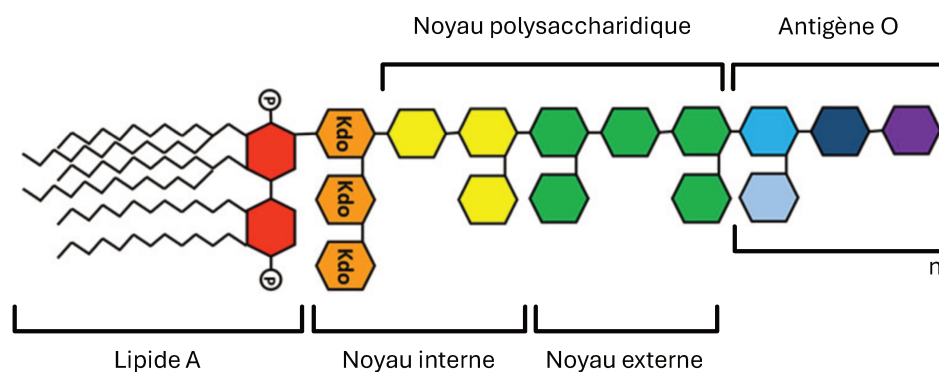


Figure 5. Structure schématique du LPS des bactéries à Gram négatif, adapté de Lin *et al.*, 2020.

Les charges positives des résidus Dab des polymyxines interagissent avec les charges négatives des phosphates du lipide A libérant les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} initialement liés aux phosphates et provoquant une dépolarisation de la membrane externe puis une fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la cellule (Alfei and Schito, 2020).

Les altérines présentent un mode d'action similaire à celui des polymyxines. Les étapes d'interaction avec le LPS de la bactérie cible, de dépolarisation de la membrane et enfin de lyse cellulaire ont pu être en effet caractérisées pour différents isoformes de cette famille (Desriac *et al.*, 2020; Offret *et al.*, 2022). Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des altérines

sont de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre un panel de bactéries potentiellement pathogènes, notamment des genres *Vibrio*, *Escherichia* ou encore *Aeromonas* (Desriac *et al.*, 2020).

Caractérisation des souches de *Pseudoalteromonas* comme potentiels probiotiques

Les souches de *Pseudoalteromonas* étudiées sont donc associées à des bivalves sains et produisent des peptides antimicrobiens d'intérêt, les altérines. Ces deux caractéristiques ont conduit à leur sélection pour évaluer leur potentiel probiotique en aquaculture et dans le cadre de ce projet de thèse pour une application en ostréiculture. L'objectif de ce premier chapitre est de caractériser les souches de *P. rhizosphaerae* (hCg-6, hCg-42) et *P. ostreae* (hOe-124, hOe-125) par (i) des analyses de leur génome *in silico* et (ii) une étude de leur spectre d'activité antimicrobienne *in vitro*. L'étude de ce spectre d'activité antimicrobienne a mené à (iii) la purification et l'étude du spectre d'activité de cinq isoformes d'altérines.

2. Matériel et méthodes

2.1. Analyse des génomes des souches de *Pseudoalteromonas*

2.1.1. Séquençage et plateforme d'analyse

Les génomes des cinq souches de *Pseudoalteromonas* ont été séquencés à l'aide d'un double séquençage Illumina MiSeq PE250/Nanopore Minlon et un assemblage hybride unicycler (v0.4.8) par l'unité de recherche CBSA (Communication Bactérienne et Stratégies Anti-Infectieuses) de l'Université de Rouen. Les numéros d'accession des souches déposées sur NCBI sont :

- *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66 : CP118912-CP118913 ;
- *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-124 : CP118916-CP118917 ;
- *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-125 : CP118914-CP118915 ;
- *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-6 : CP102351-CP102352 ;
- *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42 : CP118496-CP118498.

Les génomes assemblés ont été déposés sur la plateforme *MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform* (MaGe v3.17.2 ; Vallenet *et al.*, 2006) pour annotations. Les séquences codantes ou CDS présentes dans les génomes sont ainsi implémentées sur MaGe pour permettre la recherche de potentiels gènes de résistance et facteurs de virulence.

2.1.2. Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence

L'analyse des génomes des souches de *Pseudoalteromonas* a été conduite sur la plateforme MaGe. La recherche de gènes de résistance aux antibiotiques a été réalisée en interrogeant la base de données CARD, *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (Alcock *et al.*, 2022). L'objectif de la base de données CARD est de compiler toutes les connaissances concernant les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) en utilisant la base de données GenBank du *National Institute of Health* (NIH) (Benson *et al.*, 2013). À ces ARGs sont associés, autant que possible, les mécanismes de résistance décrits dans la littérature et les antibiotiques concernés par cette résistance. Cette fonction de la base de données est nommée *Antibiotic Resistance Ontology* ou ARO (McArthur *et al.*, 2013). Concernant les facteurs de virulence, deux bases de données ont été interrogées : VFDB (*Virulence Factor Database*) et VirulenceFinder. La base de données VFDB recense tous les gènes impliqués dans la virulence de bactéries pathogènes en santé humaine (Liu *et al.*, 2022). VirulenceFinder est une base de données focalisée sur l'étude des souches pathogènes d'*E. coli* (Malberg Tetzschner *et al.*, 2020).

2.1.3. Alignement des séquences

La méthode d'analyse des génomes des souches étudiées est la même pour l'identification des ARGs et des facteurs de virulence. L'outil BLAST ou *Basic Alignment Tool* (Altschul *et al.*, 1990) permet une comparaison des séquences par alignement local de zones de similarités en calculant un score de *Maximum Sequence Pair* (MSP). L'algorithme BLAST cible une zone locale d'appariement entre la séquence étudiée et une séquence issue de la base de données avant d'étendre l'alignement sur le reste des deux séquences. Un score d'identité et un score de recouvrement sont ensuite calculés pour mieux appréhender les similarités entre les deux séquences étudiées. Le score d'identité est calculé en faisant le rapport entre le nombre d'appariements identiques et le nombre total d'appariements. Le recouvrement représente la proportion de la séquence cible utilisée pour l'alignement (Altschul *et al.*, 1990; McGinnis and Madden, 2004). Dans le cadre des analyses sur MaGe, les alignements ont été réalisés sur des séquences protéiques (BLASTp), ce qui permet d'enlever les biais lors des modifications post-traductionnelles. L'EFSA préconise un seuil de score d'identité de 80% et un score de recouvrement de 70% pour considérer la possibilité qu'un gène identifié soit présent au sein du génome. Cependant, d'autres scores seuils sont proposés dans la littérature. Des CDS identifiés avec des scores de 50-80% d'identité et 80-90% de recouvrement (Dindhorja *et al.*, 2022; Li *et*

al., 2017; Moravkova *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2022) sont ainsi étudiés comme potentiels gènes de résistance ou facteurs de virulence. D'autres études estiment qu'un gène peut être considéré comme présent au sein d'un génome dès lors que des valeurs minimales d'identité de 90% et de recouvrement de 60% sont observées (Afzal *et al.*, 2022).

Les seuils de score d'identité et de recouvrement, dans le cadre de la recherche de facteurs de virulence, sont fixés à 70% et 80%, respectivement. Concernant la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques, toutes les séquences obtenues lors de l'interrogation de la base de données CARD ont été analysées. Le score d'identité seuil choisi est inférieur au seuil recommandé par l'EFSA, afin d'adopter une approche plus précautionneuse et d'apprécier tous les gènes pouvant potentiellement être un obstacle à l'utilisation des souches de *Pseudoalteromonas*.

2.2. Antibiogrammes

Afin de compléter les analyses de génome concernant les gènes de résistance aux antibiotiques, la sensibilité des souches de *Pseudoalteromonas* aux antibiotiques *in vitro* a été caractérisée par la réalisation d'antibiogrammes. Les souches de *Pseudoalteromonas* ont été cultivées pendant 24h à 18°C dans un milieu Marine Broth (MB, Difco™ 2216, Thermo Fisher, États-Unis) puis ajustées à une concentration de 10⁶ UFC/mL pour inondation de géloses Mueller-Hinton (Biokar Diagnostics, France) pendant 10 minutes. Après le temps d'inondation, l'excès de culture a été éliminé. Enfin, des disques des antibiotiques testés ont été déposés sur les géloses avant incubation à 18°C pendant 24h.

Les recommandations de la Société Française de Microbiologie (CASFM) ont été suivies concernant la charge du disque des antibiotiques testés et le contrôle qualité, réalisé avec la souche *E. coli* ATCC25922 à 35°C. Ainsi, l'amoxicilline (25 µg), la tétracycline (30 µg), la kanamycine (30 µg), l'érythromycine (15 µg), le triméthoprime/sulfaméthoxazole (25 µg), la fluméquine (30 µg) et l'enrofloxacin (5 µg) ont été testées.

2.3. Purification bioguidée des altérines

2.3.1. Culture des souches de *Pseudoalteromonas*

Une préculture de 5 mL de Marine Broth (MB, Difco™ 2216, Thermo Fisher, États-Unis) a été réalisée pour chaque souche de *Pseudoalteromonas* et incubée pendant 24h à 18°C sous

agitation à 100 rpm. Cette préculture a permis d'inoculer une culture de 100 mL de milieu minimum CD29 (Desriac *et al.*, 2020), incubée pendant 72h (18°C, 100 rpm). Pour la purification de chaque isoforme des altérines, une culture d'1 L de CD29 (inoculée avec 10 mL de préculture de MB) de la souche *P. rhizosphæræ* hCg-42 a été réalisée. Le surnageant de culture, obtenu par centrifugation à 7000g pendant 15min, a été filtré sur une membrane de 0,22 µm (Steritop[®], Merck Millipore, États-Unis). Le surnageant filtré a ensuite été déposé sur des colonnes d'extraction en phase solide SPE C18 2G/15mL à raison de 100 mL par colonne (Interchim, France). Les solvants A et B utilisés pour l'extraction en phase solide correspondent à de l'eau et de l'acétonitrile (ACN), respectivement. Ces solvants ont été acidifiés par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Ainsi, les colonnes C18 ont été conditionnées selon les recommandations du fournisseur en utilisant successivement des solutions de 10% A (90% B) puis 90% A (10 mL). Après passage du surnageant sur la colonne, un lavage a été réalisé avec 90% A (10 mL). Le mélange d'altérines a été élué avec une solution de 40% A (5 mL). Les éluats obtenus ont ensuite été lyophilisés, puis solubilisés dans 20% ACN 0,1% TFA (2 mL) pour analyses ultérieures. Au cours de cette purification, des tests antibactériens ont été effectués sur la culture, son surnageant et les éluats obtenus afin de détecter la présence des altérines à chaque étape, en utilisant la souche *Escherichia coli* SBS363 comme cible.

2.3.2. Séparation des altérines par HPLC semi-préparative

Les éluats obtenus ont ensuite été injectés sur HPLC semi-préparative composée d'une pompe binaire Waters 1525 et d'un détecteur à barrette de diodes Waters 2998 (Waters, États-Unis). Une colonne C18 NUCLEODUR HTec (VP 250/10, 5 µm ; Macherey-Nagel, Allemagne) thermostatée à 40°C a été utilisée. Les solvants utilisés ont été de l'H₂O et de l'ACN acidifiés à 0,1 et 0,07% de TFA, respectivement. Le débit appliqué est de 3 mL/min selon un gradient croissant d'ACN (Tableau 1). La longueur d'onde d'analyse du détecteur a été fixée à 220nm pour la détection des altérines. Les différentes fractions obtenues ont été collectées et conservées dans des tubes en verre (Fisherbrand[™], Thermo Fisher, États-Unis) puis lyophilisées et resolubilisées dans 20% ACN 0,1% TFA pour analyses en spectrométrie de masse.

Tableau 1. Gradient d'élution utilisé en HPLC semi-préparative pour séparer les altérines.

	H₂O 0,1% TFA	ACN 0,07% TFA
0 minute	80%	20%
5 minutes	80%	20%
23 minutes	72%	28%
41 minutes	66%	34%
42 minutes	40%	60%
44 minutes	40%	60%

2.3.3. Analyses en spectrométrie de masse UPLC-MS

L'utilisation de la spectrométrie de masse a permis d'observer la chimiodiversité des altérines purifiées à partir des éluats obtenus à l'étape 2.3.1. Les analyses UPLC-MS ont été réalisées sur un détecteur masse de type électrospray/triple quadripôle en mode positif (Micromass Quattro Micro, Waters, États-Unis). Le débit a été fixé à 0,4 mL/min, pour des injections de 10 µL sur une colonne en phase inverse ACQUITY UPLC HSS T3 (100/2.1, 1.8 µm ; Waters, États-Unis) thermostatée à 25°C. Les solvants utilisés pour les analyses ont été identiques aux conditions des analyses en HPLC semi-préparative, selon un gradient de concentration croissant en ACN (Tableau 2). Les tensions au niveau du capillaire et du cône d'échantillonnage ont été optimisées et réglées à 2,5 kV et 35 V, respectivement. Les températures de source et de désolvatation ont été définies à 120°C et de 500°C, respectivement. Les paramètres de la source et de détection ont permis la formation et la détection d'ions dichargés formés par double protonation des altérines : $[M+2H]^{2+}$, détectables en spectrométrie de masse pour de valeurs de m/z comprises entre 450 et 500 (avec $z=2$).

Tableau 2. Gradient d'élution utilisé en UPLC pour séparer les altérines.

	H₂O 0,1% TFA	ACN 0,07% TFA
0 minute	90%	10%
21 minutes	70%	30%
22 minutes	60%	40%
27 minutes	5%	95%

2.4. Spectre d'activité antibactérienne des altérines

2.4.1. Dosage des altérines

Pour quantifier les altérines purifiées, une méthode colorimétrique a été employée. Compte tenu de l'absence de standard d'altérine disponible chez les fournisseurs de produits chimiques, et compte tenu de la structure des altérines, la polymyxine B a été utilisée comme référence pour ce dosage. Les échantillons à tester ont donc été quantifiés par dosage colorimétrique des protéines à l'aide de méthode bicinchoninique ou BCA-assay. Le kit Micro-BC Assays UP75860 (Uptima, Interchim, France) a été utilisé, avec la polymyxine B (Sigma-Aldrich, États-Unis) comme référence pour la gamme étalon. Ces quantifications ont ensuite permis la préparation des solutions d'altérines pour la détermination des CMI. Une gamme de concentration décroissante a ainsi été réalisée par dilutions en cascade pour des concentrations finales allant de 64 µg/mL à 0,06 µg/mL dans des volumes de 5 mL d'eau déminéralisée stérile. Ces solutions ont été réalisées pour chaque échantillon d'altérine testée ainsi que pour la polymyxine B, utilisée comme contrôle.

2.4.2. Culture des bactéries cibles

Les bactéries utilisées comme cibles lors des tests antimicrobiens ont été remises en culture à partir de cryotubes sur des géloses Mueller-Hinton (Thermo Fisher, États-Unis) incubées à 22°C ou 35°C pendant 48 et 24h, respectivement (Tableau 3). Un 0,5 McFarland a ensuite été réalisé à partir des colonies obtenues (eq. $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL), puis dilué afin d'obtenir des solutions de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL (ISO 20776-1, 2019). Une majorité de bactéries à Gram négatif ont été sélectionnées, compte tenu du mode d'action des altérines (Tableau 3).

2.4.3. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Des volumes de 50 µL par puits des solutions d'altérines et de polymyxine B, ainsi que des suspensions de bactéries cibles, ont été déposés dans des microplaques (96 puits, Dutscher, France) à l'aide d'un auto-inoculateur Sensititre AIM (Thermo Fisher, États-Unis). Les microplaques ont ensuite été incubées aux températures optimales des différentes bactéries cibles testées (Tableau 3). Pour chaque bactérie cible, une microplaque FRCOL (32 µg/mL – 0,5 µg/mL ; Thermo Fisher, États-Unis) a été inoculée, permettant d'observer les concentrations minimales inhibitrices pour la colistine. Les Concentrations Minimales Inhibitrices des altérines ont été déterminées à 24 et 48h en suivant les recommandations du *Clinical and Laboratory*

Standards Institute ou CLSI (CLSI, 2020). La marge d'erreur doit être d'au moins deux dilutions pour que la différence entre deux CMI soit significative.

Tableau 3. Caractéristiques des bactéries cibles utilisées lors de la détermination des CMIs. La sensibilité à la colistine pour ces souches a pu être caractérisée et interprétée en suivant les recommandations l'EUCAST (EUCAST, 2024) et de Baron *et al.*, 2017 pour les souches du genre *Aeromonas*. Les appellations S, R et WT correspondent à Sensible, Résistant et *Wild-Type*. Le terme WT signifie que la souche testée présente une sensibilité à l'antibiotique testé similaire à une souche de type sauvage. La condition d'incubation A correspond à une incubation à 35°C pendant 24h et B à une incubation à 22°C pendant 48h. ND correspond à *non-déterminé*.

Bactérie cible	Coloration Gram	Type de pathogène	Sensibilité à la colistine	Conditions d'incubation
<i>Acinetobacter baumannii</i> CIP7034T	-	Santé humaine	S	A
<i>Aeromonas bestiarum</i> CIP7430T	-	Aquacole	WT	B
<i>Aeromonas salmonicida</i> CIP103209T	-	Aquacole	WT	B
<i>Aeromonas salmonicida</i> (collection ANSES)	-	Aquacole	ND	B
<i>Aeromonas veronii</i> CIP103438T	-	Aquacole, animal et santé humaine (zoonotique)	WT	A
<i>Enterococcus faecium</i> VanA	+	Santé humaine	ND	A
<i>Escherichia coli</i> CIP7624	-	Santé humaine	S	A
<i>Escherichia coli</i> mcr-1 UB15-307	-	Santé humaine	R	A
<i>Escherichia coli</i> UB12-246M STEC ¹	-	Santé humaine (zoonotique)	R	A
<i>Escherichia coli</i> UB12-269M ETEC ²	-	Santé humaine (zoonotique)	R	A
<i>Escherichia coli</i> UB19-383M APEC ³	-	Santé humaine (zoonotique)	S	A
<i>Pasteurella multocida</i> PM03	-	Animal	ND	A
<i>Pasteurella multocida</i> PM329	-	Animal	ND	A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP76110	-	Santé humaine	S	A
<i>Salmonella typhimurium</i> UB06-195	-	Santé humaine	S	A
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP7625	+	Santé humaine	ND	A
<i>Vibrio anguillarum</i> CIP103438T	-	Aquacole	ND	B
<i>Vibrio harveyi</i> CIP104774	-	Aquacole	ND	B
<i>Vibrio harveyi</i> CIP105614	-	Aquacole	ND	B
<i>Yersinia ruckeri</i> CIP8280T	-	Aquacole	ND	B

¹ STEC : souche entérohémorragique

² ETEC : souche entérotoxigène

³ APEC : souche pathogène aviaire

3. Résultats

3.1. Analyse des génomes

Les génomes séquencés des différentes souches de *Pseudoalteromonas* ont permis d'identifier les plasmides et les chromosomes associés (Tableau 4). Ces génomes ont ensuite été déposés sur le plateforme MaGe pour annotations et analyses (Figure 6).

Tableau 4. Résultats de l'assemblage des génomes des souches de *Pseudoalteromonas*. La taille des chromosomes et plasmides (pb = paires de bases) est indiquée, ainsi que leur teneur en GC (% GC) et le nombre de CDS (CDS) prédits par MaGe. Lorsque 2, les chromosomes sont distincts.

	Nombre de plasmides	Plasmides (taille-%GC-CDS)	Nombre de chromosomes	Chromosomes (taille-%GC-CDS)
<i>P. ostreae</i> hOe-66	0	-	2	3,8 Mpb - 40,45% - 3523 0,9 Mpb - 39,97% - 790
<i>P. ostreae</i> hOe-124	0	-	2	3,8 Mpb - 40,45% - 3531 0,9 Mpb - 39,97% - 790
<i>P. ostreae</i> hOe-125	0	-	2	3,8 Mpb - 40,5% - 3532 0,9 Mpb - 39,9% - 793
<i>P. rhizosphaerae</i> hCg-6	0	-	2	4,4 Mpb - 40,6% - 4010 1,0 Mpb - 39,9% - 882
<i>P. rhizosphaerae</i> hCg-42	2	23,9 kpb - 42,5% - 18 3,9 kpb - 40,8% - 4	1	5,3 Mpb - 42,53% - 4770

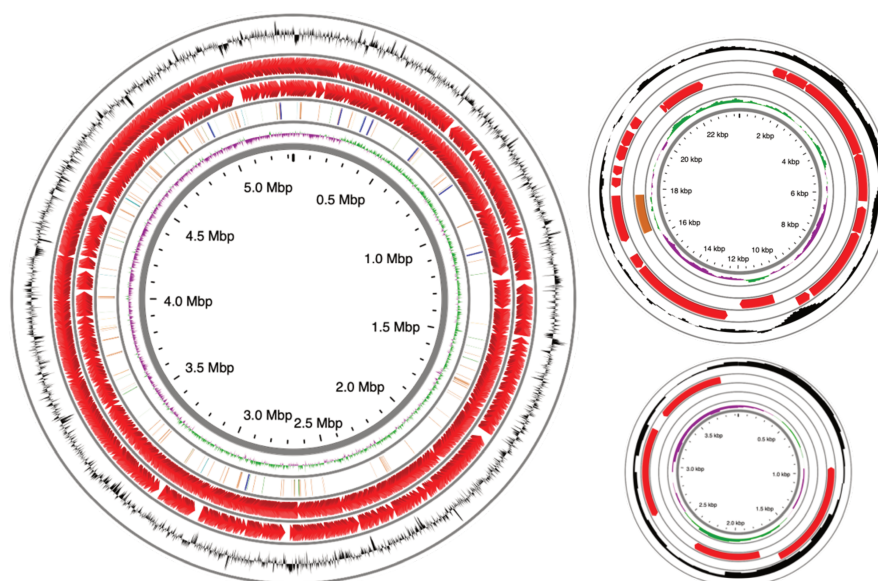


Figure 6. Représentations circulaires du chromosome et des deux plasmides assemblés de la souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42. Sur le cercle extérieur sont indiqués en noir la teneur en GC, puis en rouge les CDS, les différentes séquences correspondant à des ARNs et enfin le GC-skew (G-C/G+C).

L'analyse *in silico* des génomes des souches de *Pseudoalteromonas* indique à la fois les putatifs gènes de résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence prédits mais également la littérature associée à ces prédictions.

3.2. Résistance aux antibiotiques : analyses *in silico* et *in vitro*

3.2.1. Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques

L'interrogation de la base de données CARD (sans score d'identité seuil) a permis d'identifier 4 CDS pouvant correspondre à des gènes codant des mécanismes de résistance aux antibiotiques parmi les génomes des 5 souches de *Pseudoalteromonas* (Tableau 5).

Tableau 5. CDS identifiés comme potentiels gènes de résistance par la base de données CARD. Les pourcentages d'identité et de recouvrement sont écrits comme suit : % d'identité [% de recouvrement]. Les souches hOe-66, hOe-124 et hOe-125 présentent les mêmes résultats lors de l'interrogation de la base de données et sont donc rassemblés sous la mention *P. ostreae* hOe-. De la même manière, les souches hCg-6 et hCg-42 apparaissent sous la mention *P. rhizosphaerae* hCg-.

	<i>P. ostreae</i> hOe-	<i>P. rhizosphaerae</i> hCg-	CDS (microorganisme)	Fonction
<i>bepE</i>	63 [98]	63 [98]	<i>adeF</i> (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	Pompe à efflux RND (Resistance-Nodulation-Division)
<i>bepE</i>	45 [97]	45 [97]		
<i>acrF</i>	43 [99]	43 [99]		
<i>acrB</i>	-	63 [99]		

Les séquences codantes *bepE* (présentes en 2 copies dans le génome des souches), *acrF* et *acrB* ont une correspondance avec le CDS *adeF* présent chez *A. baumannii*. Ce CDS fait partie d'un opéron qui code une pompe à efflux de type RND nommée AdeFGH (Coyne *et al.*, 2010). Les pompes à efflux sont des transporteurs permettant l'efflux de l'antibiotique par la bactérie, empêchant ainsi une accumulation dans la cellule à des concentrations efficaces. Ce mécanisme fait partie des quatre mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques ; les trois premiers étant la modification du site cible, la modification/destruction de l'antibiotique et la réduction de l'influx de l'antibiotique par une perméabilité membranaire diminuée (Laws *et al.*, 2019).

Caractéristiques d'une résistance aux antibiotiques chez une souche bactérienne, ces pompes contribuent également à des fonctions physiologiques impliquées dans la virulence bactérienne. En effet, les pompes à efflux confèrent à la bactérie une meilleure résistance à des substances naturelles produites par l'Homme comme la bile (Lin *et al.*, 2003). De plus, les pompes à efflux de type RND sont impliquées dans la colonisation et la persistance de la bactérie chez l'hôte (Piddock, 2006).

Les pompes de type RND sont des complexes protéiques ternaires et traversent les deux membranes des bactéries à Gram négatif. Ces pompes sont composées d'une protéine de jonction périplasmique qui lie une pompe transmembranaire, située sur la membrane interne et une porine de la membrane externe (Cattoir, 2004). Les pompes à efflux RND captent des substrats présents dans l'espace périplasmique et les expulsent hors de la cellule bactérienne. Ces pompes à efflux peuvent transporter des antibiotiques de plusieurs classes et participent ainsi à l'émergence des bactéries multi-résistantes (Colclough *et al.*, 2020). Au-delà de leur implication dans la résistance aux antibiotiques, les pompes à efflux de type RND permettent notamment la détoxification de composés intermédiaires issus du métabolisme de la bactérie (Alvarez-Ortega *et al.*, 2013). Ces pompes participent plus globalement au bon fonctionnement de la cellule (Yoon *et al.*, 2015).

La pompe à efflux AdeFGH est régulée par un opéron constitué des CDS *adeL*, *adeF*, *adeG* et *adeH*. Chez des souches d'*A. baumannii* que la résistance aux antibiotiques conférée par cette pompe à efflux est liée à la surexpression de cet opéron (Zack *et al.*, 2024). Cette surexpression a été observée concomitamment à des mutations présentes sur le CDS *adeL* qui est un régulateur de transcription placé en amont de l'opéron. Les résistances aux antibiotiques qui en résultent sont observées contre la famille des fluoroquinolones (*i.e.* la ciprofloxacine, la moxifloxacine et la norfloxacine), des cyclines (tétracycline- tigécycline), le chloramphénicol, la clindamycine, le triméthoprim et le sulfaméthoxazole. Les souches d'*A. baumannii* résistantes à ces antibiotiques présentent également une résistance à des colorants comme la safranine O, l'orange d'acridine et des agents intercalants tels que le bromure d'éthidium (Coyne *et al.*, 2010).

Toutefois, c'est uniquement le CDS *adeF* de cet opéron qui est associé à certaines séquences codantes des génomes de souches de *Pseudoalteromonas* étudiées (Tableau 5). Ce CDS code la

protéine de jonction périplasmique, une des trois protéines nécessaires au fonctionnement de la pompe à efflux AdeFGH. De plus, ces gènes de résistance putatifs ont été identifiés à des scores d'identité inférieurs aux critères seuils imposés par l'EFSA pour analyse (EFSA, 2021). L'analyse *in silico* des souches de *Pseudoalteromonas* ne suggère donc aucune résistance particulière aux antibiotiques.

3.2.2. Antibiogrammes

Des antibiogrammes ont été réalisés afin de compléter les données obtenues lors de la recherche *in silico* de gènes de résistance aux antibiotiques. Les zones d'inhibition obtenues (Tableau 6) ont été mesurées pour chaque souche de *Pseudoalteromonas* contre différents antibiotiques notamment utilisés en aquaculture (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). Aucune valeur seuil n'a été instaurée par les normes (*Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI et *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* ou EUCAST) pour ce genre bactérien, ce qui ne permet donc pas d'inférer la sensibilité et/ou la résistance des souches de *Pseudoalteromonas* à ces différents antibiotiques. Néanmoins, des halos d'inhibition similaires ont pu être observés entre les souches de *Pseudoalteromonas* et plus particulièrement entre les souches des mêmes espèces.

Tableau 6. Résultats obtenus pour les souches de *Pseudoalteromonas* contre divers antibiotiques. Les diamètres des zones d'inhibition sont indiqués en millimètres.

Antibiotique (charge en µg)	hOe-66	hOe-124	hOe-125	hCg-6	hCg-42
Amoxicilline (25)	20	21	20	37	35
Tétracycline (30)	29	28	28	33	30
Kanamycine (30)	19	20	19	25	24
Érythromycine	31	26	24	36	36
Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (25)	36	31	30	33	28
Fluméquine (30)	45	44	44	47	51
Enrofloxacin (5)	40	40	39	44	47

3.3. Recherche de facteurs de virulence

En augmentant le seuil de détection des CDS à 70% d'identité, aucun résultat n'a été obtenu pour la base de données VFDB. En ce qui concerne la base de données Virulence Finder ; six CDS ont été détectés comme potentiels facteurs de virulence (Tableau 7).

Tableau 7. CDS identifiés comme potentiels facteurs de virulence par la base de données VirulenceFinder. Les pourcentages d'identité et de recouvrement sont écrits comme suit : % d'identité [% de recouvrement].

	<i>P. ostreae</i> hOe-	<i>P. rhizosphaerae</i> hCg-	CDS (microorganisme)	Fonction
<i>yggR</i>	75 [100]	75 [100]	<i>pilT</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Motilité
<i>yggR</i>	72 [100]	72 [100]		
<i>groL</i>	74 [96]	74 [96]	<i>htpB</i> (<i>Legionella pneumophila</i>)	Résistance stress thermique
<i>wpbD</i>	73 [93]	73 [93]	<i>bplB</i> (<i>Bordetella pertussis</i>)	Acétyltransférase
<i>katG</i>	72 [93]	72 [93]	<i>katB</i> (<i>Legionella pneumophila</i>)	Catalase/hydroperoxydase
<i>galU</i>	72 [95]	-	<i>galU</i> (<i>Haemophilus influenza</i>)	Uridylyltransférase

Deux CDS présents dans les génomes des souches de *Pseudoalteromonas* ont montré une forte similarité avec *pilT*, un CDS de *P. aeruginosa*. Ce CDS code une ATPase impliquée dans la mobilité des pili de type IV. Les pili de type IV sont présents à la surface des bactéries à Gram négatif. Ces pili permettent une motilité saccadée ou *twitching motility* résultant de cycles de polymérisation et de dépolymérisation rapides. Les pili peuvent ainsi jouer un rôle dans la colonisation du milieu par la bactérie (Craig *et al.*, 2019). Les pili de type IV sont nécessaires à l'injection d'effecteurs ExoS de type III dans les cellules épithéliales humaines, facilitant ainsi l'insertion de la souche pathogène *P. aeruginosa* (Shikata *et al.*, 2016).

Le deuxième CDS identifié est le gène *htpB* qui code une protéine de type *heat-shock* : ce CDS est présent dans le génome des bactéries de l'espèce *L. pneumophila* (Lebeau *et al.*, 2005). Les protéines *heat-shock* sont des protéines chaperonnes qui aident au repliement d'autres protéines, à maintenir l'homéostasie des cellules et à la survie des organismes en cas de changement de température ou encore en situation de stress (Hu *et al.*, 2022). Par exemple, la protéine *heat-shock* Hsp60 joue un rôle de protéine chaperonne chez *Helicobacter pylori* en cas de stress thermique (Mendoza *et al.*, 2021). Les protéines *heat-shock* peuvent également jouer un rôle dans la virulence des souches pathogènes en les aidant à s'adapter à des

environnements stressants comme à un stress oxydatif ou une température de 42°C pour *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Zhang *et al.*, 2022).

Les trois derniers CDS identifiés comme potentiels facteurs de virulence dans le génome des *Pseudoalteromonas* correspondent à des enzymes jouant un rôle dans le fonctionnement classique d'une cellule bactérienne (métabolisme primaire) : une acétyltransférase (*pblB*), une catalase (*katB*) et une uridylytransférase (*galU*). L'acétylation est une modification post-traductionnelle couramment retrouvée chez les protéines, modulant différents processus cellulaires. Les acétyltransférases sont impliquées dans la régulation du métabolisme des bactéries, leur permettant de s'adapter à différents environnements (Dash and Modak, 2021). Cette adaptation peut néanmoins poser problème lorsque la bactérie est pathogène car cela peut aider à sa survie, ce qui en fait un potentiel facteur de virulence (Wali *et al.*, 2015).

La catalase est une enzyme permettant une résistance au stress oxydatif par dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce qui permet de réguler le taux d' H_2O_2 afin de protéger les cellules (Yuan *et al.*, 2021). Tout comme l'acétyltransférase, la catalase est donc liée à la survie des cellules et donc des bactéries, ce qui peut jouer un rôle dans la virulence d'une souche pathogène. Ainsi, la catalase KatG, par exemple, participe à la modulation de l'expression génétique d'îlots de virulence chez *Salmonella* afin de gérer les stress oxydatifs et maintenir la survie intracellulaire de la bactérie (Kirthika *et al.*, 2022).

La Glucose-1-phosphate uridylytransférase GalU permet la synthèse de l'UDP-glucose à partir de l' α -D-glucose 1-phosphate et de l'UTP tout en libérant du pyrophosphate. GalU joue un rôle dans le métabolisme des glucides de tous les organismes en permettant *in fine* la synthèse des oligo- et polysaccharides (Benini *et al.*, 2017).

Les facteurs de virulence présentant des similarités avec des CDS des souches de *Pseudoalteromonas* (pourcentage d'identité supérieur à 70) codent des protéines pouvant agir comme facteurs de virulence en cas de pathogénicité mais qui peuvent aussi participer en premier lieu au bon fonctionnement d'une bactérie. En effet, les homologies de séquence ont permis d'identifier une ATPase (*pilT*), une protéine *heat-shock* (*htpB*) et des enzymes participant au métabolisme des cellules bactériennes (*pblB*, *katB*, *galU*). Aucun CDS présent dans les génomes des souches de *Pseudoalteromonas* n'a été identifié comme codant des toxines, ce qui suggère l'absence de pathogénicité. En effet, de nombreux facteurs de virulence potentiels

sont associés à des bactéries commensales et peuvent être davantage caractérisés comme *facteurs d'interaction de l'hôte (host-interaction factors)* plutôt que facteurs de virulence (Ho Sui *et al.*, 2009). De plus, la détection de ces CDS a été réalisée à des pourcentages d'identité inférieurs à ceux préconisés par l'EFSA (EFSA, 2021). Les génomes des souches de *Pseudoalteromonas* ne présentent donc pas, d'après les critères de l'EFSA, de CDS à étudier en tant que potentiels facteurs de virulence.

3.4. Purification des isoformes d'altérines

La purification des différentes isoformes d'altérines a été réalisée à partir du surnageant de la souche *P. rhizosphaerae* hCg-42 et les isoformes d'altérines ont été séparés par HPLC en phase inverse (Figure 7). Les fractions récoltées ont ensuite été analysées par LC-MS (Annexes, Figure A2). Les valeurs de m/z détectées ont révélé la présence de six altérines, dont cinq ont été purifiées en quantité suffisante pour évaluer leurs CMI sur différentes bactéries cibles. (Annexes, Figure A3).

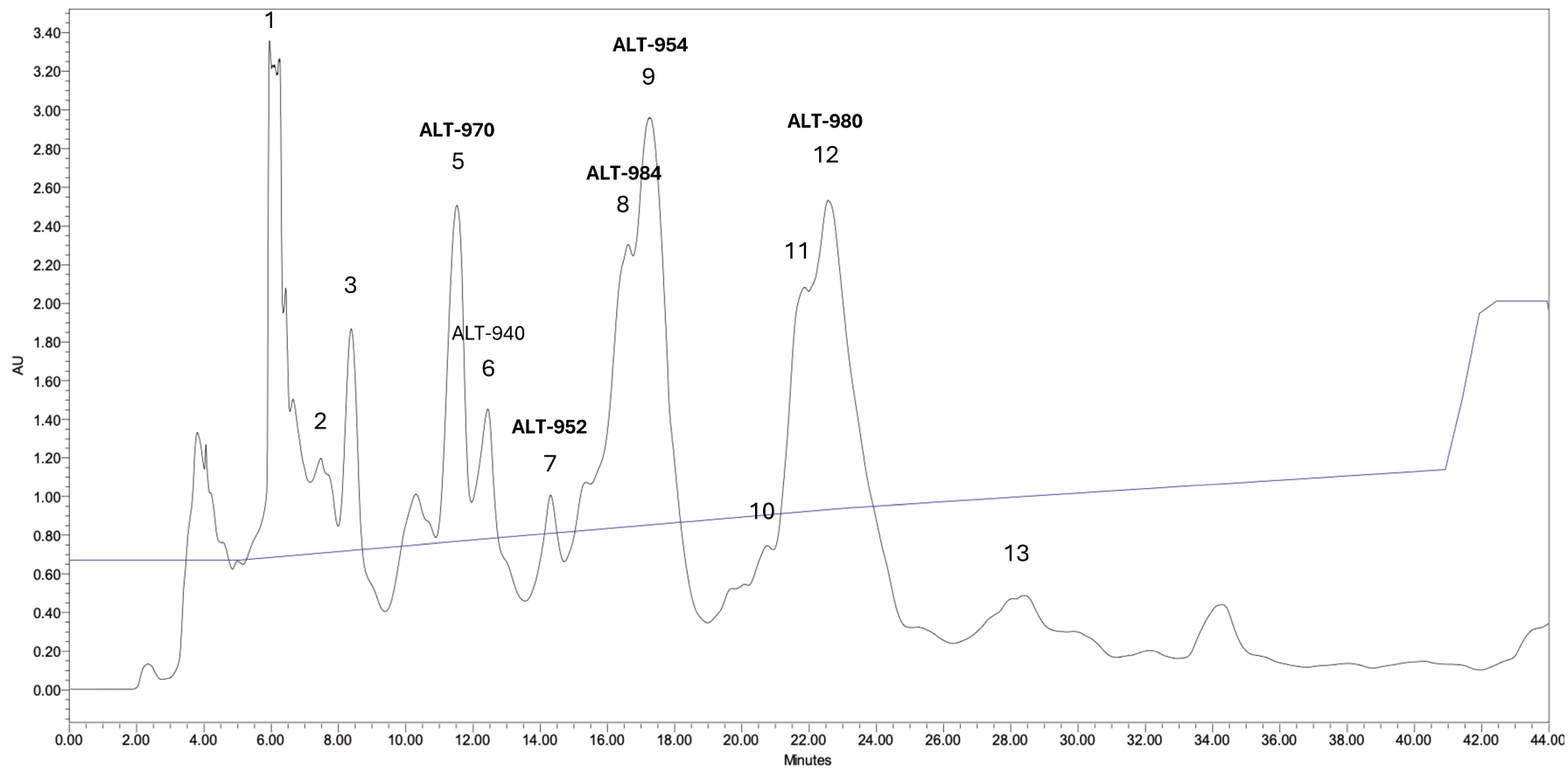


Figure 7. Chromatogramme obtenu par HPLC en phase inverse à une longueur d'onde de 220 nm. Chaque fraction annotée a été récoltée et analysée par LC-MS afin d'identifier l'altérine correspondante. Les isoformes utilisés pour la détermination des CMI sont indiqués en gras.

3.5. Concentrations Minimales Inhibitrices des altérines

L'activité antibactérienne du mélange d'altérines élué sur colonnes C18 à partir du surnageant des souches de *Pseudoalteromonas* a été analysée, ainsi que l'activité de quelques isoformes d'altérines purifiés séparément, contre des bactéries pathogènes en santé humaine et/ou en santé animale, notamment en aquaculture. La représentation des résultats des CMI sous forme de *heatmap* permet de classer les composés testés selon leur activité, du moins actif au plus actif, et les bactéries cibles selon leur sensibilité, des plus résistantes aux plus sensibles.

3.5.1. Activité antibactérienne des mélanges d'altérines produits par les souches de *Pseudoalteromonas*

Les valeurs de CMI pour les mélanges d'altérines produits par chaque souche de *Pseudoalteromonas* sont indiquées contre différentes bactéries cibles pathogènes et comparées avec les valeurs obtenues pour la polymyxine B (Figure 8). Les altérines produites par les souches de *Pseudoalteromonas* ont présenté une activité antibactérienne comprise entre 2 et 32 µg/mL contre des bactéries à Gram négatif. Aucune activité inhibitrice n'a été détectée contre les souches à Gram positif dans la gamme de concentration testée (CMI > 32 µg/mL pour *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus*). De plus, les altérines produites par les différentes souches n'ont pas présenté d'activité inhibitrice pour la gamme testée (CMI > 32 µg/mL) contre certaines souches du genre *E. coli* produisant des toxines particulièrement virulentes (ETEC et STEC) ou présentant une résistance à la colistine comme *E. coli* mcr-1. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les CMI des mélanges d'altérines produits par les différentes souches de *Pseudoalteromonas*. Seule la souche *Yersinia ruckeri* apparaît plus sensible aux mélanges d'altérines produits par les souches hOe-66 et hOe-124 (CMI de 2 µg/mL) par rapport aux altérines produites par la souche hCg-42 (CMI de 8 µg/mL ; Figure 8).

Dans l'ensemble, lorsque les altérines présentent une activité inhibitrice pour la gamme testée, la polymyxine B présente également une CMI équivalente ou plus faible contre la même bactérie cible. Par exemple, les altérines présentent des CMI de 8-16 µg/mL contre la souche *Vibrio anguillarum* CIP103438T quand la polymyxine B a une CMI de 2 µg/mL (Figure 8). Un ensemble de souches dans la partie haute de cette figure se révèle sensible à la polymyxine B,

avec des CMI nettement plus faibles comparées à celles des altérines, dont les CMI atteignent au mieux 16-32 µg/mL.

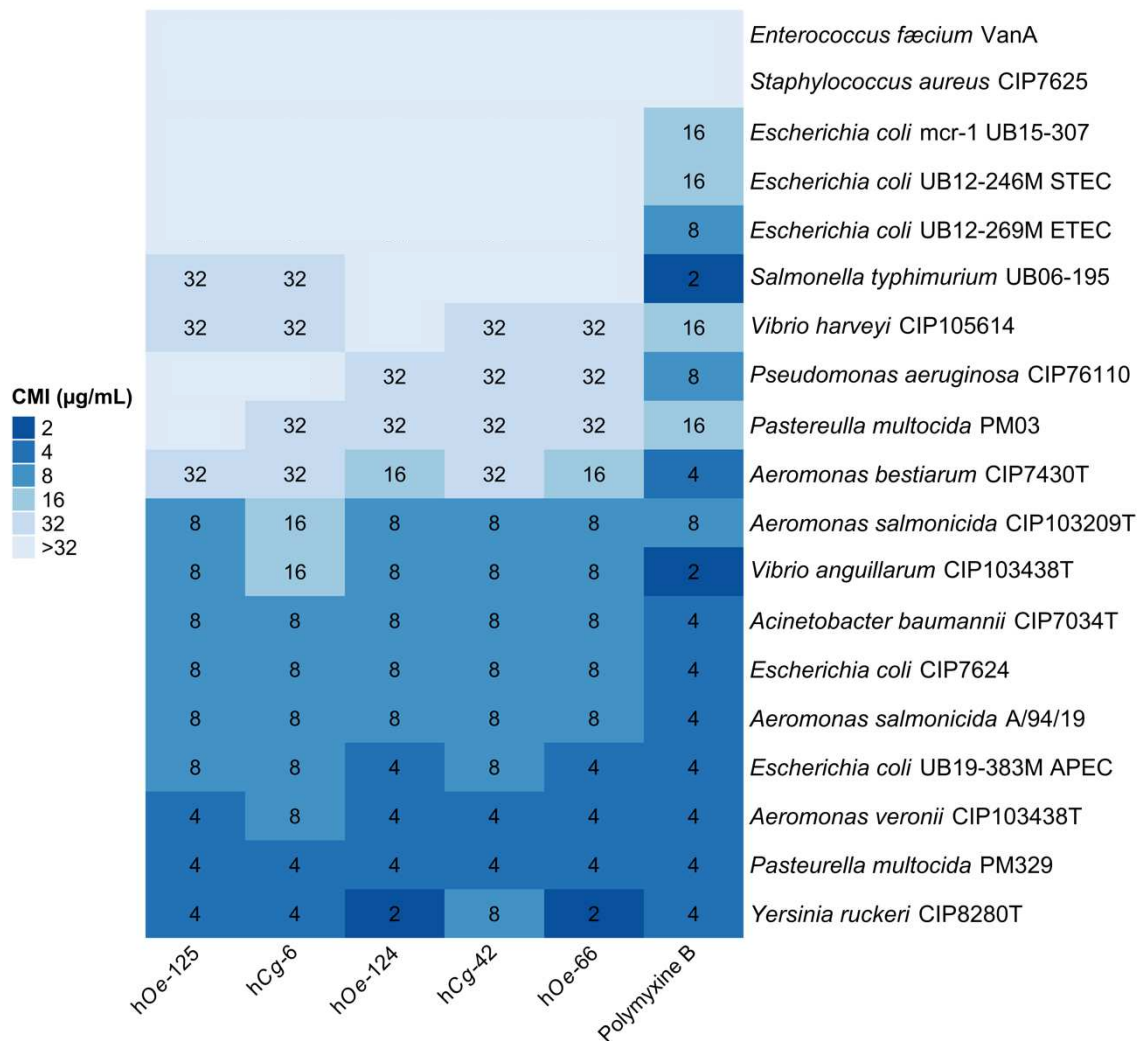


Figure 8. Concentrations Minimales Inhibitrices (µg/mL) des altérines produites par les souches de *Pseudoalteromonas* et un témoin positif (polymyxine B) contre différentes bactéries cibles.

3.5.2. Activité antibactérienne des isoformes d'altérines purifiés

Les isoformes d'altérines purifiées ont été testées contre 14 bactéries pathogènes (Figure 9) et leur activité a ainsi été comparée à celle de deux polymyxines : la polymyxine B et la colistine (polymyxine E). D'une manière générale, la polymyxine B et la colistine présentent une activité inhibitrice dans la gamme de concentration testée contre un plus grand nombre de pathogènes avec des CMI plus faibles que les isoformes d'altérines. Toutefois, les altérines ALT-954 et ALT-980 présentent une activité inhibitrice contre plus de bactéries cibles que les autres isoformes,

avec des inhibitions observées pour des souches d'*E. coli* (ETEC et STEC), *P. aeruginosa* ou encore *Aeromonas bestiarum*.

Par ailleurs, les isoformes purifiées n'ont pas présenté de CMI significativement différentes contre les autres bactéries cibles. De plus, ces isoformes ont présenté encore une fois des CMI similaires à la polymyxine B avec des valeurs équivalentes ou plus élevées. La même constatation a été faite pour la colistine excepté contre les souches de l'espèce *Aeromonas salmonicida* ainsi que la souche *Y. ruckeri* CIP8280T. Pour ces souches, les CMI des altérines obtenues sont équivalentes à la polymyxine B et inférieures à celles de la colistine : par exemple, les isoformes d'altérines présentent une activité inhibitrice contre la souche *A. salmonicida* CIP103209T à des concentrations comprises entre 4 et 8 µg/mL contre 32 µg/mL pour la colistine.

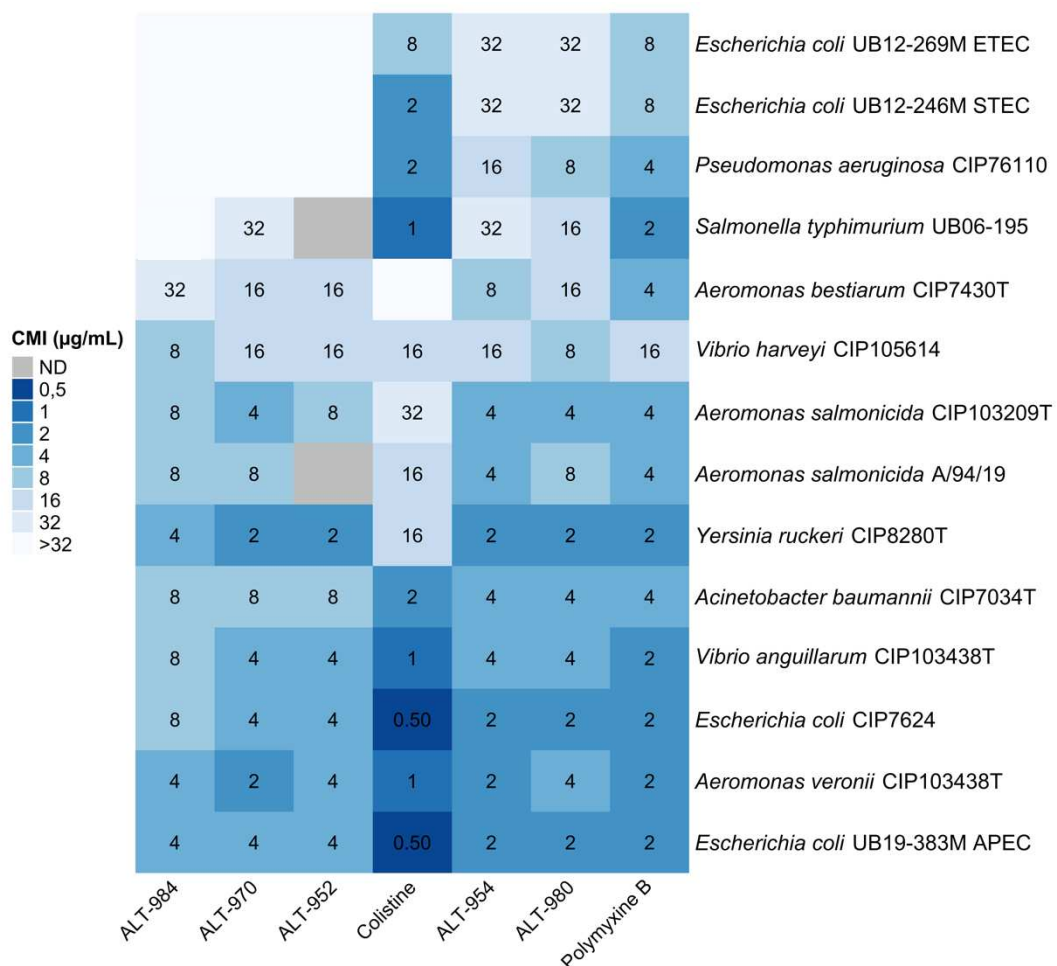


Figure 9. Concentrations Minimales Inhibitrices (µg/mL) de 5 isoformes d'altérines (ALT-952, ALT-954, ALT-970, ALT-980, ALT-984) ainsi que de deux polymyxines (polymyxine B et colistine) contre différentes bactéries cibles pathogènes.

Afin d'approfondir cette dernière observation, l'activité des altérines purifiées contre 15 souches d'*A. salmonicida* (Ucieklak *et al.*, 2024) a été caractérisée (Figure 10). La plupart des souches ont la particularité de présenter des structures de lipopolysaccharides (ou LPS) connues (Annexes, Figure A4). De plus, certaines bactéries ont la particularité de ne pas posséder de couche A (ou *A-layer*), une couche de surface protéique qui fait partie intégrante de l'enveloppe cellulaire de cette bactérie et qui participe également à la virulence de cette espèce (Gulla *et al.*, 2016).

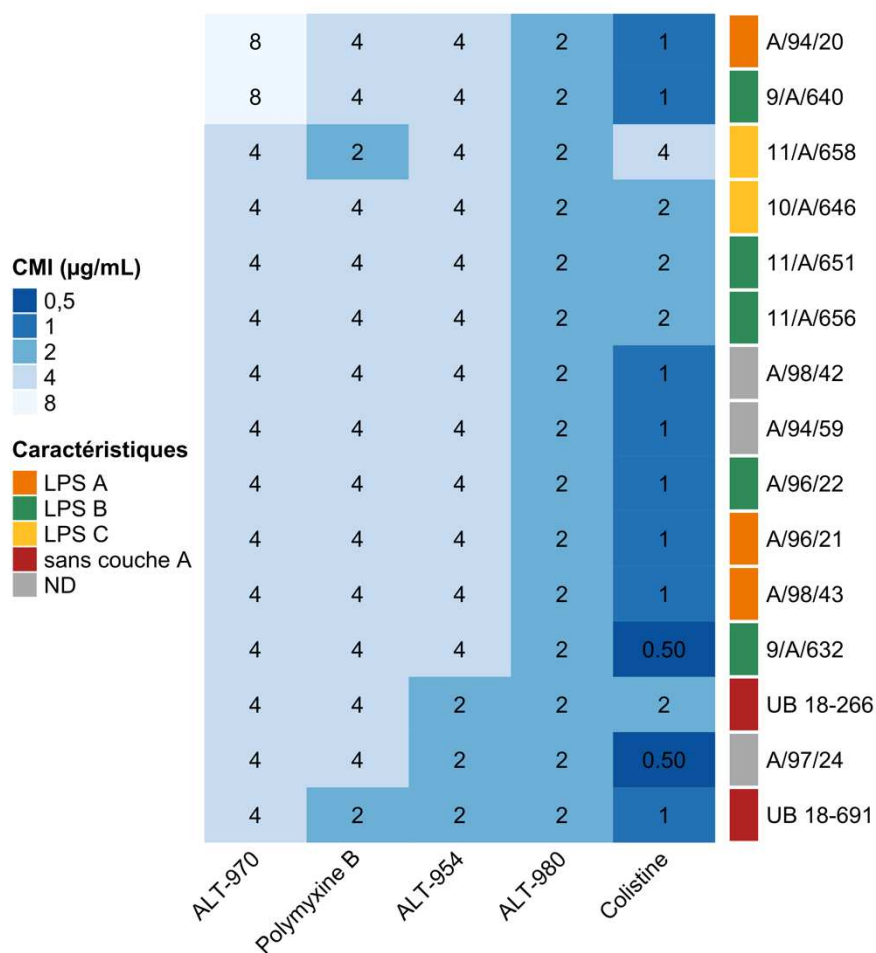


Figure 10. Concentrations Minimales Inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) d'isoformes d'altérines et de deux polymyxines (polymyxine B et la colistine) contre des souches de l'espèce *Aeromonas salmonicida*. Les LPS des bactéries cibles caractérisés sont indiqués sur le graphique.

Les valeurs de CMI obtenues pour les isoformes d'altérines contre les souches d'*A. salmonicida* sont plus réduites que celles précédemment observées contre les souches de cette

même espèce. Ces valeurs varient en effet entre 2 et 8 µg/mL et sont similaires aux valeurs obtenues pour la polymyxine B. Parmi les isoformes testées, l'ALT-970 présente les CMI les plus élevées contre le panel des bactéries cibles et l'ALT-980 la CMI la plus faible : 2 µg/mL contre toutes les bactéries cibles. Ces résultats ne permettent pas de présumer une corrélation entre la structure des LPS des souches d'*A. salmonicida* testées et les CMI obtenues pour les différents isoformes. Cependant, les souches ne présentant pas de couche A figurent parmi les souches les plus sensibles aux altérines et à la polymyxine B.

4. Discussion

L'analyse *in silico* des génomes des souches de *Pseudoalteromonas* nous a indiqué (i) une absence de gènes de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence notoires. De plus, l'étude du spectre et de l'activité antibactérienne de ces mêmes souches a montré (ii) des CMI proches entre les souches d'intérêt, avec un spectre d'activité similaire à celui de la polymyxine B. Enfin, la purification de quelques isoformes d'altérines nous a permis d'apprécier leur activité antimicrobienne contre différentes souches bactériennes pathogènes. Cette dernière étude nous a permis d'observer (iii) un spectre d'activité antimicrobien plus large pour les ALT-954 et ALT-980 et (iv) une absence de différences significatives dans l'activité des isoformes contre des souches d'*A. salmonicida* présentant différentes structures d'O-polysaccharides.

4.1. Virulence et résistance aux antibiotiques chez les souches de *Pseudoalteromonas*

Dans un premier temps, il est à noter que les bases de données interrogées sur MaGe ne sont pas axées sur les bactéries marines (Vallenet *et al.*, 2006), particulièrement la recherche de facteurs de virulence (Malberg Tetzschner *et al.*, 2020), ce qui peut influencer les résultats d'analyse.

Les résultats obtenus pour la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques sont similaires à une autre souche de *Pseudoalteromonas piscicida* 2515, présentant une activité antibactérienne contre *V. anguillarum* (Wang *et al.*, 2024). Le CDS *adeF* est également identifié comme potentiel gène de résistance pour cette souche. De plus, à l'aide de la base de données CARD, 22 gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés chez une souche de *Pseudoalteromonas* sp. S8-8, la majorité correspondant également à des pompes à efflux (Rizzo *et al.*, 2022).

Les facteurs de virulence sont définis comme l'ensemble des éléments nécessaires à la pathogénicité d'une souche bactérienne et qui, lorsqu'inactivés, n'impactent pas la viabilité de la souche (Ho Sui *et al.*, 2009). Ils sont divisés en différentes classes regroupant des fonctions nécessaires à la bactérie (i) pour coloniser un milieu, (ii) déclencher une maladie, ou encore (iii) échapper au système immunitaire de l'hôte (Pradel and Ewbank, 2004). On compte parmi les facteurs de virulence des systèmes de sécrétion, des endotoxines, des exoenzymes, ou encore des protéines participant à l'adhérence et la survie de la bactérie (Ho Sui *et al.*, 2009). Les facteurs de virulence spécifiques au genre *Pseudoalteromonas* sont à notre connaissance peu décrits. La virulence d'une souche de *P. piscicida* envers l'algue brune *Saccharina japonica* a pu être observée, mais les composés associés à cette pathogénicité n'ont pas été identifiés (Chen *et al.*, 2023). L'analyse du génome d'une souche *Pseudoalteromonas agarivorans* NW4327 dont la pathogénicité a été observée chez l'éponge *Rhopaloeides odorabile* a permis de corrélérer des systèmes de sécrétions de type 1 et 2 (T1SS et T2SS) présents dans le génome à la virulence de cette souche (Choudhury *et al.*, 2015). Ces systèmes de sécrétions n'ont pas été identifiés dans les génomes des souches de *Pseudoalteromonas* étudiées. Une autre souche, *Pseudoalteromonas piratica* OCN003, est identifiée comme l'agent étiologique du syndrome blanc chez les coraux du genre *Montipora*, bien que les mécanismes liés à cette pathogénicité restent encore non décrits (Beurmann *et al.*, 2017).

Aucun élément inféré par l'analyse des génomes ne vient s'opposer à leur usage comme additif microbien. D'une part, les éléments génétiques identifiés sont décrits chez des bactéries du genre *Pseudoalteromonas* sans qu'une pathogénicité ne leur ait été associée. D'autre part, les potentiels facteurs de virulence décrits ne comptent pas de toxines ou d'autres gènes impliqués dans la virulence des souches de ce même genre.

4.2. Résistome, virulome et activité antibactérienne : similarités entre les souches de *Pseudoalteromonas*

Toutes les souches de *Pseudoalteromonas* étudiées présentent les mêmes caractéristiques en matière de résistome et de virulome et ne sont pas contre-indiquées d'après les critères de l'EFSA sur ce point (EFSA, 2021). Les analyses de génome n'ont pas permis de discriminer une souche en particulier. Par conséquent, ces résultats ne fournissent pas d'arguments faisant obstacle à l'utilisation de ces souches comme probiotiques en aquaculture.

De plus, l'absence de différences significatives des CMI observées (Figure 7) ne permet pas non plus de sélectionner ou de discriminer une souche de *Pseudoalteromonas* en particulier pour cette application. Il a été observé que le panel d'altérines produit par les deux espèces de *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg- et *ostreae* hOe- diffèrent principalement au niveau de la longueur de leur chaîne hydrocarbonée. En effet, les altérines produites par les souches hCg- présentaient des chaînes d'acides gras plus longues que les isoformes produites par les souches hOe- (Offret *et al.*, 2022). Dans le cadre de notre étude, il apparaît que cette différence de production n'ait pas eu d'impact significatif sur l'activité antimicrobienne envers les bactéries pathogènes testées.

4.3. L'hydrophobicité des altérines impacte leur activité antibactérienne

Sur l'ensemble des CMI réalisées avec les isoformes d'altérines purifiées, l'ALT-980 est celle qui a démontré les CMI les plus faibles et donc l'activité antibactérienne la plus importante contre les bactéries cibles testées (Figure 9). C'est également l'altérine qui possède la plus longue chaîne hydrocarbonée des isoformes testés : elle est de 12 carbones et compte une insaturation (Offret *et al.*, 2022).

Lorsque l'on compare les caractéristiques des isoformes testés (Tableau 8), des variations sont observées sur la longueur de la chaîne hydrocarbonée, les hydroxylations/insaturations sur cette même chaîne, ce qui influence la solubilité intrinsèque de ces isoformes dans l'eau, ce qui permet d'en déduire leur hydrophobicité. Les altérines sont en effet des peptides amphiphiles comprenant un cycle heptapeptidique hydrophile et une chaîne hydrocarbonée hydrophobe. Les isoformes avec la solubilité dans l'eau la moins élevée sont l'ALT-954 (-2,78 logS) et l'ALT-980 (-3,25 logS). Ce sont également les isoformes qui ont présenté les CMI les plus faibles contre le panel de bactéries cibles testées. La tendance inverse a été observée pour les isoformes les plus hydrophiles : l'ALT-984 (-2,02 logS) et l'ALT-970 (-1,67 logS). Bien que l'ALT-970 présente une chaîne hydrocarbonée de la même longueur que l'ALT-954, l'hydroxylation en position 3' sur cette chaîne réduit l'hydrophobicité de cette isoforme (Tableau 8).

Il semble donc qu'une hydrophobicité plus importante soit corrélée à une meilleure activité antimicrobienne au sein de la famille des altérines. Ces résultats sont cohérents avec le mode d'action des altérines : une dépolarisation de la membrane est observée en présence de ces peptides, suggérant une interaction de ces peptides avec la membrane (Desriac *et al.*, 2020).

Des résultats similaires ont été observés lors de l'étude de la relation structure-activité de dérivés synthétiques des ogipeptines, corrélant la longueur de la chaîne hydrocarbonée avec des CMI's plus faibles (Takiguchi *et al.*, 2021).

D'autre part, l'hydrophobicité est une variable déterminante dans les études de relation structure-activité de peptides antimicrobiens : elle est corrélée à une meilleure activité antimicrobienne chez les peptides appartenant aux groupes structuraux des hélices α (Chen *et al.*, 2007) et des épingles à cheveux β (Edwards *et al.*, 2016). Cependant, pour d'autres peptides antimicrobiens linéaires, une hydrophobicité plus importante avait entraîné une meilleure activité antifongique, sans améliorer leur activité antimicrobienne (Cashman-Kadri *et al.*, 2022).

Tableau 8. Caractéristiques structurales des isoformes d'altérines utilisés pour les tests de CMI's. C_x où x désigne le nombre de carbones composant la chaîne hydrocarbonée. D'après Offret *et al.*, 2022 et le logiciel MarvinSketch (24.3.0 ; Chemaxon, 2024). Plus la valeur de solubilité intrinsèque (logS) est négative, moins le composé est soluble dans l'eau.

ALTÉRINE	Chaîne hydrocarbonée	Hydroxylation/insaturation	Charge nette (pH 7)	Solubilité intrinsèque (logS ₀)
952	C ₁₀	5' - insaturation	4	-2,55 logS
954	C ₁₀	-	4	-2,78 logS
970	C ₁₀	3' - hydroxylation	4	-1,67 logS
984	C ₁₁	3' - hydroxylation	4	-2,02 logS
980	C ₁₂	5' - insaturation	4	-3,25 logS

4.4. Éléments sur le mode d'action des altérines et la sensibilité des souches d'*Aeromonas*

Les changements de structure d'O-polysaccharides (Annexes, Figure A4) n'impactent pas l'activité des altérines, ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que la partie O-polysaccharidique a peu d'influence lors de l'interaction des altérines avec le LPS. Les charges positives des altérines peuvent en effet interagir avec les phosphates du lipide A, comme les polymyxines (Poirel *et al.*, 2017) et de nombreux peptides antimicrobiens cationiques amphiphiles (Pulido *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'absence de couche A chez les souches d'*A. salmonicida* semble les rendre plus sensibles aux altérines, ce qui est cohérent avec le rôle décrit de la couche A dans la défense et

la protection de ces bactéries (Merino *et al.*, 2015; Paquet *et al.*, 2019). Des résultats similaires ont été observés lors de l'étude de l'activité d'un peptide antimicrobien cationique, la cécropine B, qui présentait des CMI significativement moins importantes contre des souches d'*Aeromonas salmonicida* sans couche A (Henry and Secombes, 2000).

5. Conclusion

La caractérisation des souches de *Pseudoalteromonas* comme potentiels probiotiques par analyses *in silico* et étude du spectre d'activité des peptides antibactériens qu'elles produisent, les altérines, ne présente pas de limitations quant à leur utilisation en élevage aquacole. D'autre part, l'activité antibactérienne de ces souches a pu être caractérisée contre un large panel de bactéries pathogènes en système aquacole. De plus, les différentes analyses réalisées n'ont pas permis de sélectionner une souche de *Pseudoalteromonas* plutôt qu'une autre, au profit d'une meilleure activité antibactérienne *in vitro* par exemple. Ainsi, une souche de chaque espèce, *P. ostreae* et *P. rhizosphaerae* ont été sélectionnées pour évaluer leur effet probiotique en élevage de l'huître plate *Ostrea edulis* : la souche hOe-125 et hCg-42. Cette sélection a également été basée sur la facilité de manipulation et de purification des altérines à partir de ces deux souches.

CHAPITRE 2 – APPLICATION DES SOUCHES DE *PSEUDOALTEROMONAS* EN ÉLEVAGE DE L’HŪÎTRE PLATE *OSTREA EDULIS*

1. Introduction

1.1. L’huître plate : anatomie et cycle de reproduction

Les huîtres plates de l’espèce *Ostrea edulis*, comme toutes les huîtres, sont des mollusques bivalves appartenant à la famille des Ostréidés, qui vivent au niveau de l’étage médiolittoral dans des baies, lagons ou estuaires (Bachère *et al.*, 2015). Comme tous les bivalves, elles possèdent un corps mou recouvert d’une coquille constituée de deux valves : une valve plate et une valve creuse. Le muscle adducteur de l’huître permet de la maintenir fermée tandis que la charnière rend possible son ouverture. Le manteau constitue la partie externe du corps mou de l’huître et assure sa croissance et son développement (Gonzalez-Araya, 2012). Les huîtres se nourrissent par filtration de particules en suspension (Beecham, 2008) ; les nutriments captés, constitués de particules mesurant entre 1 et 7 μm sont alors acheminés depuis les branchies jusqu’à la bouche puis vers les organes digestifs (France Naissain, 2023). Les branchies jouent ainsi un rôle à la fois dans la respiration et dans l’alimentation de l’huître (Evan Ward and Shumway, 2004). Les huîtres filtrent des grandes quantités d’eau (entre 3 et 9 L/h/g de masse sèche d’huîtres), elles sont donc largement exposées aux microorganismes et virus environnants.

De plus, les huîtres présentent un système circulatoire semi-ouvert où l’hémolymphe joue un rôle important d’interface entre le système immunitaire et les microorganismes environnants. Ce liquide circulatoire ne se limite pas au cœur et aux vaisseaux, et s’introduit dans tous les espaces intercellulaires des tissus de l’huître (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2024). L’hémolymphe est ainsi colonisée par des microorganismes et particulièrement par des bactéries à Gram négatif du genre *Pseudoalteromonas* (Defer *et al.*, 2013) et *Vibrionaceae* (Schmitt *et al.*, 2012). Ces microorganismes cohabitent avec les hémocytes, cellules immunocompétentes, qui sont essentielles à la défense de l’huître (Dupont *et al.*, 2020). Cependant, le rôle des hémocytes ne se limite pas uniquement à la réponse immunitaire : d’autres fonctions physiologiques sont assurées par ces cellules, comme le transport de nutriments, la réparation de la coquille ou encore le maintien de l’homéostasie (Donaghy *et al.*,

2010). Les études concernant le rôle de l'hémolymphe ou encore la composition de son microbiote sont principalement axées sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Schmitt *et al.*, 2012).

L'huître plate *O. edulis* (Linnaeus, 1758) est une espèce hermaphrodite asynchrone qui présente une stratégie de reproduction originale (Figure 11) par rapport à d'autres espèces comme l'huître creuse *C. gigas*. En effet, la fécondation n'est pas réalisée dans le milieu naturel pour cette espèce (Suquet *et al.*, 2018). Les huîtres mâles libèrent leurs spermatozoïdes dans l'environnement, spermatozoïdes qui sont ensuite filtrés par les huîtres femelles et fécondent les ovocytes dans leur cavité palléale. Les larves y sont incubées pendant 7 à 10 jours avant d'être émises dans le milieu sous forme de larves véligères (Martin *et al.*, 1995). Le conditionnement des géniteurs est réalisé en écloserie pour permettre un approvisionnement en larves, sans être dépendant des conditions de maturation en pleine mer (Helm and Bourne, 2006). Huit à dix jours après l'émission, les larves sont pédivéligères et peuvent ainsi se fixer et se métamorphoser en un naissain d'huîtres juvéniles. Ensuite, a lieu la phase de grossissement qui conduit à la maturation des huîtres plates adultes (FAO, 2024c).

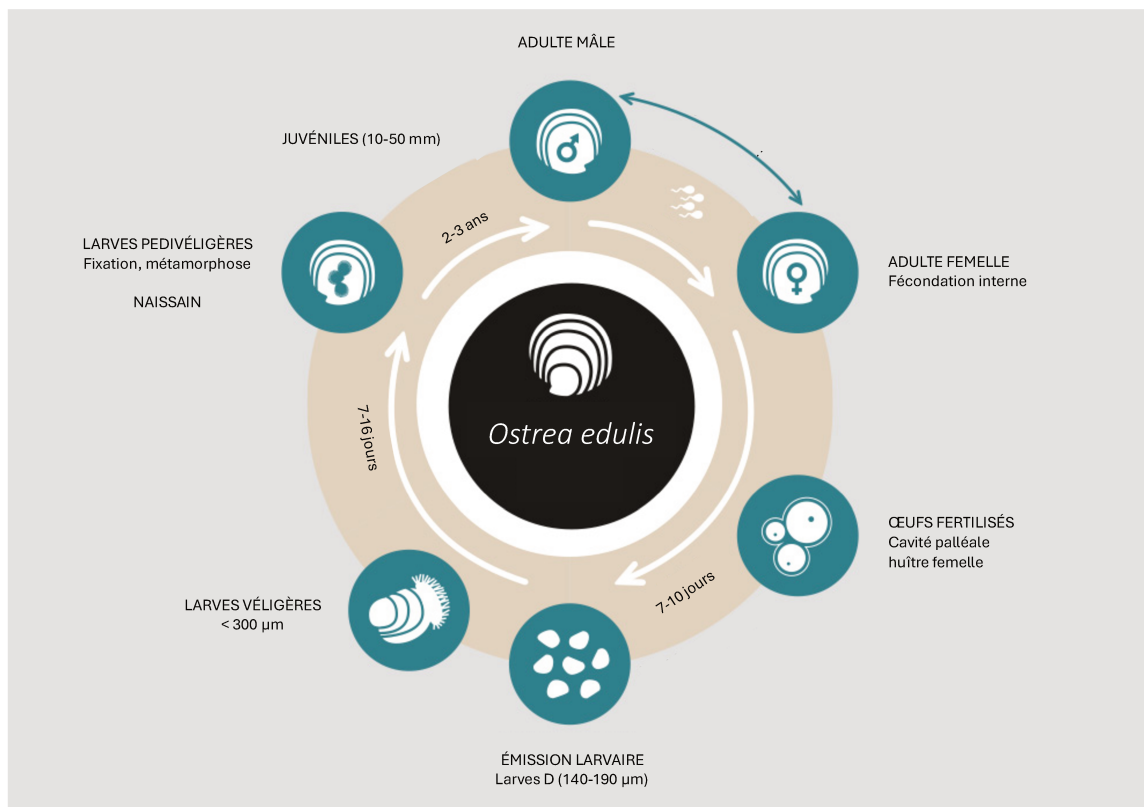


Figure 11. Cycle de reproduction de l'huître plate *O. edulis*, tiré de NORA, 2024 et adapté de Fitzsimons *et al.*, 2019.

1.2. Élevages de l'huître plate *Ostrea edulis*

L'huître plate est l'espèce d'huître native en Europe (Mesías-Gansbiller *et al.*, 2013), contrairement aux différentes espèces d'huîtres creuses, qui ont été importées d'autres régions, notamment du Japon et également introduites via le Portugal. Ces importations ont été nécessaires aux ostréiculteurs pour compenser des épisodes de mortalité observés en milieu naturel chez les adultes liés aux parasites *Martellia refringens* et *Bonamia ostreae* (Buestel *et al.*, 2009). L'objectif aujourd'hui est donc de restaurer les récifs naturels d'huîtres plates non seulement pour leur rôle écologique, comme espèces ingénieuses du littoral, mais également pour augmenter les niveaux de productions de cette espèce particulièrement prisée pour ses qualités gustatives (Pogoda, 2019).

Actuellement, la production d'huître plate française est faible avec 1413,6 tonnes produites en 2022 (FAO, 2024b). Elle est en effet limitée par la capacité des écloseries à produire des naissains (zu Ermgassen *et al.*, 2023b). Cette production dépend notamment de l'émission larvaire lors de la maturation sexuelle, en conditions contrôlées où de nombreux paramètres sont optimisés, comme l'apport en nutriments ou encore la mise en place de gradients de température et de lumière (Maneiro *et al.*, 2020). Malgré un cycle de reproduction bien maîtrisé, des mortalités au stade larvaire sont régulièrement enregistrées. Ces mortalités ont pu être imputées à des infections provoquées par des souches du genre *Vibrio*, comme *V. neptunius* isolée à partir d'échantillons d'eau de mer et de larves (Prado *et al.*, 2005). Une étude sur l'espèce *C. gigas* a démontré qu'une exposition du microbiote larvaire à une eau de mer enrichie en microorganismes commensaux permettait une meilleure survie en cas d'épisodes infectieux (Fallet *et al.*, 2022). De plus, certaines familles sont spécifiquement associées à une meilleure résistance au syndrome du POMS chez l'huître creuse *C. gigas* (Clerissi *et al.*, 2020).

1.3. Étude du microbiote : le séquençage nouvelle génération

L'étude des communautés microbiennes associées à l'hôte est devenue prépondérante pour caractériser l'état de santé de l'huître et sa sensibilité/résistance face à un pathogène (Pierce and Ward, 2018).

Classiquement, les communautés microbiennes associées aux bivalves ont été étudiées par caractérisation taxinomique grâce au séquençage des amplicons des régions génétiques codant

la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (Paillard *et al.*, 2022). Le metabarcoding est une méthode qui permet d'amplifier et de séquencer un gène marqueur pour l'ensemble des espèces ciblées contenues dans un échantillon, comme par exemple les communautés bactériennes lorsque l'on cible le gène codant l'ARNr 16S (Bharti and Grimm, 2021). Cette méthode permet même d'étudier à la fois l'ADN environnemental des communautés bactériennes, des protistes et des virus en présence dans un échantillon, en ciblant des gènes caractéristiques des communautés analysées (Dupont *et al.*, 2020). Le metabarcoding, qui utilise les techniques de séquençage nouvelle génération (*next-generation-sequencing* ou NGS) apporte de nouvelles connaissances et permet une meilleure compréhension du rôle écologique des microorganismes contenus dans l'environnement (Paillard *et al.*, 2022). Cependant, de nombreux biais sont associés aux choix des amorces, à la préparation des librairies (Tsuji *et al.*, 2022) ou encore au traitement des échantillons environnementaux (Pappalardo *et al.*, 2021). Du fait de ces biais et en raison de son développement rapide, un large nombre de protocoles et de méthodes d'analyses différentes ont été introduites, pouvant limiter la reproductibilité et l'interprétation des résultats ainsi que la comparaison avec d'autres études (Bharti and Grimm, 2021). De plus, la taille des amplicons obtenus grâce à l'amplification d'un gène ciblé permet une attribution taxinomique au niveau du genre et dans de rares cas au niveau de l'espèce, ce qui limite également l'analyse (Usyk *et al.*, 2023).

Les méthodes de séquençage nouvelle génération sont en constante évolution et ouvrent la voie à de nouvelles manières d'analyser le microbiome associé aux organismes marins (Paillard *et al.*, 2022). Ces analyses participent à la compréhension de la relation hôte-microbiome et de l'importance de ces interactions pour le fonctionnement et l'évolution de l'hôte (Berg *et al.*, 2020).

1.4. Étude de l'effet de probiotiques sur le microbiote en ostréiculture

L'usage de probiotiques en élevage ostréicole reste à explorer (Paillard *et al.*, 2022), leur effet bénéfique étant davantage documenté pour d'autres élevages comme les crevettes (Rajeev *et al.*, 2021) ou encore de nombreuses espèces de poissons (Torres-Maravilla *et al.*, 2024).

Quelques études font état de méthodes de metabarcoding afin d'évaluer l'incidence de bactéries probiotiques sur des élevages ostréicoles : ces analyses ont principalement été réalisées au stade larvaire d'huîtres creuses (*C. virginica*) et ont permis l'étude du microbiote

bactérien larvaire ainsi que des communautés bactériennes associées à l'eau de mer (Takyi *et al.*, 2024) mais également au biofilm se formant sur les parois des bassins d'élevage (Stevick *et al.*, 2019). Deux souches probiotiques (*Phaeobacter inhibens* S4 et *Bacillus pumilus* R106-95) inoculées à hauteur de 10^4 UFC/mL ont eu un effet sur le microbiote larvaire de *C. virginica*, avec l'augmentation de l'abondance d'ASVs appartenant aux genres *Alteromonas* et *Pseudomonas* pour la souche S4 (Takyi *et al.*, 2024) et *Oceanospirillales* et *Bacillus* pour R106-95 (Stevick *et al.*, 2019). Aucune modulation de la richesse et de la diversité du microbiote larvaire n'a pu être observée en présence des probiotiques : en revanche, une modulation de la structure du microbiote larvaire a été constatée pour le probiotique S4 sur certains lots de larves (Takyi *et al.*, 2024).

Ainsi, les effets de souches probiotiques en élevage ostréicole sont variables, selon la souche utilisée mais également le lot d'huîtres (Takyi *et al.*, 2024) et une modulation de la structure du microbiote larvaire n'est pas systématique. D'autres études sont nécessaires afin de compléter ces premières constatations et caractériser les effets en élevage ostréicole de l'ajout de telles bactéries, notamment sur les huîtres adultes et plus généralement sur les huîtres de l'espèce *O. edulis*. D'autre part, une première description du microbiote bactérien de l'huître plate et des communautés bactériennes associées aux bassins d'élevage est nécessaire afin d'évaluer par la suite de potentiels effets probiotiques.

L'étude de l'ajout des souches probiotiques en élevage ostréicole a principalement été réalisée sur la composante bactérienne des communautés en présence, afin d'observer l'effet de bactéries sur les communautés en présence (Stevick *et al.*, 2019; Takyi *et al.*, 2024). Sachant que le microbiote englobe tous les microorganismes associés à un hôte (Berg *et al.*, 2020), il est possible que ces souches aient également un effet sur d'autres composantes du microbiote, comme les protistes ou encore les virus, qui ont par exemple été décrits au sein du microbiote hémolympatique de l'huître creuse (Dupont *et al.*, 2020). L'expérimentation présentée dans ce chapitre se concentre sur l'étude de la composante bactérienne des communautés associées à un élevage ostréicole, tout en reconnaissant qu'il ne s'agit que d'un aspect partiel du microbiote.

Application des souches de *Pseudoalteromonas* en élevage de l'huître plate *Ostrea edulis*

Au cours de ce projet de thèse, l'effet de souches du genre *Pseudoalteromonas* a été étudié durant un conditionnement de géniteurs (ou maturation sexuelle) de l'huître plate *O. edulis*. Cette expérimentation a pour objectif de décrire, dans un premier temps, la composante bactérienne du microbiote associé aux huîtres plates d'élevage et à leur environnement (communautés du biofilm et de l'eau de mer). Les effets des souches sur l'élevage ont été évalués à différents niveaux : (i) composition des communautés bactériennes de l'environnement (eau de mer et biofilms), (ii) le biovolume des biofilms formés, (iii) le microbiote hémolympatique des huîtres plates et (iv) leur émission larvaire au terme de la maturation.

2. Matériel & Méthodes

2.1. Caractéristiques des souches de *Pseudoalteromonas*

Les bactéries *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42 (hCg-42) et *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-125 (hOe-125) ont été respectivement isolées à partir de l'hémolymphe de l'huître creuse *C. gigas* (Defer et al., 2013) et de l'huître plate *O. edulis* (Cuny et al., 2021). La souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (3J6) a été isolée à partir d'une lame de verre immergée dans le golfe du Morbihan (Grasland et al., 2003). 3J6 a la particularité de présenter une activité antibiofilm *in vitro* en lien avec la production d'une protéine antibiofilm, l'altérocine (Jouault et al., 2020). La souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15^T (RA15^T), isolée à partir de la rhizosphère de l'halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* (Navarro-Torre et al., 2020) a servi de souche contrôle pour les expérimentations. En effet, cette souche ne présente a priori pas d'activité antimicrobienne *in vitro* d'après la littérature et également d'après des tests réalisés au laboratoire (données non présentées). Les souches ont été cultivées dans un milieu Marine Broth (Difco™ 2216, Thermo Fischer Scientific, États-Unis) à une température de 18°C sous agitation (100 rpm) pendant 24h.

2.2. Préparation des suspensions des souches de *Pseudoalteromonas*

À partir d'une préculture des souches de *Pseudoalteromonas*, un erlenmeyer contenant 1 L de milieu Marine Broth a été inoculé avec 10 mL de préculture et incubé pendant 48h à 18°C et sous agitation (100 rpm). Les cellules bactériennes ont été collectées par centrifugation (7000g 4°C pendant 15 minutes) et lavées 2 fois avec une solution de Sea Salts (3%, Sigma-Aldrich, États-Unis). La concentration finale atteinte a été ajustée à 10⁸ UFC/mL et contrôlée par dénombrement sur milieu Marine Broth complété avec de l'agar (15 g/L).

2.3. Maturation des huîtres plates *Ostrea edulis*

Les huîtres plates utilisées pour l'expérimentation sont des huîtres adultes de 3 ans originaires de la rade de Brest. Elles ont été transférées sur la plateforme expérimentale du Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne Nord, à Lampaul-Plouarzel (France). Après une étape de quarantaine, les huîtres ont été acclimatées à une température de conditionnement de 19°C (augmentation progressivement de la température de l'eau sur 15 jours). La mortalité et l'émission larvaire des huîtres ont été suivies par les techniciens de la plateforme du CRC.

2.4. Plan expérimental

Après acclimatation, les huîtres plates ont été réparties dans 5 bassins (n = 100 par bassin) contenant 100 L d'eau de mer maintenue à 19°C. L'eau de mer est renouvelée de 20% toutes les heures. Les huîtres ont été alimentées par un mélange de 4 espèces de phytoplancton : *Cylindrotheca gracilis*, *Rhodomonas salina*, *Conticriba weissflogii* et *Skeletonema marinoi* avec une ration quotidienne ajustée à 10^9 cellules par géniteur et par jour. À partir du deuxième mois de conditionnement, 10% de la microalgue T-Iso (*Tisochrysis lutea*, volume cellulaire d'environ $40 \mu\text{m}^3$) a été ajoutée au régime de base afin d'assurer la disponibilité d'une nourriture ingérable par les larves dans la cavité palléale de l'huître. Une exposition hebdomadaire par balnéation des huîtres avec 10^6 UFC/mL des différentes souches de *Pseudoalteromonas* a été réalisée pendant 4h en l'absence de renouvellement de l'eau, soit 16 balnéations entre le 25 novembre 2022 et le 16 mars 2023 pour une maturation sexuelle de 4 mois (Figure 12). Les 5 bassins correspondent aux 5 conditions expérimentales : une condition contrôle (sans addition de bactérie) et 4 conditions (addition des souches bactériennes RA15^T, hOe-125, hCg-42 ou 3J6). Afin d'étudier l'impact des différentes souches sur le biovolume du biofilm formé, des lames de verre (76x26 mm, MGF) ont été immergées verticalement dans chaque bassin au début de l'expérimentation (30 lames/condition expérimentale).

2.5. Échantillonnage

L'eau des bassins ainsi que les lames de verres immergées ont été échantillonnées, avant balnéation, tous les mois. Ainsi pour chaque mois, des échantillonnages de biofilms (n=5) et d'eau de mer (n=1) ont été effectués (Figure 12). Quatre séries de prélèvements ont été

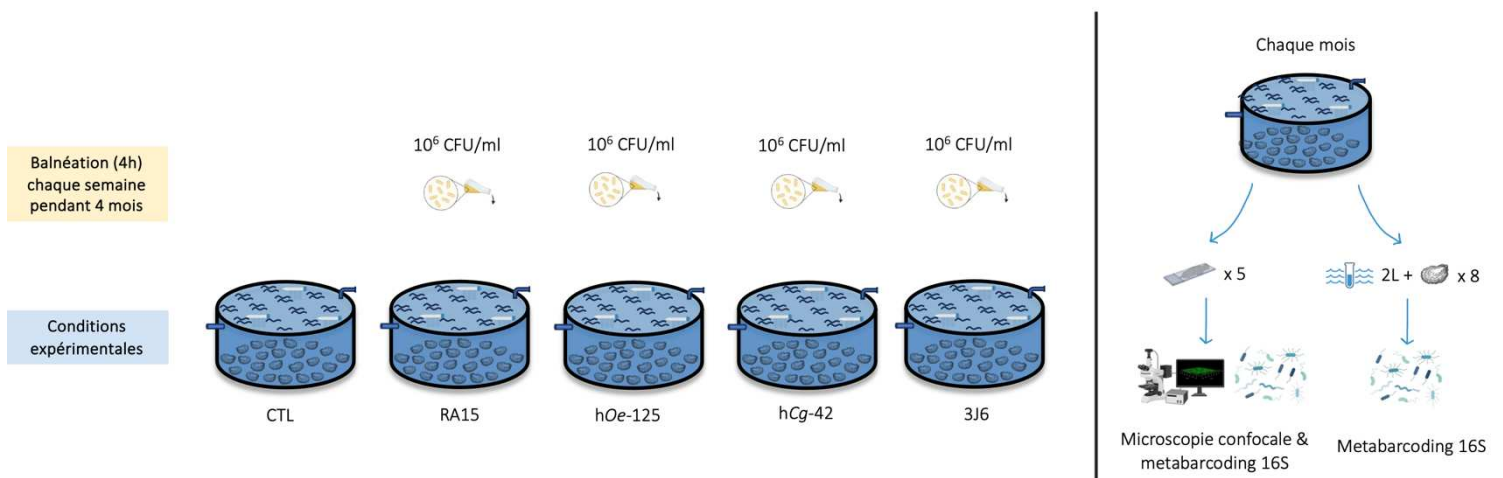


Figure 12. Schéma récapitulatif du dispositif expérimental et de l'échantillonnage réalisé au centre technique du CRC Bretagne Nord.

réalisées au cours de l'expérimentation : la première un mois après son début (M1), puis les suivantes à des intervalles d'un mois.

L'eau de mer collectée dans les bassins (2 L) a été filtrée sur des filtres en polycarbonate de 0,22 μm (Whatman, USA). Le biofilm présent sur une face des lames a été prélevé à l'aide d'un Cell Scraper (Biologix Europe, Allemagne) sur la totalité de la surface. En parallèle des prélèvements d'hémolymphe (300 μL) ont été réalisés à partir d'huîtres ($n=8$) pour chaque condition. Les échantillons de biofilms, les hémolymphe prélevées ainsi que les filtres ont été conservés à -80°C avant extraction d'ADN.

2.6. Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

2.6.1. Traitement des lames et observation

La face opposée de la lame de verre a été conservée afin de réaliser des analyses au microscope confocal à balayage laser. Les lames prélevées ont été rincées 3 fois dans une solution de Sea Salts 3%. Un séchage à température ambiante a ensuite été réalisé avant marquage au SYTO9 (50 μL à 5 μM , Thermo Fisher Scientific, États-Unis) permettant de quantifier les cellules viables adhérentes. Après séchage (5 minutes à température ambiante), les lames ont été rincées une nouvelle fois dans une solution de Sea Salts 3% avant d'être fixées à l'aide du ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific, États-Unis). Cette fixation a permis la conservation des lames avant observation au microscope confocal. L'analyse des lames par microscopie confocale à balayage laser (MCBL, Zeiss LSM170) a été réalisée à un grossissement 63X. La fluorescence du SYTO9 a été mesurée en utilisant un filtre à 488 nm pour l'excitation et l'émission de la fluorescence a été détectée entre 500 et 550 nm. Pour chaque lame, 5 prises de vue ont été réalisées ce qui représente donc un total de 25 images par condition et par temps. Le traitement d'image est effectué avec le logiciel Zen lite 2 (Zeiss, Allemagne). Le biovolume de biofilm formé a été calculé à partir des images analysées via un script Matlab COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000). Les résultats de biovolume ont été traités à l'aide du logiciel Rstudio (v2023.12.1.402 ; Posit team, 2024). Une analyse statistique a été menée en utilisant un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi du test de Dunn pour effectuer des comparaisons multiples.

2.7. Analyses metabarcoding

2.7.1. Extraction d'ADN et séquençage

L'ADN génomique bactérien a été extrait avec les kits DNeasy PowerBiofilm, PowerSoil et PowerWater (Qiagen, Allemagne) pour les échantillons de biofilm, d'hémolymphe et d'eau de mer, respectivement. Les ADN génomiques extraits ont ensuite été envoyés pour séquençage à Génome Québec (Université McGill, Montréal, Canada). La préparation des bibliothèques y a été réalisée par amplification en utilisant les amorces 341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' et 805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Herlemann et al., 2011a). Ces amorces ciblent la région V3-V4 de l'ADNr 16S. Le séquençage a ensuite été réalisé grâce à la technique Illumina MiSeq PE300 10Mb par cette plateforme.

2.7.2. Traitement des données de séquençages

Les fichiers obtenus après séquençage ont ensuite été envoyés au LBCM pour y être analysés à l'aide du pipeline *Standardized and Automated Metabarcoding Analysis workflow* SAMBA (v4.0.0 ; Noël et al., 2021) développé par le Service de Bioinformatique d'Ifremer. Les amorces ont été retirées des séquences obtenues grâce à l'outil Cutadapt (Martin, 2011) avec un taux d'erreur de 1%. La taille des amplicons attendue de 464 paires de bases a été indiquée dans le fichier de configuration du pipeline. Les données de séquençage ont été traitées avec QIIME 2 (v2022.11 ; Bolyen et al., 2019), FIGARO (Weinstein et al., 2019) et DADA² (v1.26.0 ; Callahan et al., 2016). L'outil FIGARO permet de régler les paramètres de DADA². Les amplicons obtenus (*Amplicon Sequence Variants* ou ASVs) ont ensuite été regroupés grâce à l'outil dbOTU3 (v1.5.3 ; Olesen, Duvallet and Alm, 2017). L'assignation taxinomique a été faite en interrogeant la base de données SILVA v138.1 (16S V3-V4 341F-805R). Les objets phyloseq permettant les analyses statistiques ont été générés avec le progiciel R Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013).

2.7.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur Rstudio. Les courbes de raréfaction des échantillons analysés ont été obtenues à l'aide du package MicrobiotaProcess (Xu et al., 2023). Les analyses d' α -diversité ont été réalisées en utilisant la fonction plot_richness du package phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013). Les indices de richesse observée, richesse estimée (Chao1) et de Shannon ont été calculés pour évaluer la richesse et la diversité des échantillons en fonction des variables mesurées : le *type d'échantillon* (hémolymphe, eau de mer et biofilm),

le temps de prélèvement et les différentes *expositions* (baignations avec des souches bactériennes dans divers bassins). Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée sur ces résultats à l'aide de la fonction `anova_test` du package `rstatix` (Kassambara, 2020). Au préalable, la normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées à l'aide des tests statistiques de Shapiro-Wilk et de Levene, issus du package `rstatix`. Concernant l'analyse de l'abondance relative, seuls les ASVs représentant 99,6 % de l'abondance totale des séquences ont été conservés pour l'analyse. Les données ont été normalisées en utilisant la méthode de mise à l'échelle par somme cumulative (CSS ; Paulson *et al.*, 2013) pour permettre la comparaison entre les échantillons dans le cadre des analyses de β -diversité. Une représentation graphique (analyse en coordonnées principales- PCoA) a été générée en utilisant la distance de Bray-Curtis pour observer les différences entre les communautés bactériennes. L'influence des variables *type d'échantillon*, *temps de prélèvement* et *exposition* a été évaluée par une analyse permutationnelle de la variance (PERMANOVA, nombre de permutations : 999) utilisant la fonction `adonis2` du package `vegan` (Oksanen *et al.*, 2022) selon les distances de Bray-Curtis et Unifrac pondérée. Un calcul d'abondance différentielle des ASVs a été effectué avec le package `MicrobiotaProcess`. Des tests de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon ont été réalisés pour déterminer les abondances relatives significativement différentes entre les paramètres choisis (*type d'échantillon*, *temps de prélèvement*, *exposition*). Seuls les taxons avec une abondance différentielle significative (p -value < 0,01) sont sélectionnés. Une analyse LDA (*Linear Discriminant Analysis*) a été ensuite réalisée afin de mesurer l'impact de ces taxons sur la structure des communautés. Un score élevé de LDA correspond à un impact (ou *effect size*) plus important.

3. Résultats

3.1. Séquençage et pipeline SAMBA

Après séquençage et démultiplexage, un total de 6 838 523 séquences a été obtenu avec une moyenne de 48 811 séquences par échantillon ($n = 280$). À partir de ces séquences, 21 324 ASVs ont été constitués avec le pipeline SAMBA. Deux étapes de filtration des ASVs ont été réalisées : un groupement des ASVs à l'aide de l'outil dbOTU3 (élimination de 11 212 ASVs) et une exclusion d'ASVs issus de contaminants pendant les phases d'extraction d'ADN ou d'amplification (élimination de 74 ASVs). Un total de 10 038 ASVs a été conservé à partir des 21 324 ASVs originaux issus de SAMBA. Ainsi, 6724 ASVs sont affiliés aux échantillons de biofilm, 5211 aux échantillons d'hémolymphe et 1658 à l'eau de mer, avec 1009 ASVs communs entre les types d'échantillons. Les courbes de raréfaction (Figure 13) montrent que la profondeur de séquençage a été suffisante pour identifier l'ensemble des ASVs présents dans les échantillons.

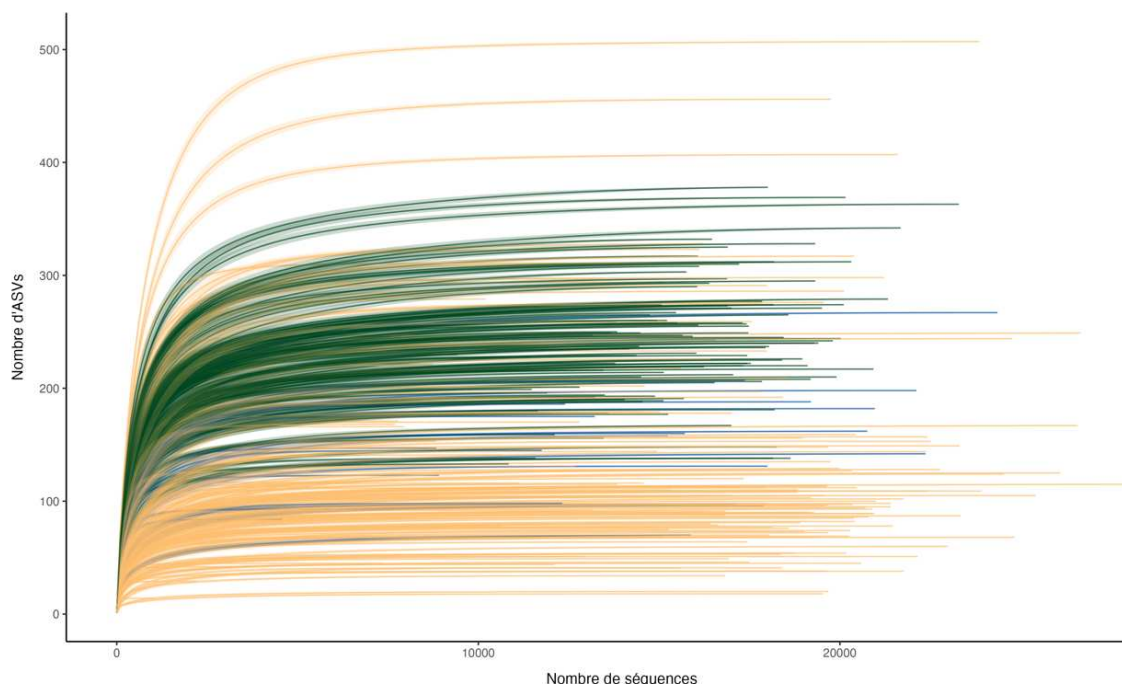


Figure 13. Courbe de raréfaction des échantillons de biofilm ($n = 100$, vert), d'hémolymphe ($n = 160$, jaune) et d'eau de mer ($n = 20$, bleu) utilisés pour l'étude.

3.2. Communautés bactériennes associées à l'huître plate et son environnement

L'objectif de cette partie d'analyses metabarcoding est de réaliser une première description des communautés bactériennes associées à l'huître plate en élevage. Les communautés bactériennes associées aux différents types d'échantillons (*i.e.* hémolymphe, biofilm et eau de mer) de la condition contrôle ont été caractérisées sur les quatre mois de l'expérimentation.

3.2.1. Analyse d' α -diversité : richesse et diversité des communautés bactériennes

Le microbiote hémolympatique des huîtres plates présente une richesse observée et une diversité (inverse de Simpson) significativement inférieures à celle des communautés bactériennes composant le biofilm (Figure 14). À titre d'illustration, les échantillons d'hémolymphe présentent un nombre moyen d'ASVs de 180 ± 97 ASVs (moyenne \pm écart-type) contre 208 ± 56 ASVs pour les échantillons de biofilm. La même tendance est observée pour la diversité, où la valeur moyenne de l'indice de Shannon est inférieure pour le microbiote hémolympatique de l'huître plate ($3,52 \pm 0,88$) par rapport aux communautés bactériennes retrouvées dans le biofilm ($4,61 \pm 0,55$).

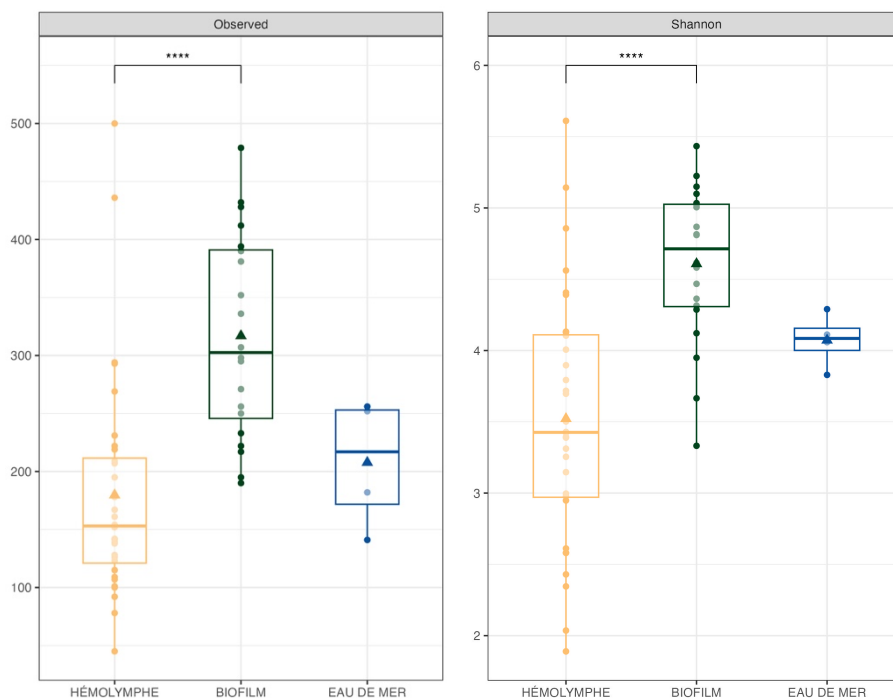


Figure 14. Mesures d' α -diversité pour les échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer pour la condition contrôle. La richesse observée (*Observed*) et la diversité (*Shannon*) sont ici représentées. Les valeurs moyennes sont symbolisées par un triangle. Les analyses statistiques (test de Tukey) sont indiquées avec le code suivant pour les valeurs de p-value : p-value = [0 ; 0,0001] (****).

Concernant les échantillons d'eau de mer, aucune différence significative de richesse ou de diversité n'est retrouvée par rapport à l'hémolymphe ou au biofilm. D'autre part, les valeurs des écart-types nous indiquent que de plus grandes variabilités inter-échantillons sont observées pour le biofilm et l'hémolymphe que dans l'eau de mer (Figure 14).

Les différences d' α -diversité constatées entre les types d'échantillons sont également observées à chaque temps de prélèvement. Une tendance à l'augmentation du nombre d'ASVs distincts et de la diversité des communautés bactériennes est observée tout au long des 4 mois d'expérimentation (Annexes, Figure A5). Cette augmentation est significative entre le deuxième et le quatrième mois (test de Tukey : p-values < 0,05). Le nombre d'ASVs au deuxième mois de l'expérimentation est en effet de 159 ± 61 ASVs et de 295 ± 133 ASVs au quatrième mois. Cette augmentation du nombre d'ASVs est également accompagnée d'une augmentation significative de la diversité avec un indice de Shannon de $3,85 \pm 0,76$ et de $4,42 \pm 0,87$ pour le deuxième et le dernier mois de l'expérimentation, respectivement.

3.2.2. Composition taxinomique du microbiote hémolympatique et des communautés de l'environnement

Les abondances relatives des principaux ASVs (Figure 15) permettent de décrire la composition (i) du microbiote hémolympatique et (ii) des communautés environnementales (dans l'eau de mer et le biofilm développé dans les bassins). Les communautés bactériennes du phylum des Protéobactéries restent omniprésentes dans l'hémolymphe, représentant 60,0% des ASVs observés dans ces échantillons. Ces communautés sont également présentes à des abondances relatives élevées dans l'eau de mer (67,9%) et le biofilm (83,9%).

D'autres phylums, moins abondants, sont caractéristiques d'un type d'échantillon. Ainsi, l'hémolymphe abrite des ASVs affiliés à la famille *Mycoplasmataceae* du phylum des *Firmicutes* (18,8%), le biofilm est colonisé par des bactéries du phylum *Planctomycetota* (15,6%) et le phylum *Bacteroidota* est présent à des abondances relatives importantes dans l'eau de mer (22,1%). Les résultats d'analyse discriminante linéaire (LDA) corroborent ces observations, mettant en avant une sur-représentation de ces phylums pour les trois types d'échantillons étudiés, avec des scores de LDA de 4,77 (*Firmicutes*) et de 4,68 (*Planctomycetota* et *Bacteroidota*).

Des variations sont également observées à chaque temps de prélèvement au sein du microbiote hémolympatique et des communautés bactériennes de l'environnement. Ces dissimilarités sont visibles en matière d'abondances relatives au rang taxinomique de la famille. Les *Fusobacteriaceae*, qui constituent 21,1% des ASVs identifiés dans le microbiote hémolympatique au premier mois de l'expérience, ne représentent plus que 0,12% des ASVs totaux identifiés dans l'hémolymphe au quatrième mois de l'expérience.

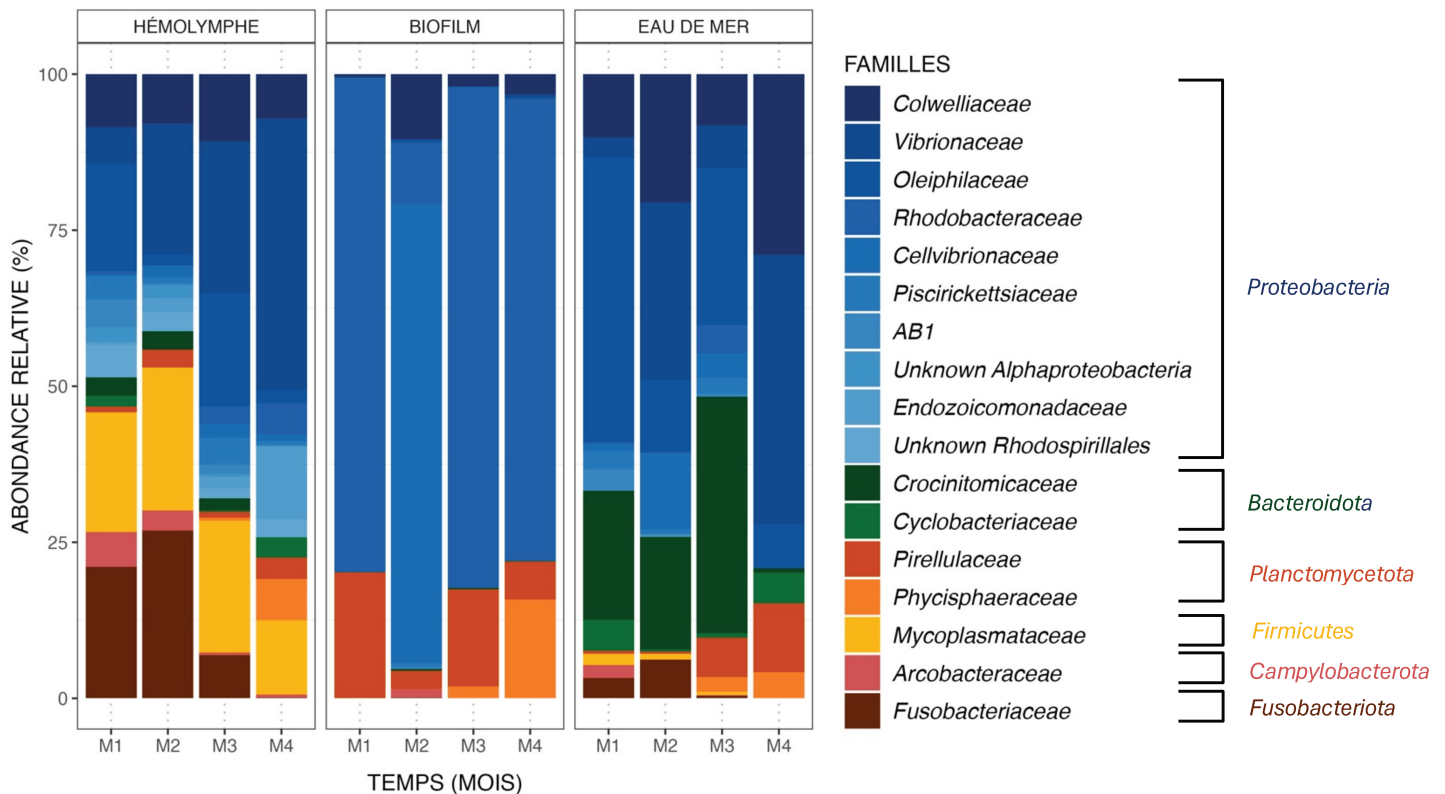


Figure 15. Abondance relative (%) des ASVs majoritaires au sein des échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer de la condition contrôle au cours des 4 mois de l'expérimentation (M1 à M4). Les rangs taxinomiques de la famille et du phylum sont représentés en légende. Ces ASVs représentent 99,6% de l'abondance relative totale.

3.2.3. Structuration des communautés bactériennes en fonction de la nature de l'échantillon et du temps de prélèvement

Les variations observées lors de l'étude de la composition taxinomique des échantillons et confirmées par analyses discriminantes linéaires sont également corroborées par les analyses de β -diversité. Les communautés bactériennes des échantillons de la condition contrôle sont en effet différentes selon le type d'échantillon (distance Bray-Curtis ; test PERMANOVA : Df = 2, $R^2 = 0,19$, F = 6,41, p-value = 0,001) mais également selon le temps de prélèvement (distance

Bray-Curtis ; test PERMANOVA : Df = 3, $R^2 = 0,23$, $F = 5,08$, p-value = 0,001). Concernant le type d'échantillon, les communautés bactériennes constituant le biofilm sont significativement distinctes de celles présentes dans l'eau de mer et l'hémolymphe (Figure 16). En revanche, le microbiote bactérien associé à l'hémolymphe présente davantage de similarité (sur les 2 premiers axes de la PCoA) avec la composition des communautés bactériennes de l'eau de mer. Cependant, une différence significative a été observée entre les échantillons d'hémolymphe et d'eau de mer en termes d'abondances des ASVs et de phylogénie (distance Unifrac pondérée ; test PERMANOVA : Df = 1, $R^2 = 0,19$, $F = 8,01$, p-value = 0,001). Une évolution des communautés bactériennes a également été observée au cours du temps, avec notamment les communautés des 3^{ème} et 4^{ème} mois de l'expérimentation qui se détachent des deux premiers mois (Figure 16).

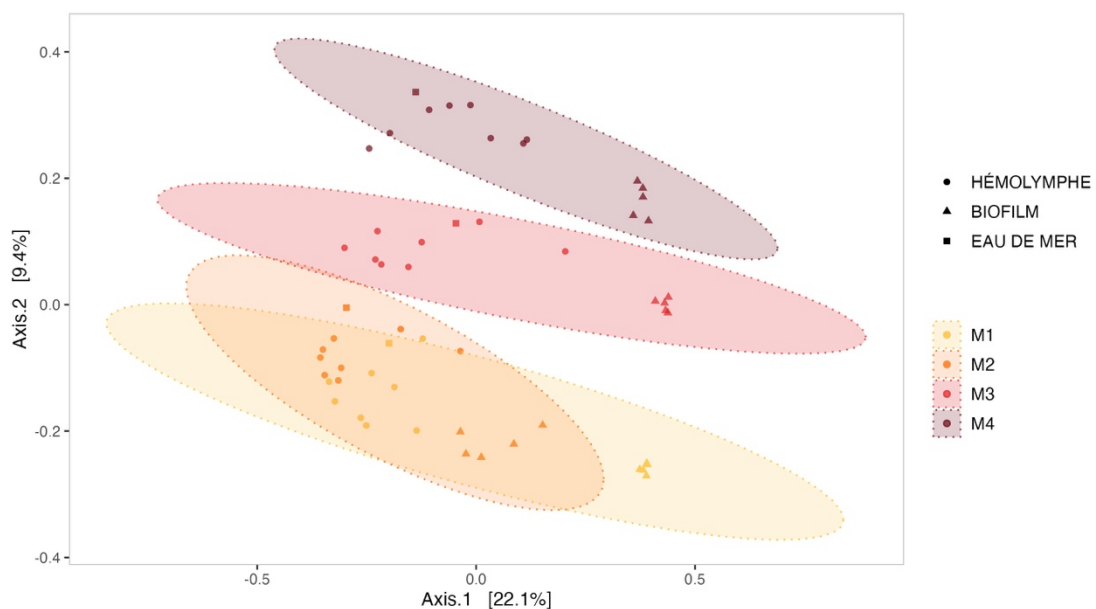


Figure 16. Analyses en coordonnées principales (PCoA) utilisant la mesure de distance de Bray-Curtis, des échantillons de la condition contrôle en fonction du type d'échantillon et du temps de prélèvement. Les ellipses sont dessinées à un intervalle de confiance de 95%.

3.3. Incidence des souches de *Pseudoalteromonas* sur les communautés bactériennes en élevage de l'huître plate *Ostrea edulis*

Des différences significatives ont été observées concernant la richesse, la diversité et la composition des communautés bactériennes entre les échantillons d'hémolymphe, d'eau de mer et de biofilm et également aux différents temps de prélèvement. L'effet de l'addition des souches de *Pseudoalteromonas* dans les bassins d'élevage (ou *expositions*) sur le (i) microbiote

hémostyphatique et (ii) les communautés bactériennes de l'environnement est présenté ci-après.

3.3.1. Modifications du microbiote hémostyphatique

Lors des 3 premiers mois de l'expérimentation, aucune différence significative n'a pu être observée entre les expositions des huîtres aux différentes souches de *Pseudoalteromonas* et le contrôle, que ce soit au niveau de la richesse ou de la diversité du microbiote hémostyphatique (test ANOVA : p-value > 0,05). D'autre part, pour les 4 mois de l'expérimentation, la richesse et la diversité des ASVs de la condition contrôle (huîtres non exposées aux souches) n'ont pas différé significativement des autres conditions (test de Tukey : p-value > 0,05).

En revanche, des différences significatives ont pu être constatées lors du 4^{ème} mois entre certaines expositions aux souches de *Pseudoalteromonas* (Figure 17). On peut en effet observer que le microbiote hémostyphatique exposé à la souche RA15^T présente une richesse significativement plus importante que la condition avec traitement à la souche hCg-42 lors du quatrième mois. De plus, la diversité du microbiote hémostyphatique pour le traitement hCg-42 est significativement moins importante que celle observée pour le traitement à la souche hOe-125.

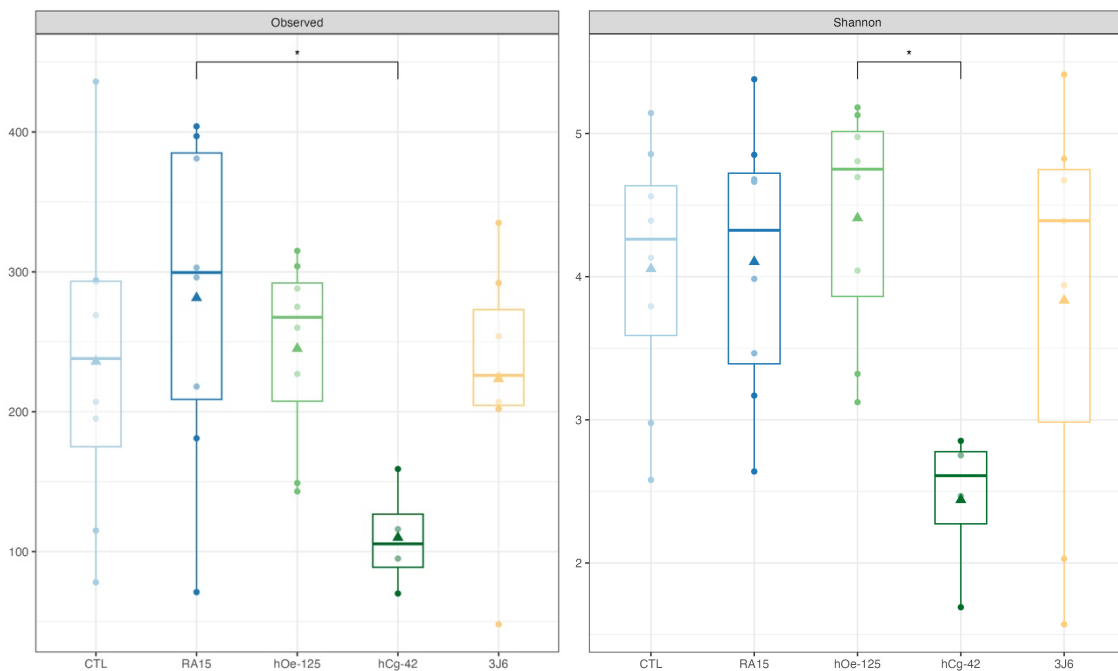


Figure 17. Mesures d'alpha-diversité (richesse observée et indice de Shannon) du microbiote hémostyphatique (au quatrième mois) en fonction des différentes expositions aux souches de *Pseudoalteromonas*. Les valeurs moyennes sont symbolisées par des triangles. Test post-hoc de Tukey : p-value < 0.05 (*).

D'autre part, l'analyse de la composition taxinomique du microbiote hémolympatique des huîtres exposées aux différentes souches montre qu'en dépit des balnéations, il n'y a pas de sur-représentation des taxons correspondant au genre *Pseudoalteromonas* ou à la famille des *Pseudoalteromonadaceae* (données non présentées).

Cependant, l'exposition des huîtres plates aux différentes souches de *Pseudoalteromonas* a induit une modulation significative du microbiote hémolympatique (analyses de β -diversité). Cette modulation est observée à chaque mois de l'expérimentation (Annexes, Tableau A1 ; test PERMANOVA, p-value = 0,001). Cet effet est expliqué non seulement par des différences d'abondance mais aussi des différences de composition taxinomique. De plus, les dissimilarités entre le microbiote hémolympatique des différentes conditions expérimentales sont observées aux termes du premier mois de l'expérimentation (M1) et se maintiennent les mois suivants (Figure 18).

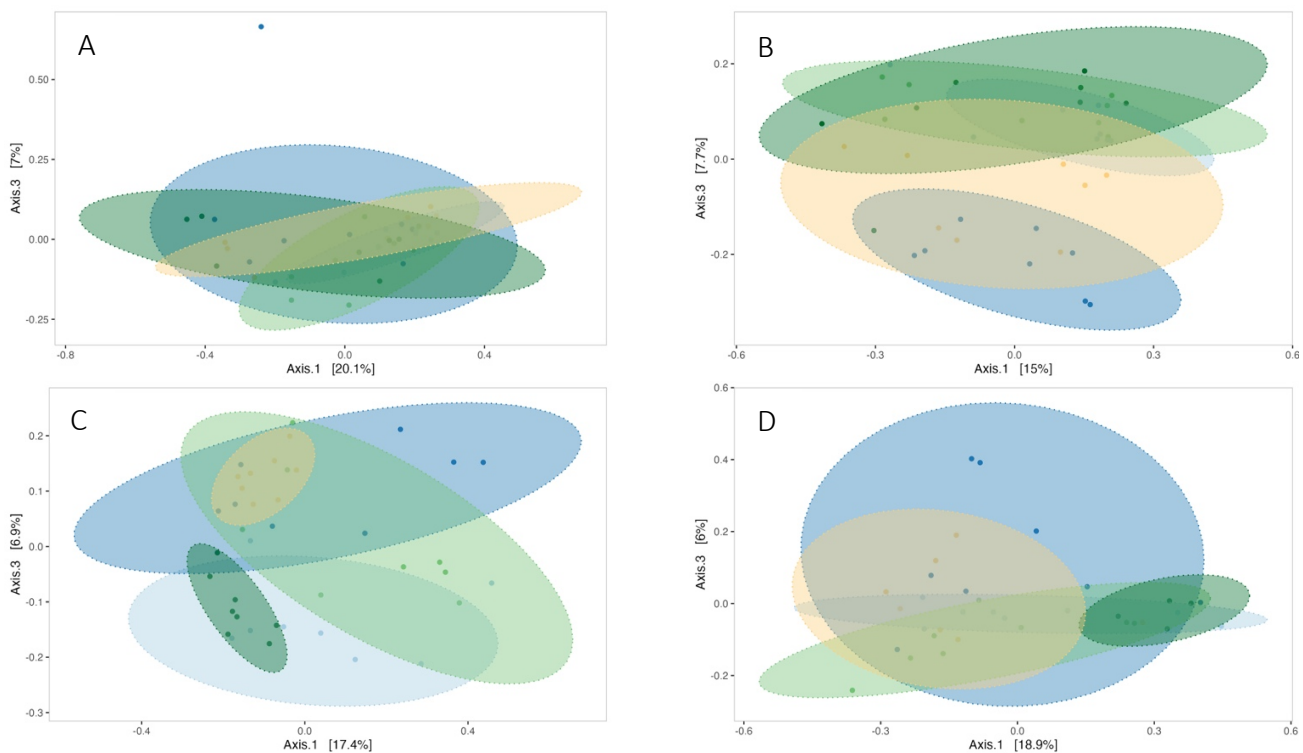


Figure 18. Analyse en Coordonnées Principales (PCoA), utilisant la mesure de distance de Bray-Curtis, du microbiote hémolympatique des huîtres plates exposées à différentes souches de *Pseudoalteromonas* (bleu clair = CTL, bleu foncé = RA15^T, vert clair = hOe-125, vert foncé = hCg-42, jaune = 3J6) et à tous les temps de prélèvements (A = M1, B = M2, C = M3 et D = M4). Les ellipses sont formées à un intervalle de confiance de 90%.

3.3.2. Étude des communautés bactériennes de l'environnement

Concernant les communautés bactériennes retrouvées dans l'eau de mer, l'ajout de souches de *Pseudoalteromonas* dans les bassins d'élevage n'a pas eu d'incidence sur ces communautés que ce soit en matière de richesse, de diversité (analyses d' α -diversité ; test ANOVA : p-value > 0,05) ou encore sur leur structure (analyses de β -diversité ; test PERMANOVA : p-value > 0,05).

En revanche, la structure des communautés microbiennes présentes dans les biofilms des bassins a été significativement modifiée par l'exposition aux souches de *Pseudoalteromonas*. Ici sont représentés les résultats obtenus pour le premier mois de la maturation (test PERMANOVA : DF = 4 ; $R^2 = 0,46$, F = 4,17, p-value = 0,001), où une dissimilarité des communautés bactériennes des biofilms est observée entre les échantillons contrôles et les échantillons de biofilms exposés aux différentes souches de *Pseudoalteromonas* (Figure 19).

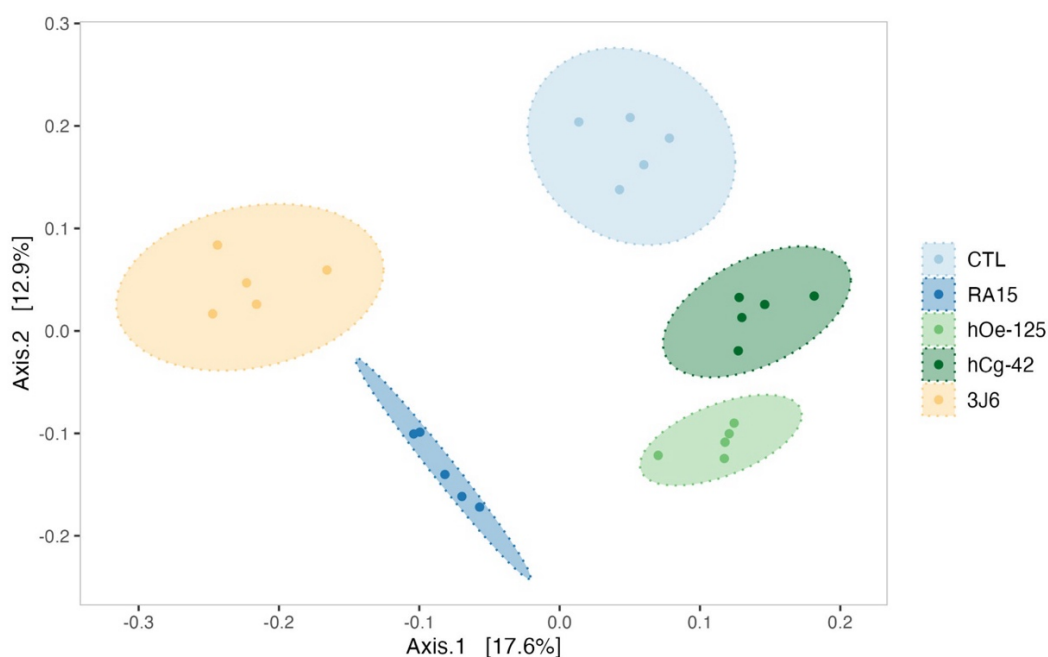


Figure 19. Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) utilisant la mesure de distance Bray-Curtis pour comparer l'impact des différentes expositions aux souches de *Pseudoalteromonas* sur les communautés bactériennes du biofilm au premier mois de l'expérimentation. Les ellipses sont dessinées à un intervalle de confiance de 95%.

Un effet significatif de l'addition des différentes souches de *Pseudoalteromonas* sur les communautés bactériennes du biofilm a été mis en évidence tout au long de la maturation, avec une analyse PERMANOVA significative pour chaque mois (Annexes, Tableau A2). Une analyse LDA a de nouveau été réalisée pour évaluer les taxons significativement associés à chaque traitement. Les résultats (Annexes, Figure A6) ont montré que la plupart des taxons sur-

représentés sont liés à l'exposition à la souche 3J6. Les *Planctomycetota* (4,49) ainsi que la famille des *Pirellulaceae* (4,34) sont associés à une baignade avec la souche 3J6. L'exposition à la souche hCg-42 se traduit par une plus grande proportion de *Proteobacteria* avec un score LDA moyen de 4,54. Le clade OM190, qui fait partie du phylum *Planctomycetota*, a été associé à l'exposition à la souche RA15^T, avec un score LDA moyen de 3,68. Enfin, aucune sur-représentation significative de taxons n'a été associée à l'exposition à la souche hOe-125 et la condition contrôle.

3.4. Effets de l'exposition aux souches de *Pseudoalteromonas* sur les huîtres plates et les biofilms

3.4.1. Huîtres plates : suivi de la mortalité et émission larvaire

Au terme de l'expérimentation, la survie des huîtres plates est supérieure à 80% (Figure 20), sans différence significative entre les huîtres exposées aux souches de *Pseudoalteromonas* et la condition contrôle (test du χ^2 : $\chi^2 = 2$, DF = 4, p-value = 0,07).

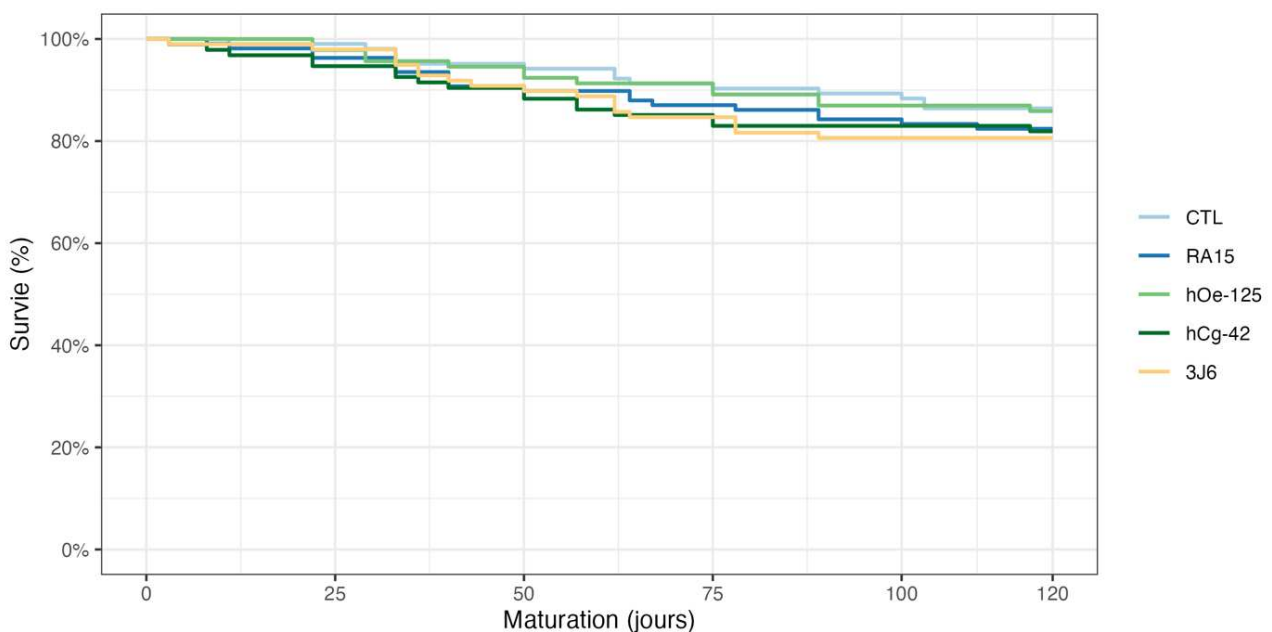


Figure 20. Courbes de survie Kaplan-Meier des huîtres plates exposées à différentes souches de *Pseudoalteromonas* au cours de leur maturation sexuelle.

De plus, l'émission larvaire des huîtres plates des différentes conditions expérimentales a pu être observée et quantifiée. Ces émissions larvaires ont eu lieu à partir du mois de février,

correspondant au 2^{ème} mois de l'expérimentation. Ainsi, des tendances ont pu être observées concernant le possible effet de l'exposition des huîtres aux souches de *Pseudoalteromonas* sur l'émission larvaire (Figure 21).

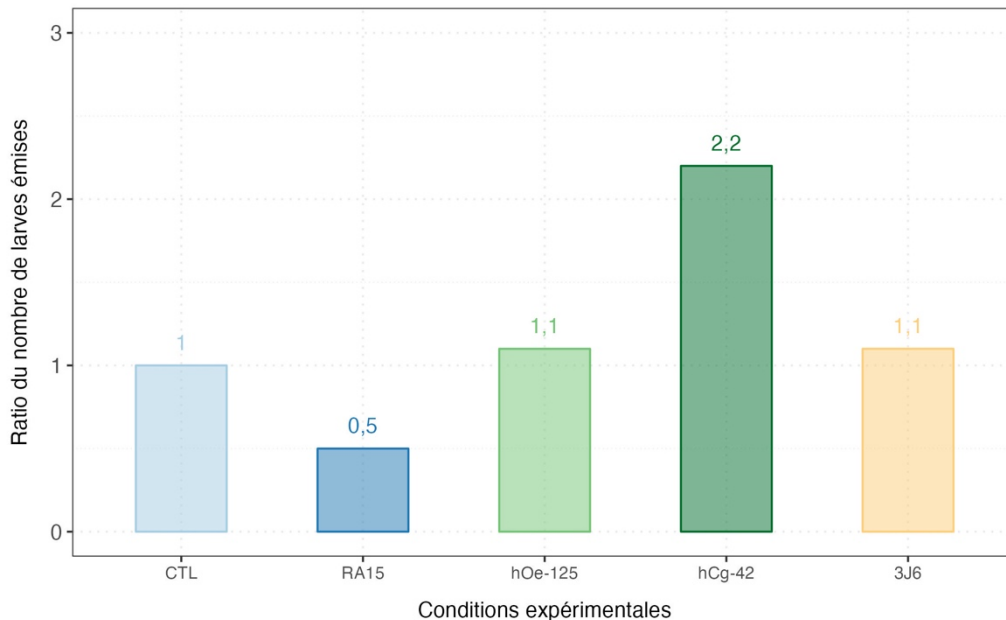


Figure 21. Émissions larvaires cumulées de chaque condition expérimentale aux termes de la maturation de l'huître plate *O. edulis*. Les résultats sont exprimés en ratio par rapport au nombre de larves émises pour la condition contrôle.

Ainsi, les huîtres exposées à la souche hCg-42 ont émis $2,94 \cdot 10^6$ larves, contre $1,32 \cdot 10^6$ pour la condition contrôle, soit 2,2 fois plus de larves. Les huîtres soumises à une balnéation des souches hOe-125 et 3J6 ont eu un nombre de larves émises de $1,42 \cdot 10^6$ et $1,51 \cdot 10^6$, respectivement, soit une émission larvaire proche de celle observée pour la condition contrôle. En revanche, les huîtres mises en présence de la souche RA15^T ont émis deux fois moins de larves que la condition contrôle, avec $6,00 \cdot 10^5$ larves émises.

3.4.2. Impact des souches de *Pseudoalteromonas* sur le biovolume du biofilm

En plus d'avoir eu un impact qualitatif sur les biofilms formés lors de la maturation, les souches de *Pseudoalteromonas* ont également impacté le biovolume du biofilm (Figure 22). Une diminution significative du biovolume en présence des souches RA15^T, hOe-125 et hCg-42 vis-à-vis du contrôle a été observée (Figure 23). En effet, en moyenne pour toute l'expérience, une valeur de biovolume de $0,776 \pm 1,145 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ a été obtenue pour la condition contrôle. Le biovolume a été significativement réduit pour trois expositions aux souches

de *Pseudoalteromonas*, avec des valeurs moyennes associées de $0,221 \pm 0,331 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour la souche RA15, $0,230 \pm 0,429 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour hOe-125 et $0,310 \pm 0,409 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour hCg-42. Cependant, le traitement avec la souche 3J6 a montré une réduction non significative du biovolume avec une valeur moyenne de $0,328 \pm 0,459 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$.

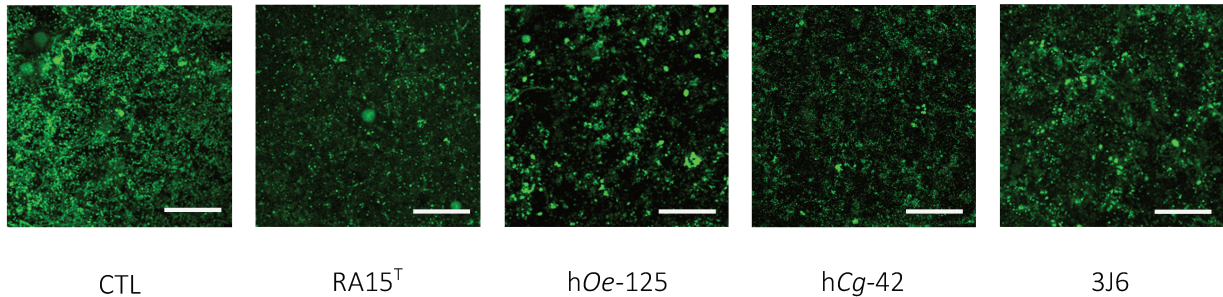


Figure 22. Photos des biofilms de chaque condition expérimentale au premier mois de l'expérimentation, analysés par microscopie confocale à balayage laser. Barre d'échelle : 10 μm .

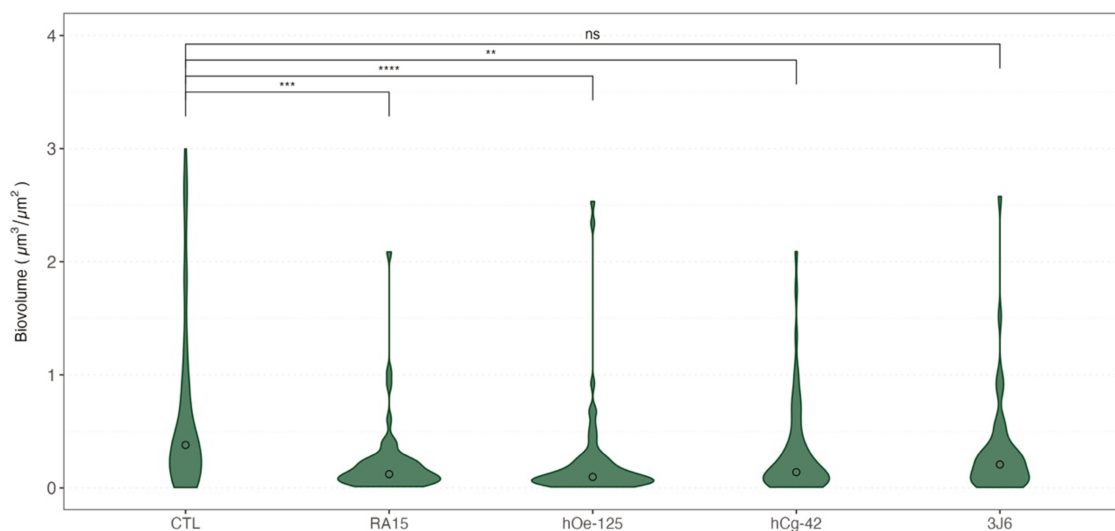


Figure 23. Biovolume de biofilm formé au cours de l'expérimentation en fonction des conditions expérimentales. Les données représentées correspondent aux valeurs obtenues pour les 4 mois de l'expérimentation. Les résultats du test post-hoc de Dunn sont représentés sur la figure. Les valeurs médianes sont symbolisées par un cercle. Les valeurs de p-value sont indiquées grâce au code significatif suivant : p-value = $[0 ; 0,0001]$ (****), p-value = $[0,0001 ; 0,001]$, p-value = $[0,001 ; 0,01]$ (**), p-value $> 0,01$ (ns).

4. Discussion

Les analyses de metabarcoding réalisées durant une maturation sexuelle de l’huître plate *O. edulis* ont permis d’étudier les dynamiques des communautés bactériennes de l’hémolymphe des huîtres et de l’environnement (eau de mer et biofilm). De plus, l’incidence des expositions aux souches de *Pseudoalteromonas* sur ces communautés bactériennes et sur différents paramètres tels que la survie des huîtres, le biovolume du biofilm formé ou encore l’émission larvaire a pu être observée.

4.1. Description des communautés bactériennes associées à l’élevage de l’huître plate

La description des communautés bactériennes associées à l’élevage de l’huître plate a permis de (i) caractériser le microbiote hémolympatique de l’huître plate dans les conditions de maturation et de (ii) comparer les communautés bactériennes de l’hémolymphe, de l’eau de mer et du biofilm.

4.1.1. Le microbiote hémolympatique de l’huître plate

Cette étude permet une première description du microbiote hémolympatique de l’huître plate *O. edulis* en conditions d’élevage. Chez d’autres espèces d’huîtres creuses, particulièrement *C. gigas*, des descriptions de microbiotes hémolympatiques ont déjà été publiées, correspondant à différentes conditions : en laboratoire (García Bernal *et al.*, 2017), dans un environnement naturel (Lokmer *et al.*, 2016a) ou encore en élevage (Dupont *et al.*, 2020). En élevage, le phylum des Protéobactéries est dominant dans le microbiote hémolympatique de l’huître creuse, comme c’est également le cas pour l’huître plate d’après les résultats que nous avons présentés dans ce chapitre. Les communautés bactériennes affiliées au phylum des Protéobactéries sont en effet associées à de nombreux bivalves, qu’importe l’espèce étudiée, atteignant chez l’huître des abondances relatives supérieures à 50% (Pierce and Ward, 2018). En revanche, les communautés du phylum des *Firmicutes* et des *Fusobacteriota* présentes chez l’huître plate (Figure 15) n’ont pas été observées lors l’étude du microbiote hémolympatique d’huître creuse d’élevage (Dupont *et al.*, 2020).

Deux notions connues dans l’étude du microbiote associé aux bivalves peuvent expliquer cette observation : la première est l’importance de la température sur la modulation du microbiote associé aux huîtres. En effet, les huîtres creuses d’élevage étaient maintenues dans

une eau à 16°C, tandis que dans le cadre de notre expérimentation, l'eau était à 19°C. La température est en effet directement corrélée à l'abondance, la diversité et la structure des communautés bactériennes associées aux bivalves (Pierce, 2016). De manière plus large, l'environnement joue une part importante dans l'acquisition du microbiote associé à l'huître : de nombreux facteurs biotiques et abiotiques influencent en effet ce microbiote (Paillard *et al.*, 2022). D'autre part, l'hôte influence la structure et la composition du microbiote qui lui est associé (Wegner *et al.*, 2013). Cette notion s'inscrit dans un concept plus global, impliquant que l'hôte a une incidence sur le microbiote qui lui est associé (Pierce and Ward, 2018). Le microbiote hémolymphatique de l'huître plate peut donc être (i) influencé par des facteurs environnementaux (température, communautés bactériennes de l'eau de mer) ou encore par (ii) l'hôte. Ces deux concepts sont développés ici, en regard avec les résultats obtenus durant cette expérimentation.

4.1.2. Le microbiote associé à l'huître plate, en lien avec son environnement

Les échantillons d'hémolymphe et d'eau de mer présentent des similarités en termes d'abondance et de distribution des ASVs. Ces constatations peuvent être corroborées par le phénomène connu d'association des microorganismes libres de l'eau de mer au microbiote de l'huître (Unzueta-Martínez *et al.*, 2022a). De plus, l'hémolymphe constituant une interface entre l'huître et son environnement (Bachère *et al.*, 2015), l'association de microorganismes de l'eau de mer à ce microbiote a pu être décrit (Lokmer *et al.*, 2016b). L'eau de mer étant renouvelée, on peut alors parler de microbiote transitoire pour qualifier ces microorganismes (Lokmer *et al.*, 2016a; Unzueta-Martínez *et al.*, 2022b). En effet, cette dernière étude (Lokmer *et al.*, 2016a) a montré que lorsque les huîtres creuses sont transférées en laboratoire, avec des apports d'eau filtrée, les communautés précédemment associées à l'eau de mer ne sont plus présentes, mettant en avant le caractère passager de certaines communautés bactériennes au sein du microbiote hémolymphatique (Vasconcelos and Lee, 1972).

Cette hypothèse pourrait également corroborer la structuration différentielle des communautés bactériennes associées à l'huître plate au cours des temps de prélèvements. Le renouvellement d'eau dans les bassins apporte en effet de nouvelles communautés bactériennes, ce qui explique l'évolution de sa structure (Remple *et al.*, 2021). Certaines de ces communautés peuvent alors être associées au microbiote hémolymphatique, qui est alors

également structuré différemment. Une augmentation de l'abondance relative des familles affiliées au phylum des Protéobactéries est en effet observée au sein des communautés bactériennes de l'eau de mer mais également de l'hémolymphe (Figure 15).

4.1.3. Spécificité du microbiote hémolympatique de l'huître plate

Le microbiote hémolympatique de l'huître plate d'élevage présente également des taxons qui sont particulièrement sur-représentés dans ce compartiment par rapport aux communautés de son environnement. C'est également le cas de l'huître creuse, où une nette distinction du microbiote hémolympatique vis-à-vis des communautés bactériennes de l'eau de mer a pu être constatée (Dupont *et al.*, 2020; Lokmer *et al.*, 2016a).

De plus, des familles affiliées au phylum des *Bacteroidota* dans l'eau de mer, dont l'abondance augmente entre le premier et le troisième mois de l'expérimentation ne suivent pas la même tendance dans l'hémolymphe (Figure 15). Ces résultats suggèrent une différenciation des communautés au cours du temps entre le microbiote hémolympatique et son environnement, ce qui met en avant une certaine imperméabilité de ce compartiment aux évolutions de son environnement (Fu *et al.*, 2024). De plus, le statut physiologique des huîtres durant leur conditionnement peut également avoir un effet sur leur microbiote (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2024), avec des émissions larvaires observées dès le troisième mois de l'expérimentation.

4.1.4. Les communautés bactériennes associées au biofilm

Des dissimilarités plus prononcées ont pu être observées entre le microbiote hémolympatique des huîtres plates d'élevage et les biofilms se formant dans les bassins : les communautés bactériennes du biofilm sont plus riches, avec une plus grande diversité et différent des communautés de l'hémolymphe en termes d'abondance, de présence/absence des ASVs ou encore de leur phylogénie. Ces différences pourraient être expliquées par la spécificité du microbiote de l'huître plate d'une part (Pierce and Ward, 2018) et également par le fait que le biofilm est composé de microorganismes qui lui sont spécifiques par rapport à ceux de l'eau de mer en conditions d'élevage aquacole (Remple *et al.*, 2021).

De plus, une modulation de la structuration des communautés bactériennes des biofilms au cours du temps a également été observée pendant la maturation d'*O. edulis*, ainsi que dans les

environnements marins ouverts (Briand *et al.*, 2022) et les bassins d'algoculture (Remple *et al.*, 2021). Les biofilms hébergent en effet une succession de communautés bactériennes associées à différentes étapes de la formation du biofilm dans les environnements marins. Ces variations ont été observées sur de courtes périodes (Dang and Lovell, 2002) ainsi que sur de longues périodes (Briand *et al.*, 2022; Malazarte *et al.*, 2022), corroborant les observations réalisées lors de cette expérimentation. Cela entraîne également une augmentation de la diversité bactérienne au cours du temps (Briand *et al.*, 2022).

4.2. Incidence des souches de *Pseudoalteromonas* sur l'élevage de l'huître plate *Ostrea edulis*

L'addition hebdomadaire des souches de *Pseudoalteromonas* dans les bassins n'a pas eu d'effet sur les communautés bactériennes de l'eau de mer : son renouvellement constant de 20% par heure, excepté durant la période de baignade, peut expliquer cette observation. En revanche, une modulation de la structure du microbiote hémolympatique et des communautés bactériennes du biofilm a pu être observée à la suite de l'ajout de ces bactéries durant l'expérimentation. L'exposition aux souches n'affecte toutefois ni la richesse ni la diversité des communautés bactériennes, aucune différence significative n'étant observée par rapport au contrôle.

4.2.1. Modulation du microbiote hémolympatique

L'exposition des huîtres aux souches de *Pseudoalteromonas* a donc eu une incidence sur le microbiote hémolympatique de l'huître plate durant l'expérimentation, sans pour autant déséquilibrer le microbiote comme observé lors d'épisodes infectieux, avec une augmentation importante de l'abondance relative de certains taxons, menant à une perte importante de diversité au sein du microbiote (Lokmer and Mathias Wegner, 2015). De plus, bien que les souches de *Pseudoalteromonas* aient été ajoutées à de fortes concentrations, des analyses de qPCR faites au préalable (Cuny, 2022) ont montré que leur passage n'était que transitoire au sein de l'hémolymphe, les souches n'étant plus détectées 96h après baignade. Cela indique donc que les souches induisent une modulation du microbiote hémolympatique, tout en ne s'implantant pas durablement au sein de l'huître plate.

La modulation du microbiote de l'hôte par des souches probiotiques a pu être observé pour d'autres modèles en production aquacole. Par exemple, l'introduction d'un consortium de

probiotiques (composé de *Bacillus* spp. et *Enterococcus* sp.) par balnéation a entraîné une modification significative de la structure des communautés bactériennes dans différents compartiments de la crevette *Litopenaeus vannamei* (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2020). De la même manière, le microbiote intestinal du poisson zèbre (*Danio rerio*) a été modulé en présence de l'espèce *Lactobacillus rhamnosus* (analyses de β -diversité), induisant une augmentation des communautés du phylum des *Firmicutes* (Falcinelli *et al.*, 2015). Par ailleurs, des huîtres creuses juvéniles mises en présence de deux souches du genre *Streptomyces* ont présenté un microbiote total avec une diversité plus importante et une structure modifiée (García Bernal *et al.*, 2017). La structure modifiée du microbiote de ces huîtres a pu être expliquée par l'influence de l'ajout des souches sur deux genres en particulier : le genre *Vibrio* qui n'était plus détecté pour les huîtres mises en présence des probiotiques et le genre *Bacteriovorax* qui au contraire se maintient dans le microbiote. L'effet probiotique documenté des bactéries du genre *Bacteriovorax* et leur action contre des bactéries à Gram négatif pourrait expliquer cette première constatation (Crossman *et al.*, 2013).

L'objectif d'un probiotique peut être de *stabiliser le microbiote* (Prado *et al.*, 2010) de l'hôte afin d'éviter un déséquilibre associé à des épisodes de mortalité (Lasa *et al.*, 2019). Cette notion de *stabilité* peut être différemment interprétée et dépend de nombreux facteurs : une réduction de la richesse et/ou diversité du microbiote de l'hôte est par exemple corrélée à une mortalité plus élevée (Dantan *et al.*, 2024). Dans le cadre de l'étude du conditionnement des géniteurs de l'huître plate, un effet des souches de *Pseudoalteromonas* sur le microbiote a été mis en évidence, mais d'autres expérimentations seraient nécessaires pour obtenir plus d'informations sur les incidences de cet effet, notamment sur la réponse des huîtres en cas d'épisode infectieux, par exemple.

4.2.2. Effets sur le biofilm : applications potentielles

Les balnéations hebdomadaires des souches du genre *Pseudoalteromonas* ont entraîné une réduction significative du biovolume du biofilm formé durant une maturation sexuelle de 4 mois de l'huître plate *O. edulis*. De tels traitements naturels peuvent être avantageux pour le secteur de l'aquaculture car la présence de biofilms reste un problème écologique et économique (Wietz *et al.*, 2009). Les biofilms développés dans les bassins ostréicoles exposés aux souches de *Pseudoalteromonas*, excepté 3J6, ont présenté un biovolume réduit de manière significative

par rapport au contrôle. L'activité antibiofilm observée *in vivo* avec les trois autres souches suggère que cette réduction n'est pas liée à l'utilisation d'une souche spécifique. Une réduction significative de l'épaisseur maximale a également été observée en présence de ces souches (hOe-125, hCg-42 et RA15^T) en élevage du bar commun (Rahmani *et al.*, 2023). En effet, la réduction de biofilm observée aurait pu être associée à une réduction significative de certains taxons, ce qui entraînerait une richesse et une diversité spécifiques réduites. Par conséquent, l'ajout des souches aux bassins n'affecte pas la présence d'ASVs appartenant à des phylums ou familles spécifiques. D'autre part, le rôle des altérines dans la réduction de ce biofilm pourrait être envisagé, mais n'est pas cohérent avec la réduction observée suite à l'addition de la souche RA15^T. De plus, les altérines étaient en dessous du seuil de détection (1 µg/mL) durant l'expérimentation, que ce soit dans l'hémolymphe des huîtres ou dans l'eau de mer (Cuny, 2022).

5. Conclusion

Cette expérimentation a permis d'investiguer l'usage de souches de *Pseudoalteromonas* comme probiotiques durant le conditionnement de géniteurs d'huîtres plates. L'absence de surmortalité chez les huîtres permet tout d'abord de valider l'innocuité des souches *in vivo*, paramètre essentiel pour envisager l'usage de ces bactéries. De plus, la réduction du biovolume de biofilm présent dans les bassins a pu être observée en présence des souches RA15^T, hOe-125 et hCg-42 ce qui permet d'envisager une application de ces souches en élevage. Par ailleurs, les analyses de metabarcoding ont révélé (i) une modulation des communautés bactériennes du biofilm et (ii) de l'hémolymphe de l'huître plate, permettant également (iii) une première description du microbiote hémolympatique de l'huître plate en conditions de maturation sexuelle. De plus, l'exposition des huîtres aux souches de *Pseudoalteromonas* n'a pas induit de perte de richesse ou de diversité significative parmi les communautés bactériennes en présence, suggérant le maintien du microbiote hémolympatique en présence de ces bactéries. Enfin, l'émission larvaire observée aux termes de la maturation semble être influencée par l'ajout des souches de *Pseudoalteromonas*. Ces résultats confirment la nécessité d'approfondir l'investigation du potentiel probiotique de ces souches.

CHAPITRE 3 – DEVENIR DES SOUCHES DU GENRE *PSEUDOALTEROMONAS* ET DES ALTÉRINES DANS UN SYSTÈME *IN VITRO* SIMULANT LA DIGESTION CHEZ L’HUMAIN

1. Introduction

Les travaux du Chapitre 2 nous permettent d’envisager l’utilisation de souches de *Pseudoalteromonas* comme probiotiques pour l’ostréiculture. L’addition de ces bactéries dans des bassins d’élevage n’a pas causé de surmortalité pour l’huître plate, tout en modulant le microbiote hémolymphatique. De plus, une réduction significative du biovolume de biofilm se formant dans les bassins a été observée, sans altération de la diversité de sa composition bactérienne. D’autre part, bien que la présence de ces souches dans l’hémolymphe et l’eau des bassins soit transitoire et que la détection des altérines n’a pas été possible durant l’expérimentation (Cuny, 2022), il ne peut être exclu qu’elles soient absentes de l’élevage. Le consommateur final reste donc potentiellement exposé à ces souches et aux altérines. Ainsi, la possible présence des souches de *Pseudoalteromonas* et leur éventuelle production d’altérines au sein des huîtres pose la question de leur devenir pour le consommateur. Dès lors, la question du devenir des souches de *Pseudoalteromonas* et des altérines qu’elles produisent se pose afin d’apprécier leur innocuité pour l’Homme, et ici l’évaluation de leur devenir dans le tractus digestif.

Dans le cas d’une utilisation de probiotiques pour animaux, il convient de considérer les conséquences pour l’environnement et la santé du consommateur (Fu *et al.*, 2020). De plus, l’impact des probiotiques utilisés en élevage sur le consommateur est une problématique à étudier pour le développement de ces microorganismes, certes bénéfiques pour l’espèce élevée mais pouvant présenter un risque pour l’Humain (Bhogoju and Nahashon, 2022). Dans le cadre d’une utilisation des *Pseudoalteromonas* en tant que probiotique en ostréiculture, il est possible que le probiotique soit au contact du consommateur. Ainsi, l’étude du devenir des souches de *Pseudoalteromonas* dans le tractus gastro-intestinal a été réalisé, en tant que prérequis nécessaire pour définir les risques d’exposition pour l’Humain (Sanders *et al.*, 2010).

1.1. Simulation de la digestion humaine : modèles *in vitro*

1.1.1. La digestion chez l'Homme

Le tractus gastrointestinal humain (Figure 24) composé de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin (ou côlon) se termine par le rectum et l'anus où les déchets sont excrétés (Sensoy, 2021). Dans un premier temps, les aliments sont broyés en petites portions dans la bouche (pH 5-7) par un processus mécanique, la mastication. Ces fragments générés sont également mélangés à la salive contenant de l'amylase pour faciliter et accélérer leur passage dans le tractus digestif (C. Li et al., 2023). Cette enzyme hydrolyse l'amidon pour aboutir à des disaccharides (Sensoy, 2021).

La digestion se poursuit ensuite dans l'estomac (pH 1-3) avec une dégradation à la fois mécanique, chimique et enzymatique sous l'action de lipase et de pepsine (Sensoy, 2021). La lipase permet la digestion des lipides tels que les triglycérides (Bakala N'Goma *et al.*, 2012). La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau de divers acides aminés : phénylalanine, tryptophane, tyrosine en particulier mais également la méthionine et la leucine (Accardo *et al.*, 2024). L'activité de cette enzyme est dépendante du pH et optimale en milieu acide. L'acidité du milieu permet également la préparation de l'absorption de la nourriture par l'intestin grêle en aidant notamment à la digestion des protéines (Ramsay and Carr, 2011). D'autre part, les contractions de l'estomac entraînent le mélange et le broyage des particules alimentaires (Sensoy, 2021).

Les processus d'assimilation des nutriments ont majoritairement lieu dans l'intestin grêle (Lentle and Janssen, 2011). L'intestin grêle (pH 6-7,5) est divisé en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum est le segment dans lequel la pancréatine et la bile sont sécrétés : dans ce compartiment sont dégradés les protéines, les glucides, les triglycérides et les acides nucléiques (Sensoy, 2021). La pancréatine est un mélange enzymatique comprenant : l'amylase, la lipase et des protéases telles que la trypsine et la chymotrypsine (Johnson and Hillier, 2007). La trypsine clive les liaisons peptidiques spécifiquement au niveau du groupement carbonyle des résidus d'arginine et de lysine (Granvogl *et al.*, 2007). Quant à la chymotrypsine, cette endopeptidase clive les liaisons peptidiques après les résidus d'acides aminés aliphatiques comme la leucine (Whitcomb and Lowe, 2007). Des contractions mécaniques sont observées dans l'intestin grêle, permettant le

mélange et le transport du chyme (Patel and Thavamani, 2024), qui correspond à la mixture des sécrétions digestives et des aliments digérés (Picot *et al.*, 2020).

Le gros intestin, colonisé par de nombreux microorganismes, permet la dégradation de fibres non-digérées par l'intestin grêle (Sensoy, 2021). De nombreuses vitamines essentielles comme la vitamine B1 et K sont sécrétées par certains de ces microorganismes (Rogers, 2010).

1.1.2. Modèles de digestion *in vitro* : INFOGEST ET TIM-1

De nombreux modèles *in vitro* reproduisent les phénomènes physico-chimiques et mécaniques se déroulant durant la digestion afin de pouvoir en effectuer la simulation *in vitro*. Parmi ces modèles figurent le protocole de digestion statique INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019) et le TIM-1 ou *TNO Gastro-Intestinal Model* (Minekus, 2015), un modèle dynamique de digestion (Figure 24). Ces deux modèles *in vitro* permettent de soumettre des souches bactériennes ou encore des molécules à des conditions environnementales (température, pH, exposition à des enzymes) et à des temps de séjour similaires à ceux retrouvés lors d'une digestion classique. Un échantillonnage peut être réalisé à chaque compartiment de digestion, ce qui permet ensuite de réaliser des analyses afin de suivre la dégradation du composé d'intérêt (Hall and Moraru, 2022).

Le protocole INFOGEST est un modèle de digestion statique qui permet la simulation des processus physicochimiques se déroulant dans 3 compartiments du tractus : la bouche (phase orale), l'estomac (phase gastrique) et l'intestin grêle (phase intestinale). Ainsi, l'effet des fluides digestifs, des enzymes, du pH et de la température peuvent être observés (Zhou *et al.*, 2023). Cependant, ce protocole présente une version simplifiée des processus digestifs car il ne tient pas compte de l'aspect cinétique (Calero *et al.*, 2024).

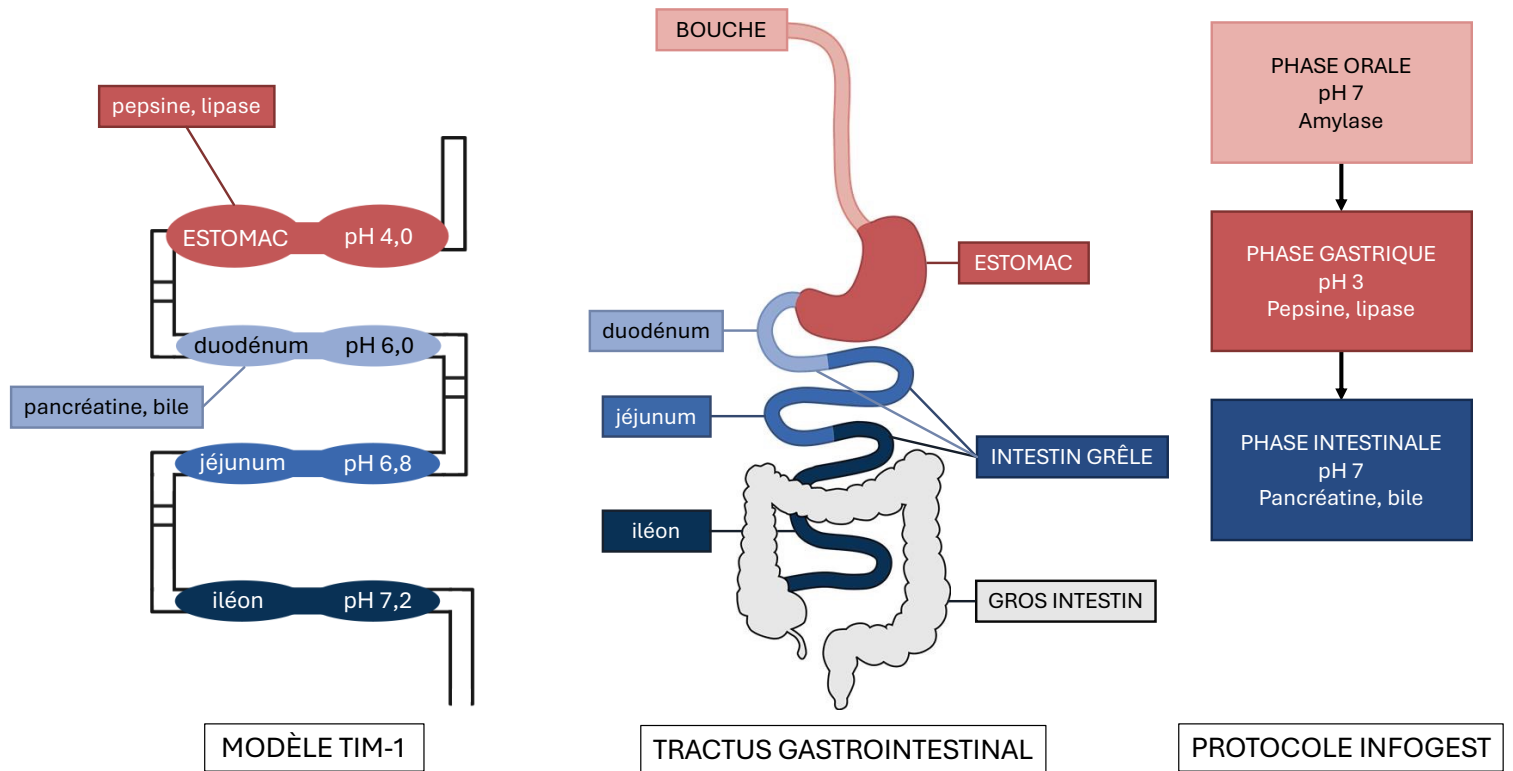


Figure 24. Schéma récapitulatif des deux méthodes de digestion *in vitro* (TIM-1 et INFOGEST) en lien avec les compartiments du tractus gastrointestinal humain. Adaptation de Hall and Moraru, 2022.

Le TIM-1 est un modèle dynamique qui permet d'analyser le processus de digestion au niveau de l'estomac et des trois compartiments de l'intestin grêle : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Cordonnier *et al.*, 2015). Comme le protocole INFOGEST, le TIM-1 permet d'apprécier les processus physico-chimiques se déroulant dans le tractus gastrointestinal. De plus, ce modèle permet d'appréhender la cinétique de digestion avec un passage progressif des fluides d'un compartiment à l'autre assuré par des valves dites péristaltiques (Hall and Moraru, 2022). Ces valves permettent ainsi la simulation du mouvement péristaltique, qui fait référence aux contractions ondulatoires réalisées par les différents compartiments pour déplacer les fluides digestifs (Sensoy, 2021). La dynamique de digestion se rapproche alors davantage des conditions de digestion *in vivo*, ce qui en fait un modèle plus précis que le protocole INFOGEST.

1.2. Digestibilité *in vitro* de souches probiotiques

Les essais de digestion de probiotiques concernent majoritairement des probiotiques destinés à la consommation humaine et donc principalement des bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. ou encore *Bifidobacterium* spp. (Sanders *et al.*, 2018). La simulation de digestion de ces souches *in vitro* montre une dégradation importante des cellules viables dès la phase gastrique de digestion, avec seulement 3 à 5% et 1% de cellules viables

après digestion gastrique des souches *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 et *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, respectivement. Aux termes de la digestion *in vitro* réalisée sur le TIM-1, les pourcentages de survie sont de 2% pour *B. bifidum* et de 0,1% pour *L. gasseri* (Venema *et al.*, 2019). Ainsi, il apparaît que la survie bactérienne de ces souches soit grandement impactée par le compartiment gastrique plutôt que le compartiment intestinal, où la viabilité de la souche de *B. bifidum* reste stable.

Dans un premier temps, l'acidité du contenu gastrique a un impact sur la viabilité des souches (Bezkorovainy, 2001), observé précédemment lors de la digestion de bactéries lactiques (*B. bifidum* et *L. gasseri*) sur le TIM-1 (Venema *et al.*, 2019). Un faible pH (pH <3) et la présence de grandes quantités de pepsine aboutissent à la réduction de la viabilité bactérienne (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015). D'autre part, les sels biliaires de l'intestin grêle associés à la présence d'enzymes telles que la pancréatine et la lipase sont un obstacle majeur à la survie bactérienne des souches probiotiques (Noh and Gilliland, 1993). En effet, les sels biliaires sont des composés antibactériens dont le mode d'action altère la membrane cellulaire des bactéries (Urdaneta and Casadesús, 2017). Cependant, l'augmentation du pH (pH > 6) est favorable à la croissance bactérienne et peut ainsi garantir la survie des bactéries lactiques jusque dans le colon (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015). Le métabolisme des bactéries est donc être fortement impacté par des facteurs environnementaux tels que le pH, la salinité, la température ou encore la disponibilité en nutriments (Jin and Kirk, 2018).

1.3. Digestibilité *in vitro* de peptides antimicrobiens

1.3.1. Dégradation différentielle des peptides dans le tractus gastro-intestinal

Le devenir *in vitro* de peptides antimicrobiens en système digestif humain est utilisé pour apprécier les applications possibles pour ces peptides bioactifs, particulièrement en cas d'utilisation thérapeutique *per os* ou encore comme bioconservateurs alimentaires (Huan *et al.*, 2020). Par exemple, en cas d'applications en tant que bioconservateurs alimentaires, une digestion rapide dans le tractus gastro-intestinal de ces peptides est souhaitée, afin d'éviter un phénomène de bioaccumulation chez l'Homme (Cashman-Kadri *et al.*, 2023). À l'inverse, en cas d'utilisation des peptides comme antibiotiques, des technologies comme les systèmes de protection par encapsulation et de libération contrôlée sont souvent nécessaires afin de permettre au traitement d'atteindre sa cible thérapeutique, particulièrement en cas

d'administration orale (Soltani *et al.*, 2022). La digestion peut non seulement diminuer la biodisponibilité des peptides dans les compartiments ciblés mais également les dégrader (Zhao *et al.*, 2021). Ce phénomène peut induire une réévaluation de l'utilisation de ces peptides ou l'emploi de différentes formulations pour atteindre l'effet désiré (Wang *et al.*, 2019). Par exemple, des méthodes d'encapsulation de la nisine, un peptide antibactérien, ont été mises au point pour préserver son activité et protéger la matrice alimentaire contre d'éventuelles contaminations durant la conservation (Narsaiah *et al.*, 2014), ou encore pour limiter sa dégradation dans le tractus gastro-intestinal et assurer l'inhibition de la bactérie *Clostridium difficile* dans le colon (Ugurlu *et al.*, 2007). Par conséquent, différentes études de digestibilité ont été réalisées afin de suivre le devenir de peptides antimicrobiens dans le tractus gastro-intestinal (Tableau 9).

Certains peptides antimicrobiens sont stables après leur passage dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal. C'est le cas de la cyclotide katala-B1, un peptide antibactérien (Kremsmayr *et al.*, 2022) et de la défensine NaD1 qui présente une activité antifongique (Parisi *et al.*, 2020). La polymyxine B est utilisée pour éviter l'apparition d'infections après une chirurgie gastro-intestinale, impliquant le maintien de son activité antimicrobienne dans le tractus et donc sa stabilité (Scheufele *et al.*, 2020).

D'autres peptides conservent une certaine stabilité lors de leur passage dans l'estomac mais sont dégradés au niveau de la phase intestinale. C'est notamment le cas de la nisine (Soltani *et al.*, 2022), du peptide lasso microcine J25 (MccJ25 ; Naimi *et al.*, 2018) et de la pédiocine PA-1 (Kheadr *et al.*, 2010). La digestion de ces deux derniers peptides a été étudiée avec le modèle du TIM-1. La dégradation de la MccJ25 et de la pédiocine PA-1 débute dès leur passage dans le duodénum, avec une dégradation majeure dans les compartiments jéjunaux et iléaux pour la pédiocine PA-1 (Kheadr *et al.*, 2010). La MccJ25 est dégradée lors de son passage au sein du duodénum (Naimi *et al.*, 2018). Néanmoins, une activité antibactérienne reste détectable tout au long du processus de digestion, suggérant que la dégradation de ce peptide est seulement partielle, ce qui peut être expliqué par sa structure en lasso (Soltani *et al.*, 2022). Enfin, la rhésus θ -défensine 1 (RTD-1), peptide antimicrobien (Kremsmayr *et al.*, 2022) et la cathélicidine-BF, peptide antibactérien actif contre les bactéries à Gram négatif comme *Salmonella typhimurium* sont également dégradés dans l'intestin grêle (Xia *et al.*, 2015).

Enfin, certains peptides sont dégradés dès la phase gastrique : c'est le cas du peptide antimicrobien AMGAP qui montre une forte homologie avec une enzyme, la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Après 20 minutes de digestion par le TIM-1, ce peptide est en effet dégradé et inactif (Offret *et al.*, 2019a). La colistine (polymyxine E), peptide antibactérien actif contre les bactéries à Gram négatif, est également dégradée dès son arrivée dans l'estomac (Rhouma *et al.*, 2015), tout comme pour la bactofencine A, peptide possédant une activité antimicrobienne (Soltani *et al.*, 2022) et antivirale (Li *et al.*, 2018). La bactofencine A s'est avérée particulièrement sensible à la pepsine, d'où sa dégradation lors de la phase stomacale (Soltani *et al.*, 2022).

Tableau 9. Digestion *in vitro* de peptides antimicrobiens et suivi de leur dégradation au sein du tractus gastrointestinal (GI).

	Caractéristiques structurales	Bioactivité	Dégradation tractus GI	Méthode <i>in vitro</i>	Références
Nisine Z	3331 Da - polycyclique	Antimicrobien	Intestin grêle	INFOGEST	Soltani <i>et al.</i> , 2022
Peptide NA-inhibiteur	2163 Da	Antiviral	Estomac	Protocole de digestion statique d'après (Sangsawad <i>et al.</i> , 2017)	Li <i>et al.</i> , 2018
Rhésus θ-défensine 1	2081,6 Da - cyclique	Antimicrobien	Intestin grêle	United States Pharmacopeia	Kremsmayr <i>et al.</i> , 2022
Cyclotide kalata B1	2841,2 Da - cyclique	Antibactérien	Stable	United States Pharmacopeia	Kremsmayr <i>et al.</i> , 2022
Défensine NaD1	5304,32 Da - feuillets β (ponts disulfures)	Antifongique	Stable	Protocole de digestion statique d'après (Fu, Abbott and Hatzos, 2002)	Parisi <i>et al.</i> , 2020
Bactofencine A	2783,32 Da - linéaire	Antimicrobien	Estomac	INFOGEST	Soltani <i>et al.</i> , 2022
Cathelicidin-BF	3618,51 Da	Antibactérien	Intestin grêle	Protocole de digestion dynamique d'après (Xia <i>et al.</i> , 2015)	Xia, Zhang and Wang, 2015
Microcine J25	2107,3 Da – polypeptide cyclique	Antimicrobien	Intestin grêle (duodénum)	INFOGEST et TIM-1	Naimi <i>et al.</i> , 2018 ; Soltani <i>et al.</i> , 2022
Peptide AMGAP	1584,84 Da - linéaire	Antibactérien	Estomac	TIM-1	Offret <i>et al.</i> , 2019a
Pédiocine PA-1	4624 Da - cyclique	Antimicrobien	Intestin grêle (jéjunum, iléon)	TIM-1	Kheadr <i>et al.</i> , 2010
Colistine (Polymyxine E)	1155 Da – polypeptide cyclique	Antibactérien	Estomac	United States Pharmacopeia	Rhouma <i>et al.</i> , 2015

1.3.2. Résistance des peptides à la digestion

Les nombreux essais de digestion à l'aide de méthodes *in vitro* tels que le protocole INFOGEST ou le TIM-1 permettent d'apprécier la dégradabilité de ces peptides qui présentent une grande diversité structurale. Le nombre croissant d'études dans ce domaine permet de faire des premières corrélations entre la structure et la stabilité de ces peptides, mettant en lumière certaines tendances (Ahmed *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019). Une meilleure connaissance de la relation structure-stabilité permettrait de synthétiser des peptides pour une application donnée, demandant une faible stabilité dans le tractus gastro-intestinal ou au contraire une certaine résistance (Cresti *et al.*, 2024).

Le poids moléculaire, la composition en acides aminés, la charge et l'hydrophobicité d'un peptide peuvent ainsi être corrélés à une certaine stabilité gastro-intestinale *in vitro* (Wang *et al.*, 2019). En effet, les peptides stables présentent des charges nettes positives (à pH 7) avec une plus grande prévalence de résidus basiques comme l'histidine. À l'inverse, la leucine est associée à une instabilité pendant la digestion et se trouve fréquemment en position C-terminale de peptides instables car sensibles à la pepsine et la chymotrypsine (Ahmed *et al.*, 2022).

De la même manière, les peptides comprenant une lysine ou une arginine en extension C-terminale sont particulièrement sensibles à la trypsine (Wang *et al.*, 2019). De plus, il semble que les peptides de hauts poids moléculaires sont plus susceptibles d'être hydrolysés durant la digestion par rapport à des peptides présentant un poids moléculaire plus faible (Chen and Li, 2012), qui ont tendance à présenter une plus grande stabilité (Wang *et al.*, 2019). De plus, l'hydrophobicité d'un peptide est liée à une diminution de sa stabilité dans le tractus gastro-intestinal (Xie *et al.*, 2015).

En dépit du nombre de molécules étudiées, et notamment parmi les peptides, les résultats issus de la littérature ne permettent pas de présumer du devenir des altérines dans un système digestif.

Devenir des souches de *Pseudoalteromonas* et des altérines dans un système digestif *in vitro*

Dans le cas d'une utilisation en aquaculture, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ainsi que les altérines qu'elles produisent peuvent être présentes au sein des huîtres ou autres produits de la mer. Leur devenir dans un modèle de système digestif humain constitue un apport d'informations indispensable à la poursuite de leur développement en tant que probiotiques pour l'aquaculture. Un suivi (i) des souches du genre *Pseudoalteromonas* et (ii) des altérines qu'elles produisent a été effectué grâce au protocole de digestion *in vitro* INFOGEST. De plus, un suivi de digestion dynamique des altérines a pu être réalisé grâce à l'utilisation du TIM-1 afin de préciser leur cinétique de dégradation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Purification des altérines

Les altérines ont été purifiées à partir de surnageants de culture des souches *Pseudoalteromonas ostreae* hOe-66 et *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42 selon le protocole explicité dans le Chapitre 1. Des fractions correspondant aux différentes altérines pures (caractérisées par différentes masses molaires) ont ainsi été purifiées : 926 Da (5,8 mg), 940 Da (6,4 mg), 954 Da (6,5 mg), 970 Da (2,1mg) et 980 Da (3,7 mg). Le dosage de chaque altérine a été réalisé par BCA-assay (Chapitre 1) à l'aide du kit Micro-BC Assays UP75860 (Uptima, Interchim, France). Ainsi, ces différentes fractions ont été regroupées en un mélange de 24,5 mg, permettant les différents essais de digestion *in vitro* à l'aide du protocole INFOGEST ou encore un modèle *in vitro* du tractus gastro-intestinal, le TIM-1.

2.2. Protocole INFOGEST : digestion statique

La digestion des bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ainsi que des altérines a été réalisée en suivant le protocole INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019). Ce protocole permet d'observer la digestion de matrices alimentaires, de bactéries ou encore de peptides. Trois phases de digestion sont étudiées : la phase orale (PO), la phase gastrique (PG) et enfin la phase intestinale (PI). Cette expérimentation a été réalisée en triplicats pour les altérines et pour les souches de *Pseudoalteromonas*.

2.2.1. Préparation des suspensions des bactéries et des altérines

Les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ont été cultivées pendant 24h sous agitation (100 rpm) en milieu Marine Broth (Difco™ 2216, Thermo Fisher). Les bactéries sélectionnées sont *P. ostreae* hOe-125 ou hOe-125 (Cuny *et al.*, 2021), *P. rhizosphaerae* hCg-42 ou hCg-42 (Defer *et al.*, 2013) et *P. rhizosphaerae* RA15^T ou RA15^T (Navarro-Torre *et al.*, 2020). Ces souches avaient été sélectionnées préalablement pour évaluer leur effet *in vivo* sur une maturation d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Chapitre 2). Cette sélection a été réalisée à la suite d'une analyse des génomes des souches de *Pseudoalteromonas in silico* et des études de leur spectre antimicrobien contre un panel de bactéries pathogènes (Desriac *et al.*, 2020; Offret *et al.*, 2022), également réalisée dans le Chapitre 1. Une mesure de la densité optique au spectrophotomètre a été réalisée pour obtenir des suspensions de 5 mL à une concentration de 10⁶ UFC/mL. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 7000g pendant 15 minutes et lavées avec une solution de Sea Salts 3%. Après une nouvelle centrifugation, les culots ont été suspendus dans 5 mL de cette même solution qui est également utilisée comme témoin négatif. Pour l'expérimentation, 0,25 mg du mélange d'altérines a été solubilisé dans 5 mL d'eau MilliQ. Les suspensions d'altérines et des bactéries testées ont donc ensuite été digérées selon le protocole INFOGEST.

2.2.2. Digestion statique INFOGEST et échantillonnage

La digestion des altérines et des souches de *Pseudoalteromonas* (Figure 2) à l'aide du protocole INFOGEST s'est déroulée en plusieurs étapes :

1. Une suspension de 5 mL de bactéries/altérines a été préparée dans 4 tubes distincts ;
2. Un premier échantillon (P1) a été prélevé avant le début de l'expérimentation ;
3. La solution correspondant à la phase orale (5 mL) a ensuite été ajoutée pour atteindre un volume total de 10 mL. Après incubation à 37°C sous agitation pendant 2 minutes, un second échantillon (P2) a été prélevé dans l'un des trois tubes restants ;
4. La phase gastrique (10 mL) a été ajoutée, doublant ainsi le volume à 20 mL. Après incubation à 37°C sous agitation pendant 2 heures, un troisième échantillon (P3) a été prélevé ;
5. Enfin, le fluide intestinal (20 mL) a été ajouté, suivi d'une incubation de 2 heures à 37°C. Le dernier échantillon (P4) a été prélevé à la fin de cette étape.

Tous les prélèvements ont été conservés à -80°C avant analyses : voir le paragraphe 2.4 pour les souches de *Pseudoalteromonas* et 2.5 pour les altérines.

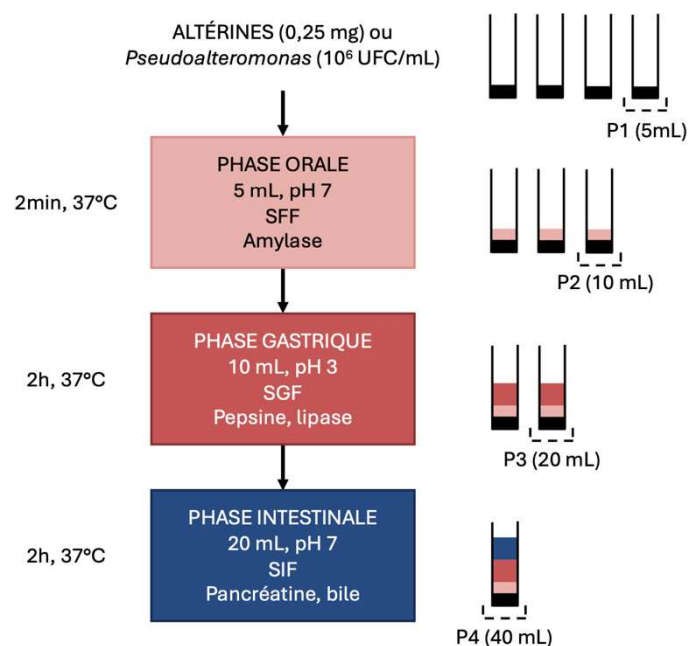


Figure 25. Schéma récapitulatif du protocole INFOGEST. Chaque phase est ajoutée aux tubes au fur et à mesure de l'expérimentation (altérines ou souches = noir, phase orale = rose clair, phase gastrique = rose foncé et phase intestinale = bleu). À droite du schéma sont indiqués les prélèvements effectués (P1 à P4).

Les fluides de digestion simulant chaque phase de l'expérimentation sont préparés la veille : le fluide SSF (*simulated salivary fluid*) est utilisé pour la phase orale, le SGF (*simulated gastric fluid*) pour la phase gastrique et le SIF (*simulated intestinal fluid*) pour la phase intestinale (Tableau 10).

Tableau 10. Préparation des solutions mères (mL) des différents fluides de digestions.

	pH 7,0	pH 3,0	pH 7,0
	SSF	SGF	SIF
Volume total (mL)	83,3	116,7	150
KCl (0,5 M)	3,1	2,0	2,6
KH₂PO₄ (0,5 M)	0,8	0,3	0,3
NaHCO₃ (1 M)	1,4	3,6	15,9
NaCl (2 M)	-	3,4	3,6
MgCl₂ (0,15 M)	0,1	0,1	0,4
(NH₄)₂CO₃ (0,5 M)	0,01	0,1	-
Eau MilliQ	77,9	106,7	126,9

Le jour même de l'expérimentation, les fluides correspondant à chaque phase ont été préparés avec l'ajout des enzymes digestives, de la bile et du chlorure de calcium (Tableau 11).

Tableau 11. Composition et pH des différentes phases de digestion lors de l'expérimentation INFOGEST. Les volumes sont indiqués en millilitres.

	pH 7,0	pH 3,0	pH 7,0
	Orale	Gastrique	Intestinale
Volume total (mL)	80,00	99,00	75,00
SFF	64,00	-	-
SGF	-	88,00	-
SiF	-	-	51,00
CaCl₂ 0,3 M	0,40	0,06	0,24
Eau MilliQ	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.
Amylase 75 U/mL	8,00	-	-
Pepsine 2.10³ U/mL	-	0,50/tube	-
Lipase 60 U/mL	-	0,50/tube	
Pancréatine 100 U/mL	-	-	5,00/tube
Bile 10 mM	-	-	2,50/tube

2.3. Digestion dynamique : utilisation du TIM-1, modèle *in vitro*

Le modèle de digestion *in vitro* TIM-1 (TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist Pays-Bas) a été utilisé (plateforme de digestion *in vitro* de l'INAF, Université Laval, Canada). Un TIM-1 contrôle a été réalisé (Eau MilliQ) et deux TIM-1 ont été réalisés pour étudier la digestion des altérines (10 mg). Durant la digestion dynamique des altérines sur le modèle du TIM-1 (Figure 26), quatre compartiments ont été analysés : l'estomac, le duodénum, le jéjunum et enfin l'iléon. Des prélèvements de 10 mL des différents compartiments ont été réalisés : à 0, 20 et 40 minutes pour l'estomac. Le duodénum, jéjunum, iléon ainsi que les effluents ont été prélevés au bout de 20, 40, 60 et 120 minutes. À chaque prélèvement, 10 mL de solution d'électrolytes de l'estomac, ou de résidu duodénil le cas échéant, ont été injectés dans les compartiments correspondants pour compenser les volumes prélevés.

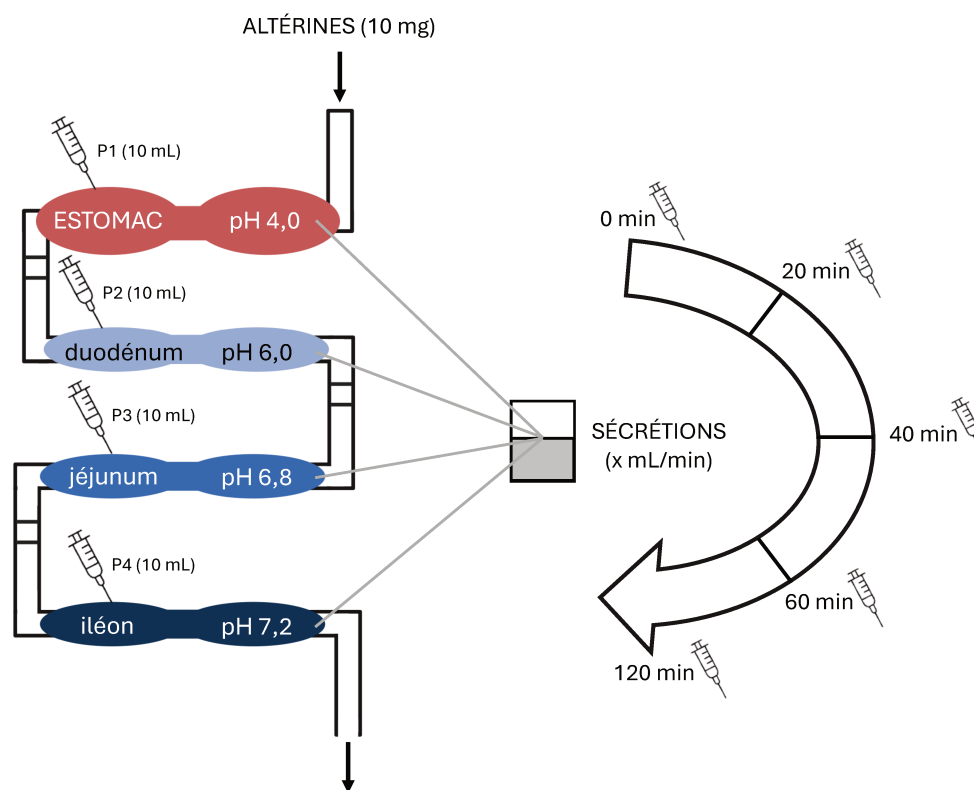


Figure 26. Schéma récapitulatif de la digestion des altérines sur le TIM-1, modèle dynamique *in vitro*. Des sécrétions sont apportées à chaque compartiment à un certain débit qui varie au cours de la digestion. La digestion dure 120 minutes et des prélèvements ont été réalisés pour chaque compartiment (P1 à P4) et à différents temps. Le modèle est maintenu à une température de 37°C toute la durée de l'expérimentation.

La veille de l'expérimentation, différentes solutions sont préparées afin d'alimenter les compartiments du système de digestion *in vitro* (Tableau 12). Des solutions permettant la régulation du pH sont également préparées en amont de l'expérimentation. Ces solutions ont donc servi de contenu initial pour les différents compartiments du modèle *in vitro* (Tableau 13). D'autres solutions, nommées sécrétions, préparées en amont de l'expérimentation ont été branchées à l'aide de valves, permettant un apport continu durant l'expérimentation afin de simuler la digestion. Parmi ces sécrétions, figurent les enzymes digestives, la bile ou encore les acides/bases utilisés afin de maintenir le pH des compartiments durant la digestion.

Tableau 12. Composition des solutions mères d'électrolytes gastriques et de l'intestin grêle utilisées pour le modèle de digestion *in vitro*, le TIM-1.

		pH 7,0
	Solution gastrique 10X	Solution d'électrolytes de l'intestin grêle 25X
Poids total (g)	484,0 ± 2	940,0 ± 10
NaCl	31,0 ± 0,5	125,0 ± 2
KCl	11,0 ± 0,2	15,0 ± 0,5
CaCl₂	1,5 ± 0,03	7,5 ± 0,3

Tableau 13. Contenu et sécrétions des différents compartiments du TIM-1 adapté de (Cordonnier *et al.*, 2015)

	Compartiment	Contenu initial	Sécrétions	Volume (mL)
pH 4,0	Estomac	Solution d'électrolytes de l'estomac Pepsine (5200 U) Lipase (200 U)	Suc gastrique : pepsine (520 U/mL) et lipase 20 U/mL dans une solution d'électrolytes - 0,25 mL/min Eau ou HCl 0,5 M - 0,25 mL/min	310
pH 6,0	Duodénum	Solution d'électrolytes de l'intestin grêle (SIES) Solution de pancréatine (15g – 4% - 8xUSP) Solution de bile porcine (30g – 4%) Trypsine (1 mL – 2 mg/mL)	Solution de pancréatine 4% - 0,25 mL/min Bile (4% puis 2% au bout de 30 minutes) – 0,5 mL/min SIES ou NaHCO ₃ 1 M – 0,25 mL/min	55
pH 6,8	Jéjunum	SIES	NaHCO ₃ 1 M	100
pH 7,2	Iléon	SIES	NaHCO ₃ 1 M	100

2.4. Digestion des souches du genre *Pseudoalteromonas* : analyses (INFOGEST)

2.4.1. Dénombrement bactérien

À partir des différents échantillons, une quantité de 20 µL a été prélevée puis étalée en duplicata sur des géloses pour une gamme de dilutions allant de 10⁰ à 10⁻⁸. Les dilutions ont été réalisées dans de l'eau peptonée (Gibco™ Bacto™ Peptone, Thermo Fischer Scientific, États-Unis) 1% (v/v) puis étalées sur milieu Marine Agar avant incubation à 18°C. Enfin, le dénombrement des colonies obtenues a été effectué à 24 et 48h.

2.5. Digestion des altérines : analyses (INFOGEST et TIM-1)

2.5.1. Traitement des échantillons

Les échantillons obtenus au cours des deux digestions ont été soumis à un traitement thermique de 100°C pendant 5 minutes, permettant l'inactivation des enzymes de digestion utilisées afin d'éviter la dégradation des composés post-expérimentation. Ce traitement thermique est possible car les altérines sont thermostables (Desriac, 2010). Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C avant purification sur colonne de silice SPE C18 (Solide Phase Extraction). L'acétonitrile (Thermo Fischer Scientific, États-Unis), de l'eau MilliQ et de l'acide trifluoroacétique (TFA, Sigma-Aldrich, États-Unis) ont été utilisés pour cette purification. Les solvants A (H₂O + 0,1% TFA) et B (ACN + 0,1% TFA) ont ensuite été préparés. Ainsi, les colonnes SiliaPrep C18 (Silicycle, Québec, Canada) ont été conditionnées avec un mélange de 10% A et 90% B (12 mL) puis 90% A (12 mL). Après dépôt des échantillons sur colonne, un lavage a été réalisé avec 90% A (12 mL). L'élution a ensuite été réalisée avec 40% A (5 mL). Les éluats obtenus ont ensuite été filtrés sur une membrane 10 kDa (Cytiva, États-Unis) avant analyses ultérieures.

2.5.2. Test antibactérien

Des tests d'activité antagoniste contre *Escherichia coli* SBS363 ont été réalisés à l'aide de la technique d'inondation sur gélose. Ainsi, une culture de 24h d'*E. coli* dans du Tryptic Soy Broth (TSB, BD Difco™, États-Unis) a été diluée pour atteindre une concentration finale de 10⁶ UFC/mL dans un volume de 5 mL qui a été étalé sur une gélose de Tryptic Soy Agar (TSB + Agar, VWR Avantor™, États-Unis). Après 15 minutes d'imprégnation, le volume en excès a été éliminé avant séchage de la gélose sous hotte pendant 1h. Chaque éluat obtenu après passage sur colonne SPE C18 a été déposé (10 µL) dans des puits formés dans la gélose avant incubation à 37°C de la gélose. Un témoin positif (polymyxine B 1mg/mL, Sigma-Aldrich, États-Unis) et un témoin négatif (ACN 60% supplémenté à 0,1% TFA) ont également été déposés sur la gélose. Les halos d'inhibition se formant autour des puits ont ainsi été observés au bout de 24h d'incubation.

2.5.3. Détection des altérines

Des analyses par UPLC-MS ont permis de détecter les altérines pour les expériences réalisées à l'aide du protocole INFOGEST et du modèle TIM-1. Les analyses ont été réalisées sur un système de chromatographie (UPLC, Ultimate 3000, Dionex) couplé à un détecteur ESI qToF en

mode positif (microTOF-QII, Bruker, États-Unis). Un volume de 20 µL d'échantillon a été injecté sur une colonne EC-C18 (2,7µm 3,0x150mm, Poroshell 120, Agilent) thermostatée à 25°C. La séparation a été réalisée à un débit de 0,3 mL/min (Tableau 14) selon un gradient d'acétonitrile (Biosolve, France) et d'eau acidifiés à l'aide d'acide formique (Biosolve, France). Différentes tensions sont appliquées à la source électrospray : une haute tension au niveau du capillaire (4,5 kV) et une tension appliquée au niveau du cône (500 V) pour accélérer les ions générés vers l'analyseur de masse. Les échantillons de digestion statique ont été analysés par spectrométrie de masse avec une pression de 40 PSI au niveau du nébuliseur, un débit de désolvatation de 12L/min et une température de la source à 200°C. Concernant les échantillons de digestion dynamique (modèle TIM-1), la pression était de 45 PSI, le débit était de 10L/min et la température de 250°C.

Les paramètres de la source et de détection ainsi que l'acidification de la phase mobile ont permis la formation et la détection des ions dichargés et trichargés formés par double et triple protonation des altérines : $[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$, détectables en spectrométrie de masse pour des valeurs de m/z comprises entre 450 et 500 Da (avec $z=2$) et entre 300 et 350 Da (avec $z = 3$).

Tableau 14. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse de la digestion statique INFOGEST des altérines par LC-MS/MS. Le gradient évolue de manière linéaire entre les temps indiqués pour atteindre les pourcentages fixés.

	H₂O 0,1% AF	ACN 0,1% AF
0 minute	90%	10%
5 minutes	90%	10%
23 minutes	72%	28%
41 minutes	66%	34%
42 minutes	40%	60%
44 minutes	40%	60%

Les modes de détection pour l'analyse des échantillons de la digestion statique (INFOGEST) et dynamique (TIM-1) étaient le mode *full scan* et le mode MS/MS automatique, respectivement. En mode *full scan*, le quadripôle n'est pas utilisé et les ions sont directement transmis dans le TOF. Dans ce mode, les données ont été collectées sur une plage de masse de 50 à 1000 m/z avec une vitesse d'acquisition de 0,3 Hz. La quantification relative des altérines

a été effectuée en se basant sur les aires sous les pics des m/z correspondant à chaque altérine. Pour ce faire, le logiciel DataAnalysis (Bruker Daltonics, États-Unis) a été utilisé pour générer des chromatogrammes d'extraction d'ion (EIC). En mode MS/MS automatique, le quadropôle est actif et permet de sélectionner des ions précurseurs avant de les fragmenter dans la cellule de collision. Les paramètres choisis étaient les suivants : jusqu'à 3 ions précurseurs simultanément avec un m/z compris entre 300 et 500 et une intensité dépassant 10^4 unités, exclusion active des ions après 3 spectres de fragmentation identiques, et libération des ions dans l'analyseur TOF après 6 secondes d'accumulation. Le détecteur de masse a été calibré avant chaque série d'analyses par infusion directe d'un mélange d'eau et d'isopropanol (50:50) additionné de 2% d'acide formique et de 1 mM de NaOH.

3. Résultats

3.1. Digestion des souches de *Pseudoalteromonas*: dénombrement des bactéries viables

Au début de l'expérimentation, $4,14 \pm 2,35 \cdot 10^6$ UFC/mL pour la souche hOe-125, $2,69 \pm 0,66 \cdot 10^6$ UFC/mL pour hCg-42 et $3,21 \pm 0,91 \cdot 10^6$ UFC/mL pour RA15^T ont été dénombrées en moyenne. Pour les souches hOe-125 et RA15^T, les valeurs obtenues au terme de la phase orale sont du même ordre de grandeur avec une légère augmentation des concentrations en bactéries viables de $3,11 \pm 1,73 \cdot 10^6$ UFC/mL et $5,00 \pm 1,78 \cdot 10^6$ UFC/mL, respectivement. La concentration en bactéries viables de la souche hCg-42 est également maintenue au terme de la phase orale avec une moyenne de $1,13 \pm 0,75 \cdot 10^8$ UFC/mL. Une perte importante des bactéries cultivables a été observée à partir de la phase gastrique avec un nombre de colonies dénombrées inférieur à 50 UFC/mL pour toutes les souches de *Pseudoalteromonas* confondues (Figure 27).

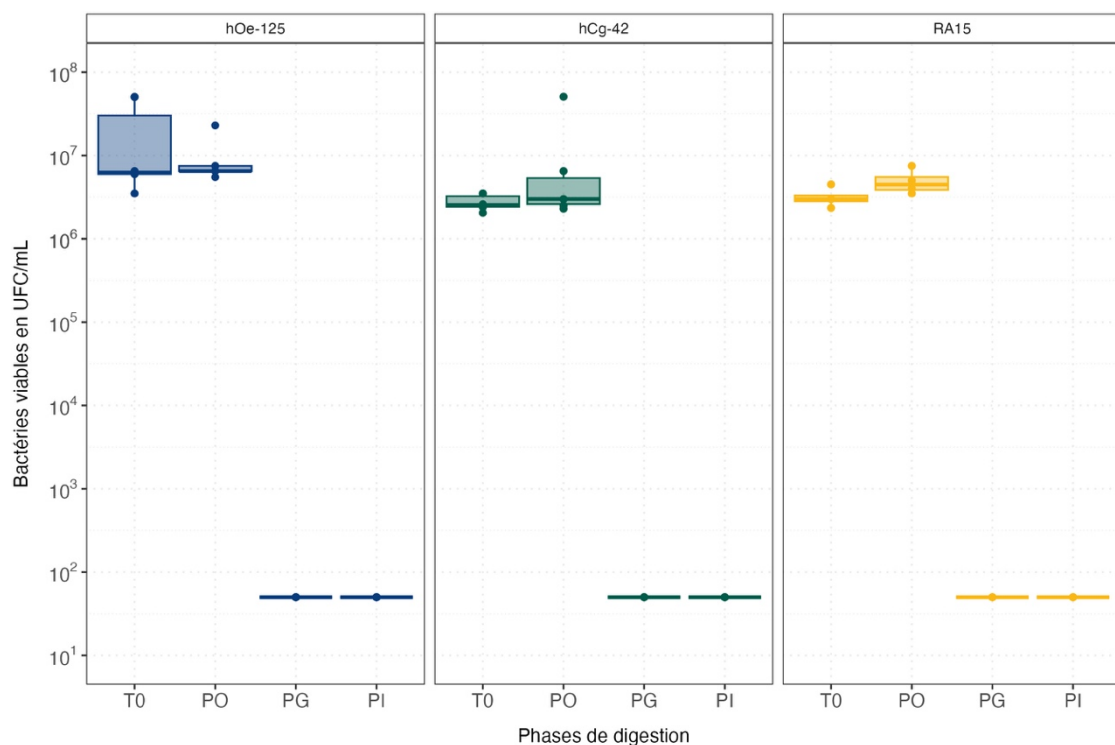


Figure 27. Dénombrement des souches hOe-125, hCg-42 et RA15^T lors de la digestion statique INFOGEST. Les différentes phases en abscisse correspondent à la phase initiale (T0), phase orale (PO), phase gastrique (PG) et phase intestinale (PI) de la digestion.

3.2. Suivi de la dégradation des altérines

3.2.1. Digestion statique INFOGEST

Lors du suivi de la digestion des altérines, une activité antibactérienne a pu être observée avec la présence de halos d'inhibition (Tableau 15). La taille de ces halos est décroissante au fil des phases de digestion, avec des halos très réduits (0,3 cm) à la fin de la phase intestinale (Annexes, Figure A7), mais tout de même signe d'activité antibactérienne. Par conséquent, une diminution de l'activité antibactérienne est observée à la suite de la digestion des altérines.

Tableau 15. Diamètres des halos d'inhibition (cm) à la fin de chaque phase de la digestion des altérines selon le protocole INFOGEST. Les résultats sont représentés d'après ces intervalles : $0 < d \leq 0,3$ [-], $0,3 < d \leq 0,6$ [+], $0,6 < d \leq 0,9$ [++], $d > 0,9$ [+++].

Phase initiale	Phase orale	Phase gastrique	Phase intestinale
+++	+++	+++	+

Les résultats d'UPLC-MS (Figure 28) ont ainsi permis la détection de 5 altérines de masses comprises entre 926 et 982 Da, caractérisées au préalable et éluées entre 15 et 30 minutes.

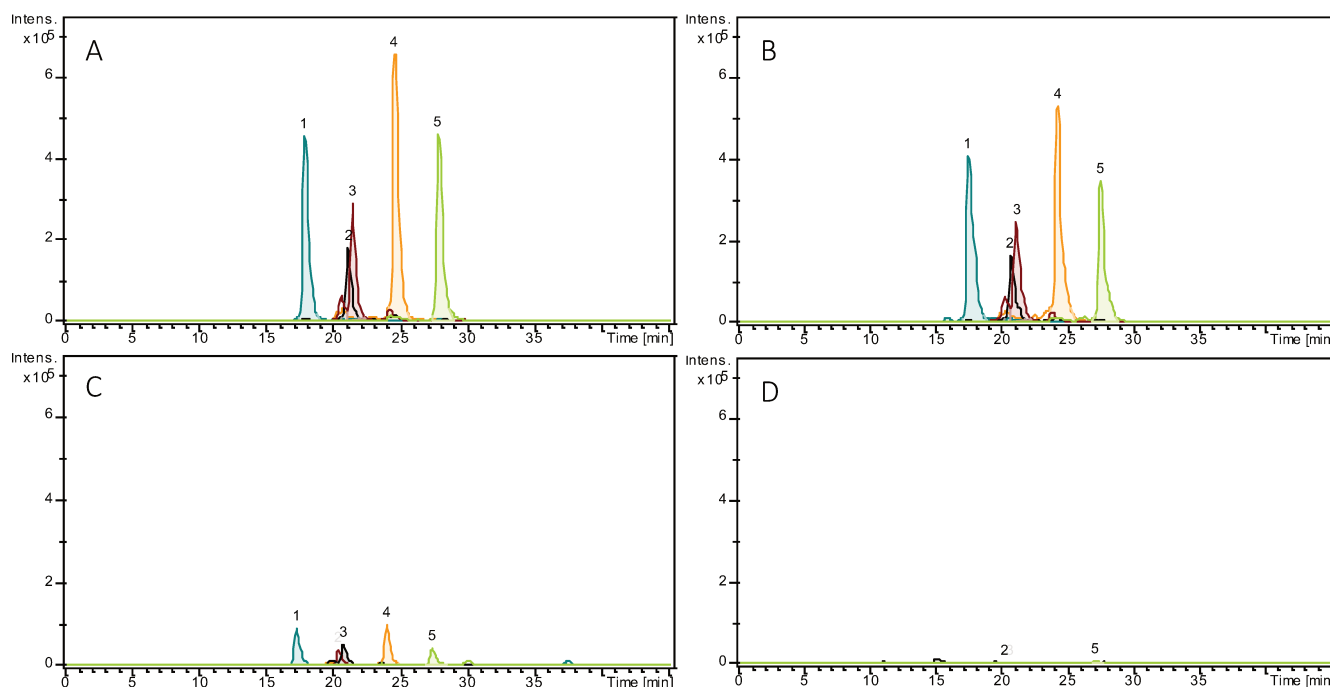


Figure 28. EIC superposés des 5 altérines dont le $[M+2H]^{2+}$ a été détecté : ALT-926 (1), ALT-970 (2), ALT-940 (3), ALT-954 (4) et ALT-980 (5). Ces ions sont détectés à différentes étapes de la digestion statique : condition initiale (A), phase orale (B), phase gastrique (C) et phase intestinale (D).

L'intégration des EIC correspondant aux masses des 5 altérines nous a permis de suivre l'évolution de leur évolution au cours des différentes phases de la digestion (Figure 29 ; Annexes, Tableau A3). En effet, $86,9 \pm 8,4$ % des altérines initialement présentes ont été détectées à la fin de la phase orale. Enfin, les analyses ne permettent de détecter que $13,2 \pm 3,3$ % et $1,6 \pm 1,1$ % des altérines après les phases gastriques et intestinales, respectivement.

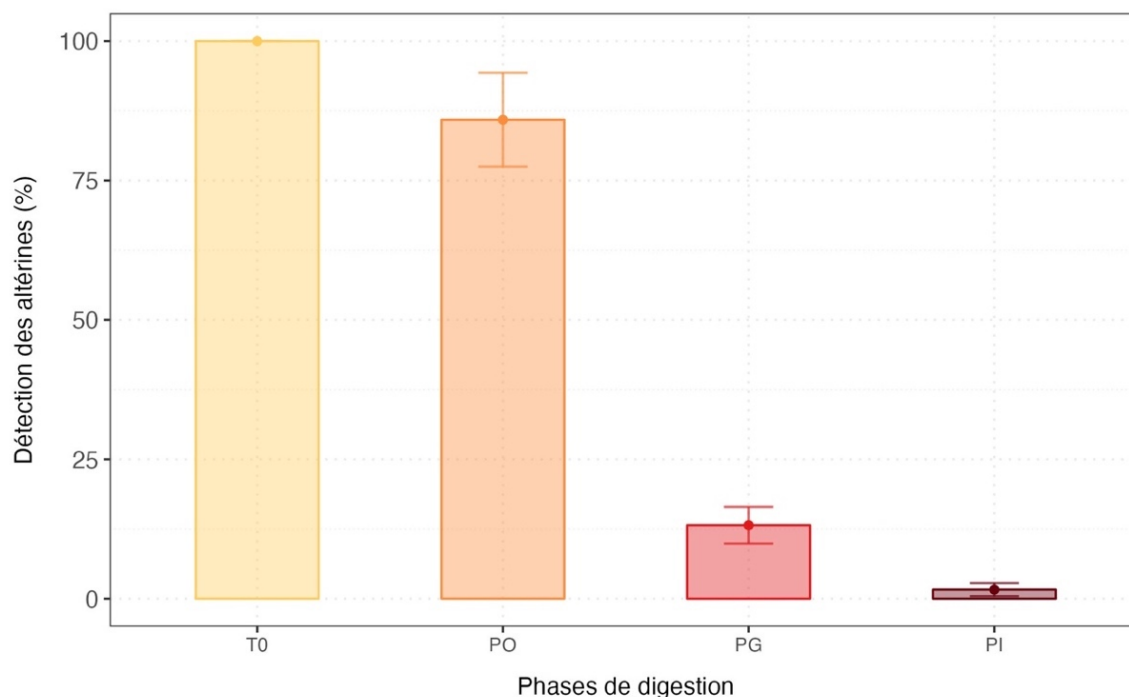


Figure 29. Détection des altérines (%) au sein de chaque phase de la digestion statique par analyses LC-MS/MS. Les pourcentages sont basés sur l'aire sous la courbe des EIC.

Le suivi par UPLC-MS de la digestion des altérines à l'aide du protocole INFOGEST nous indique donc que la dégradation des altérines débute lors de la phase gastrique et est presque totale à la fin de la phase intestinale. Cependant, une activité antibactérienne a été observée à toutes les étapes de la digestion. Ces résultats sont à compléter avec les analyses des résultats du TIM-1, modèle se rapprochant davantage des conditions de digestion humaine *in vivo*.

3.2.2. Cinétique de dégradation des altérines : modèle *in vitro* TIM-1

L'analyse de la digestion des altérines (10 mg) sur le modèle TIM-1 a été réalisée à l'aide de tests d'activité antibactérienne et d'analyses d'UPLC-MS. Dans un premier temps, l'activité antibactérienne des altérines est conservée dans tous les compartiments et à tous les temps de

prélèvements (Tableau 16). Ce maintien de l'activité antibactérienne est cohérent avec ce qui a été observé pour le protocole INFOGEST (Tableau 15). Aucun halo d'inhibition n'a pu être observé pour le TIM-1 contrôle, ce qui indique que ces halos d'inhibitions étaient dus à la digestion des altérines.

Tableau 16. Diamètres des halos d'inhibition (cm) au cours de la digestion des altérines sur le modèle dynamique *in vitro* le TIM-1. Les valeurs obtenues sont indiquées pour les deux réplicats à chaque temps de prélèvement (0, 20, 40, 60 et 120 min) pour chaque compartiment (estomac, duodénum, jéjunum, iléon). Les résultats sont représentés d'après ces intervalles : $0 < d \leq 0,3$ [-], $0,3 < d \leq 0,6$ [+], $0,6 < d \leq 0,9$ [++], $d > 0,9$ [+++].

	Estomac	Duodénum	Jéjunum	Iléon
0 min	+++			
20 min	+++	+++	+++	++
40 min		+++	+++	++
60 min		++	+++	++
120 min		+	+	+

Dans un second temps, les altérines ont été détectées par analyses d'UPLC-MS au sein de l'estomac durant les 40 premières minutes de la digestion (Figure 30 ; Annexes, Tableau A4). En revanche, à partir du duodénum, les altérines ne sont plus détectées (Figure 30). Les altérines sont donc dégradées dès les 20 premières minutes de digestion au sein du duodénum. Cependant, une activité antimicrobienne, corrélée à la digestion des altérines, avait été observée au sein de tous les compartiments (Tableau 16). Ainsi, une recherche des possibles produits de dégradation des altérines a permis de détecter deux ions dichargés de m/z 421,60 et 458,78 (Figure 30D), dont la présence coïncide avec la dégradation des altérines dans le duodénum (Figure 30B). Ces ions dichargés ont été détectés dans tous les compartiments intestinaux (duodénum, jéjunum, iléon) et étaient propres à la digestion des altérines car absents du TIM-1 contrôle. De plus, ces composés étaient co-élués dans les mêmes gammes de temps d'élution et de masses que les altérines.

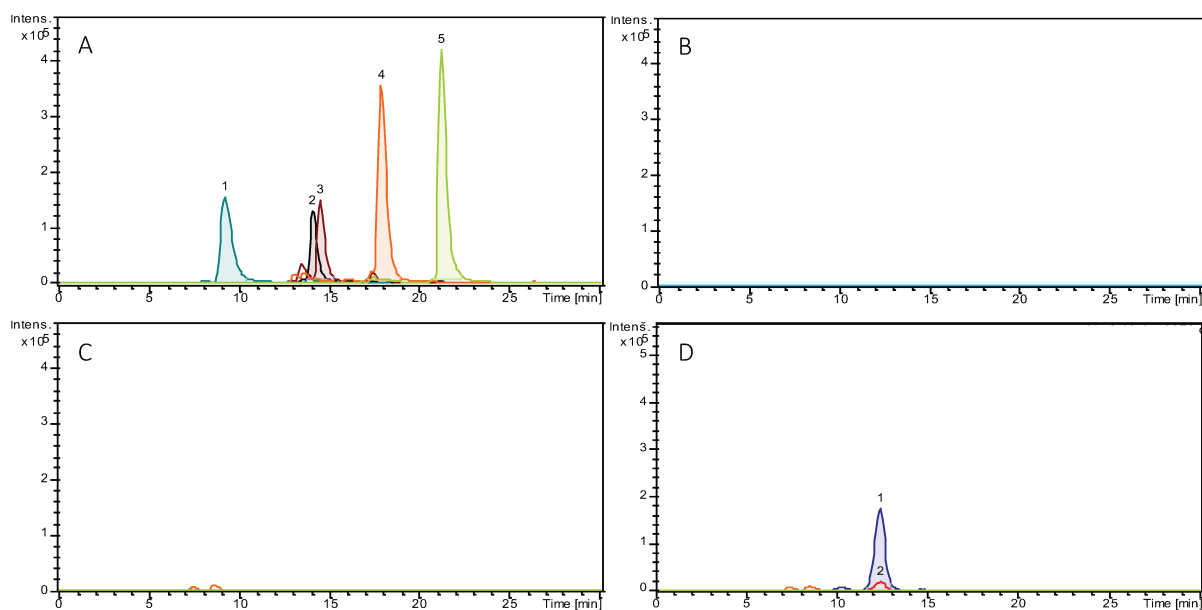


Figure 30. EIC superposés des 5 altérines dont le $[M+3H]^{3+}$ a été détecté : ALT-926 (1), ALT-970 (2), ALT-940 (3), ALT-954 (4) et ALT-980 (5). Les ions sont détectés dans un échantillon de l'estomac (A) et du duodénum (C) au bout de 40 minutes de digestion (TIM-1). EIC superposés de m/z 421,6 (1) et m/z 458,78 (2) détectés dans un échantillon de l'estomac (B) et du duodénum (D) au bout de 40 minutes de digestion (TIM-1).

Les analyses du modèle TIM-1 nous ont permis d'observer la dégradation des altérines dès 20 minutes de digestion dans le compartiment du duodénum. Leur dégradation était concomitante à l'apparition de deux ions dichargés dans ce compartiment, pouvant correspondre à des produits de dégradation. Ces produits sont retrouvés dans tous les compartiments de l'intestin grêle et à tous les temps de digestion avec en parallèle une activité antibactérienne conservée pour tous ces échantillons.

4. Discussion

Le suivi de digestion *in vitro* des souches de *Pseudoalteromonas* a révélé la perte rapide et importante de bactéries cultivables (log de base 6 UFC/mL) après passage en phase gastrique. L'étude de la digestion des altérines à l'aide de deux modèles *in vitro* a permis d'observer (ii) une dégradation des altérines dans l'intestin grêle, et plus précisément au niveau du duodénum mais également (iii) la détection d'une activité antibactérienne résiduelle.

4.1. Une inactivation rapide des souches de *Pseudoalteromonas*

La survie des souches de *Pseudoalteromonas* a pu être suivie par dénombrement ce qui a permis d'étudier le devenir des cellules viables cultivables lors de la digestion. La croissance

bactérienne optimale des souches de *Pseudoalteromonas* étudiée est de 25°C (à pH 7- 8) pour l'espèce *ostreae* (Cuny *et al.*, 2021) et de 28°C (à pH 7) pour l'espèce *rhizosphaerae* (Navarro-Torre *et al.*, 2020) avec des gammes de températures de croissance possibles allant jusqu'à 32°C pour cette espèce, à laquelle appartiennent les souches RA15^T et hCg-42. Il est donc possible que la température de la digestion *in vitro* de 37°C ait eu un impact sur la croissance des cellules bactériennes. De plus, la sensibilité des souches de *Pseudoalteromonas* au contenu gastrique est cohérente avec des études similaires réalisées sur des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium* spp. (Berrada *et al.*, 1991) ou encore *Lactobacillus* spp. (Venema *et al.*, 2019). Cette perte de viabilité résulterait du pH faible de ce compartiment ainsi que de la présence de pepsine, qui peuvent endommager l'intégrité des cellules bactériennes et ainsi provoquer leur lyse (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015).

4.2. Dégradation des altérines dans l'intestin grêle

La dégradation des altérines a débuté lors de la phase gastrique du protocole INFOGEST mais est intégrale à partir de la phase intestinale. Plusieurs peptides antimicrobiens comme la nisine (Soltani *et al.*, 2022), la microcine J25 (Naimi *et al.*, 2018) ou encore la pédiocine PA-1 (Kheadr *et al.*, 2010) sont également particulièrement sensibles à cette phase.

L'action de la pepsine présente dans le compartiment gastrique peut expliquer le début de la dégradation des altérines observée lors de la mise en œuvre du protocole INFOGEST. En effet, la pepsine clive la liaison peptidique après la leucine (Accardo *et al.*, 2024), acide aminé faisant partie du cycle heptapeptidique des altérines (Figure 31). De plus, la dégradation des altérines dans l'intestin grêle et plus précisément au sein du duodénum après 20 minutes de digestion nous indique que les altérines sont particulièrement sensibles au contenu de ce compartiment. La pancréatine, mélange d'enzymes digestives dont la trypsine et la chymotrypsine, est présente dans le duodénum (Cosofret, 1982). Ces deux enzymes clivent les liaisons peptidiques après les résidus d'arginine et de leucine respectivement (Whitcomb and Lowe, 2007), deux acides aminés présents au sein du cycle heptapeptidique des altérines (Figure 31). Il est donc probable que la trypsine clive après les acides β -hydroxy-diaminobutyrique (β -HO-Dab) et diaminobutyrique (Dab).

La dégradation des altérines pourrait également être causée par un autre élément de la pancréatine, comme c'est le cas de la microcine J25, sensible à l'élastase I (Soltani *et al.*, 2022). La présence simultanée de trois enzymes digestives différentes dans le duodénum peut ainsi expliquer une dégradation importante des altérines dans ce compartiment.

D'autre part, la stabilité des altérines jusqu'à ce compartiment de l'intestin grêle pourrait être expliquée par leur structure cyclique (Figure 31) et leur faible poids moléculaire (< 1 KDa), deux facteurs qui sont corrélés à une bonne stabilité au sein du tractus gastrointestinal (Ahmed *et al.*, 2022).

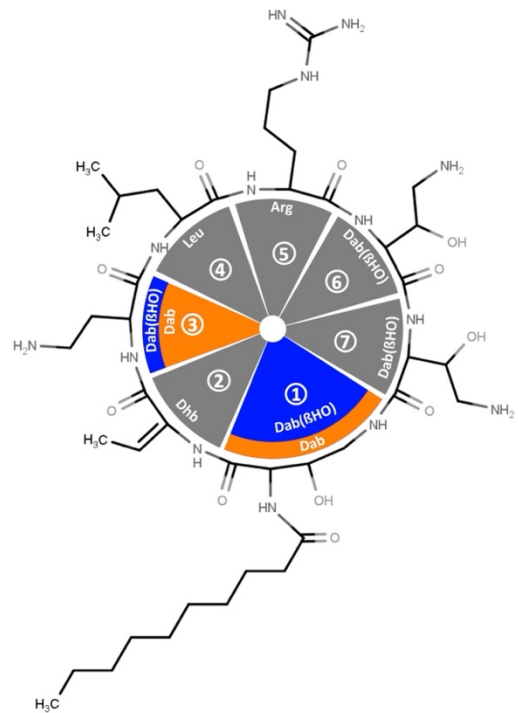


Figure 31. Structure des altérines d'après Offret *et al.*, 2022.

4.3. Une activité antibactérienne conservée : effets potentiels et applications

Les produits de dégradation des altérines démontrent le maintien d'une activité antibactérienne au sein de tous les compartiments de la digestion *in vitro*. Nous avons pu mettre en évidence à la fois la baisse de concentration des altérines natives lors des étapes de la digestion et l'apparition de nouvelles molécules. Le profil de fragmentation de ces produits néoformés pendant la digestion, très proche de celui des altérines natives, laisse envisager qu'il s'agit de produits de dégradation des altérines. Une analyse plus fine reste à mener pour préciser leur structure et confirmer cette hypothèse.

Si cette hypothèse s'avère être exacte, alors les altérines pourraient moduler le microbiote intestinal, microbiote transitoire et moins stable que d'autres compartiments du système digestif (Bezkorovainy, 2001). D'autre part, nous savons que les altérines présentent des activités antibactériennes contre des bactéries à Gram négatif (Desriac *et al.*, 2020). Si les produits de dégradation des altérines présentent des activités similaires, alors l'impact sur des

bactéries à Gram positif bénéfiques pour le microbiote intestinal comme les bactéries lactiques (à Gram positif) pourrait être éventuellement limité (Tang *et al.*, 2023).

5. Conclusion

L'étude du devenir des souches du genre *Pseudoalteromonas* et des altérines qu'elles produisent dans un système de digestion *in vitro* nous a permis pour la première fois de caractériser la stabilité de ces bactéries et des altérines. Ainsi, les souches du genre *Pseudoalteromonas*, ont été inactivées dans l'estomac, même introduites à de fortes concentrations (10^6 UFC/mL). Les altérines, en revanche, ont pu conserver une certaine stabilité jusqu'au premier compartiment de l'intestin grêle, le duodénum. De plus, bien que dégradées, ces peptides ont continué à impacter le tractus avec la conservation d'une activité antibactérienne.

Dans un cadre d'utilisation en aquaculture, les souches de *Pseudoalteromonas* étaient inoculées à des concentrations finales de 10^6 UFC/mL dans les bassins et pouvaient être détectées dans l'hémolymphe des huîtres à une concentration maximale de 10^3 UFC/mL, jusqu'à 4 jours après la balnéation (Cuny, 2022). On peut donc supposer que les souches n'auront pas d'impact sur le tractus gastro-intestinal humain en cas d'ingestion des huîtres, au vu de leur concentration mise en entrée du modèle *in vitro* et de leur dégradation rapide. Quant aux altérines, ces peptides n'ont pas été détectés dans l'eau de mer ou l'hémolymphe des huîtres lors des balnéations. Le seuil de détection étant de $1 \mu\text{g/mL}$, il est donc probable qu'en cas d'ingestion des huîtres, elles n'auraient pas d'impact sur le tractus gastro-intestinal.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture nous a permis d'évaluer (i) l'innocuité des souches de *Pseudoalteromonas* grâce à des analyses *in silico* et un essai de digestion *in vitro* mais également la caractérisation (ii) des altérines, avec une étude de leur spectre d'activité antibactérien et leur devenir dans le tractus gastro-intestinal. Ces premières analyses ont permis l'étude d'aspects réglementaires nécessaires à la potentielle mise sur le marché de ces probiotiques.

D'autre part, l'exposition d'huîtres plates aux différentes souches de *Pseudoalteromonas* a permis de mettre en évidence (i) une incidence des souches sur le microbiote hémolymphatique de l'huître plate, sans surmortalité durant l'expérimentation mais également (ii) la modulation des communautés bactériennes du biofilm accompagnée d'une réduction significative de leur biovolume. Enfin, une tendance à l'augmentation de l'émission larvaire, au terme de la maturation sexuelle, a pu être observée à la suite de l'exposition des huîtres à la souche *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42. Enfin, ces travaux ont également apporté de nouvelles connaissances concernant les communautés bactériennes associées à l'élevage de l'huître plate *Ostrea edulis*, et plus particulièrement au microbiote hémolymphatique de cette espèce.

Ces travaux de thèse ont permis d'illustrer les effets probiotiques des souches de *Pseudoalteromonas*, sur l'huître plate *Ostrea edulis*, ouvrant des perspectives d'utilisation en élevage ostréicole.

Probiotiques et communautés microbiennes en élevage de l'huître plate

Les communautés bactériennes associées au microbiote hémolympatique de l'huître plate sont donc modulées à la suite de l'exposition à différentes souches de *Pseudoalteromonas* mais il serait également envisageable d'étudier l'effet de ces souches sur (i) d'autres composantes du microbiote, (ii) sur les communautés associées à d'autres compartiments de ce bivalve et également sur (iii) l'huître à différents stades de vie.

Étude des autres composantes du microbiote hémolympatique

Le microbiote hémolympatique des huîtres est en effet un liquide circulatoire abritant de nombreuses communautés bactériennes mais également des protistes et des virus d'après une étude de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Dupont *et al.*, 2020). Ces différentes communautés diffèrent de l'environnement de l'huître et sont modulées par différents paramètres environnementaux et également par le génotype de l'hôte : les protistes et les virus sont donc des indicateurs de conditions de vie de l'huître et sont à étudier au même titre que les communautés bactériennes (Paillard *et al.*, 2022). L'analyse de l'incidence des souches de *Pseudoalteromonas* sur les communautés de virus et de protozoaires permettrait par ailleurs d'illustrer les relations entre ces différentes composantes du microbiote (Berg *et al.*, 2020).

Impact des probiotiques sur d'autres compartiments de l'huître

L'hémolymphe est un liquide circulatoire exposé aux microorganismes de l'environnement (Desriac *et al.*, 2014) et les communautés bactériennes qui lui sont associées peuvent être rapidement modulées en cas de changement des conditions environnementales (Lokmer *et al.*, 2016a). Cette variabilité pourrait expliquer les modulations observées en présence des souches de *Pseudoalteromonas* dans le cadre de ce projet de thèse. Cependant, le renouvellement constant de l'eau de mer dans les bassins, provoque également un effet sur ce microbiote, et participe probablement à limiter l'effet de ces souches. On pouvait en effet s'attendre à un effet plus important des souches de *Pseudoalteromonas* sur le microbiote, accompagné de modifications de la richesse et de la diversité des communautés bactériennes ou encore la réduction/l'augmentation drastique de certains taxons, comme cela a pu être constaté sur d'autres études considérant le microbiote d'huîtres en présence de probiotiques (Stevick *et al.*, 2019; Takyi *et al.*, 2024).

L'étude d'autres compartiments de l'huître serait alors pertinente afin d'approfondir ces premières constatations sur le microbiote hémolympatique. Les communautés bactériennes associées aux différents compartiments de l'huître comme les branchies, le manteau, l'estomac et l'hémolymphe sont en effet différentes (Pierce and Ward, 2018) et en lien avec les fonctions spécifiques de chacun de ces tissus. Par exemple, les branchies hébergent une part importante de symbiontes chez les bivalves (Lokmer *et al.*, 2016b). D'autre part, le tractus digestif est classiquement le compartiment ciblé lors de l'usage des probiotiques (Verschuere *et al.*, 2000), et la modulation de son microbiote en présence de tels additifs a pu être décrite pour différentes espèces de poisson en élevage (Vargas-Albores *et al.*, 2021). L'étude des effets des souches de *Pseudoalteromonas* sur les communautés bactériennes associées à l'estomac et aux branchies constitue donc une perspective pour approfondir l'analyse de ces additifs. De plus, nous avons observé au cours de ces travaux une présence transitoire des souches de *Pseudoalteromonas* dans l'hémolymphe d'*O.edulis*. D'autre part, la question de leur implantation dans les autres compartiments de l'huître reste entière. Des analyses de qPCR permettant de suivre la répartition des souches au sein de l'huître pourraient offrir une meilleure compréhension de leur cinétique de colonisation et permettrait ainsi d'ajuster le mode d'administration de ces souches en optimisant la dose et la durée du traitement.

Le microbiote de l'huître à différents stades de vie

D'autre part, une étude du microbiote des huîtres adultes a été réalisée, mais il serait également pertinent d'observer l'effet de l'exposition d'huîtres aux stades juvénile ou encore larvaire aux souches de *Pseudoalteromonas*. Au vu des problématiques de mortalités en stade larvaire, causées par des bactéries du genre *Vibrio* en élevage (Takyi *et al.*, 2023), une application des souches comme probiotiques sur des huîtres plates au stade larvaire peut être en effet envisagée. De plus, les huîtres juvéniles sont particulièrement touchées par le syndrome du POMS chez l'huître creuse (Green *et al.*, 2016) et ont été particulièrement touchées lors des épisodes infectieux impliquant les parasites *Haplosporidium nelsoni* et *Perkinsus marinus* à la fin du XX^{ème} siècle (McCollough *et al.*, 2009). L'étude de l'effet des souches de *Pseudoalteromonas* sur les huîtres juvéniles dans une perspective de bioprotection serait alors envisageable.

Évaluation élargie des effets probiotiques des souches en élevage ostréicole

Optimisation de la reproduction

Une augmentation de l'émission larvaire consécutive à l'exposition des huîtres à la souche hCg-42 a été constatée. L'étude de l'influence de cette souche probiotique sur différents paramètres de reproduction de l'huître plate permettrait d'approfondir cette première constatation. Les effets de la souche hCg-42 sur la qualité des gamètes, la fécondation et la viabilité des larves sont à explorer (Cardona-Costa *et al.*, 2010). Enfin, il conviendrait d'observer l'influence de ces bactéries probiotiques sur la fixation et la métamorphose des larves, autre période clé pour l'établissement des naissains, problématique importante dans le cadre de l'élevage de l'huître plate *Ostrea edulis* (zu Ermgassen *et al.*, 2023a).

Réduction du biofilm en bassins aquacoles : mécanismes d'action

D'autre part, les mécanismes impliqués dans la réduction significative du biovolume de biofilm dans les bassins aquacoles exposés aux souches de *Pseudoalteromonas* restent à clarifier. L'hypothèse d'une action directe des probiotiques sur le biofilm ne peut être exclue. Cette action est néanmoins peu probable puisque les taxons correspondant au genre et à la famille des souches de *Pseudoalteromonas* n'ont pas été détectés par analyses metabarcoding. Des analyses de qPCR permettant le dosage des souches au sein des biofilms aquacoles permettrait de résoudre cette première interrogation. D'autre part, l'exploration des effets des souches sur le biofilm se formant en bassins aquacoles en l'absence d'animaux d'élevage permettrait d'aller plus loin dans la caractérisation de l'activité antibiofilm de ces souches et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives d'application.

Optimisation de la résistance face à un pathogène : épreuve infectieuse

Le système immunitaire de différents des invertébrés peut réguler les communautés microbiennes en présence (Dantan *et al.*, 2024). Dans ce cadre, l'utilisation de probiotiques peut à la fois moduler le système immunitaire de l'hôte et également avoir un effet sur son microbiote (Dantan, 2023) : le lien de causalité entre ces deux effets mérite alors d'être étudié. Une telle étude serait particulièrement pertinente en cas d'épreuve infectieuse, permettant d'apprécier l'effet des probiotiques sur la survie de l'huître face à un pathogène. Compte tenu des activités antibactériennes des souches de *Pseudoalteromonas* étudiées, une analyse des

effets de ces souches sur la survie des larves d'*Ostrea edulis* exposée à une souche de *Vibrio* pathogène (Dubert et al., 2016) serait pertinent (Desriac *et al.*, 2020).

Essais complémentaires de digestibilité

D'autre part, le devenir des souches et des altérines qu'elles produisent a pu être établi lors d'une digestion *in vitro* ; l'étude de l'incidence de ces souches, bien qu'a priori inactivées, sur le microbiote intestinal humain ouvre la voie à une évaluation plus approfondie de leur innocuité. D'autre part, le suivi de la digestion d'une huître après balnéation avec les souches de *Pseudoalteromonas* permettrait de se rapprocher davantage des conditions d'utilisation des souches.

Participation des altérines à l'effet probiotique des souches de *Pseudoalteromonas*

Les souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines hOe-125, hCg-42 et la souche non-productrice RA15^T ont présenté des effets similaires en élevage, que ce soit du point de vue de la modulation des communautés bactériennes en présence ou encore de la réduction significative du biofilm. Par ailleurs, il n'est pas encore établi si les altérines sont effectivement produites par les souches de *Pseudoalteromonas* dans les conditions étudiées. Afin de maîtriser les conséquences de l'utilisation des souches de *Pseudoalteromonas* pouvant produire des altérines dans les systèmes aquacoles, différentes études doivent être menées pour :

- Établir si les mêmes effets que ceux observés dans ce travail de thèse (modulation des communautés bactériennes, limitation du biovolume de biofilm, plus forte émission larvaire) pourraient être constatés lors de balnéation avec les mêmes souches, mais inactivées, alors utilisés en tant que paraprobiotiques (Li and Tran, 2022).
- Établir si les altérines ont une contribution dans les effets observées. L'utilisation de souches mutantes, dont le cluster de gènes NRPS (Cuny, 2021) responsable de la production des altérines aurait été délété permettrait de répondre à cette interrogation. De plus, développer une méthode sensible de détection des altérines à de faibles concentrations, applicable à la fois à l'environnement et adaptée à la matrice des huîtres, offrirait la possibilité de suivre la présence de ces composés dans les conditions d'élevage et ainsi d'évaluer leur rôle dans l'activité des souches. Les altérines n'ont en effet pas été détectées lors de ces travaux de thèse, le seuil de détection étant de 1 µg/mL avec les méthodes employées (Cuny, 2022).

COMMUNICATIONS

Communications orales

Leila PARIZADEH, Garance LEROY, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Benjamin BRILLET, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Yannick FLEURY. Application biotechnologique de souches de *Pseudoalteromonas* en conchyliculture.

Journées Axe Biotechnologies de l'IUEM, octobre 2022, Plouzané, France.

Leila PARIZADEH, Garance LEROY, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Benjamin BRILLET, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Yannick FLEURY. Impact de *Pseudoalteromonas* sur la formation de biofilm en conchyliculture.

Workshop Biofouling Marin, novembre 2022, Lorient, France.

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Camille JÉGOU, Yannick Fleury. Incidences de *Pseudoalteromonas* producteurs d'altérines en environnement aquacole.

Réseau MuFoPAM, février 2024, webinaire.

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Camille JÉGOU, Yannick Fleury. Modulation des communautés microbiennes au cours de la maturation d'*Ostrea edulis*.

Séminaire LBCM, mai 2024, Lorient, France.

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Héléna CUNY, Clément OFFRET, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick Fleury. Modulation of microbiota by alterin-producing *Pseudoalteromonas* during a maturation cycle of the flat oyster.

8th International Symposium on Antimicrobial Peptides, juin 2024, Marseille, France.

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Héléna CUNY, Clément OFFRET, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick Fleury. Modulation des communautés bactériennes au cours de la maturation d'*Ostrea edulis* par des bactéries du genre *Pseudoalteromonas*.

Journée du Microbiome de l'Ifremer, juin 2024, Nantes, France.

Communications par affiches

Garance LEROY, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick FLEURY. Modulation du microbiome par les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines.

Journées du GDR MuFoPAM, octobre 2022, Amboise, France.

Garance LEROY, Héléna CUNY, Leila PARIZADEH, Martin PROTAT, Laëtitia LE DEVENDEC, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick FLEURY. Modulation of oyster-associated microbiome by *Pseudoalteromonas* strains producing alterins.

Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES, octobre 2023, Maisons-Alfort, France.

Garance LEROY, Héléna CUNY, Leila PARIZADEH, Laëticia LE DEVENDEC, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Sandrine BARON, Lucie BEAULIEU, Yannick FLEURY. Probiotics in aquaculture : impact of *Pseudoalteromonas* strains on the flat oyster *Ostrea edulis*.
Bénéfiq2023, octobre 2023, Québec, Canada.

Garance LEROY, Héléna CUNY, Leila PARIZADEH, Martin PROTAT, Laëticia LE DEVENDEC, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick FLEURY. Impact of *Pseudoalteromonas* strains on the flat oyster *Ostrea edulis*.
European Association of Fish Pathologists, octobre 2023, Aberdeen, Écosse.

Garance LEROY, Héléna CUNY, Leila PARIZADEH, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Sandrine BARON, Lucie BEAULIEU, Yannick FLEURY. Étude de potentiels probiotiques en aquaculture.
Journées de l'EDSML, novembre 2023, Plouzané, France.

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Héléna CUNY, Clément OFFRET, Ricardo GONZALEZ-ARAYA, Camille JÉGOU, Lucie BEAULIEU, Sandrine BARON, Yannick FLEURY. Développement de probiotiques pour l'aquaculture : impact de souches du genre *Pseudoalteromonas* sur l'élevage de l'huître plate *Ostrea edulis*.
Journées de la Recherche Française Piscicole, juillet 2024, Rennes, France.

Article d'ouvrage

Héléna CUNY, Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Yannick FLEURY. Le microbiote de bivalves marins, source de probiotiques.
Explorer l'Environnement. Des solutions pour innover, CNRS édition, septembre 2024.

Articles scientifiques

Garance LEROY, Leila PARIZADEH, Héléna CUNY, Clément OFFRET, Martin PROTAT, Alexis BAZIRE, Sophie RODRIGUES, Patrick LE CHEVALIER, Benjamin BRILLET, Camille JÉGOU, Ricardo Gonzalez-Araya, Yannick Fleury. The *Pseudoalteromonas* paradox: when adding *Pseudoalteromonas* strains in cultivation of the flat oyster *Ostrea edulis* reduces biofilm biovolume without altering its richness and diversity.
Article en préparation.

Karolina UCIEKLAK, Sylwia WOJTYS-TEKIEL, Garance LEROY, Laëticia LE DEVENDEC, Sandrine BARON, Marta KASZOWSKA. New structure of *Aeromonas salmonicida* O-Polysaccharide Isolated from Ill Farmed Fish.
Microorganisms **2024**, 12(8), 1575 ; <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081575>.

RÉFÉRENCES

- Abasali, H., Mohamad, S., 2010. Effect of Dietary Supplementation with Probiotic on Reproductive Performance of Female Livebearing Ornamental Fish. *Res. J. Anim. Sci.* 4, 103–107. <https://doi.org/10.3923/rjnasci.2010.103.107>
- Abdel-Latif, H.M.R., Chaklader, M.R., Shukry, M., Ahmed, H.A., Khallaf, M.A., 2023. A multispecies probiotic modulates growth, digestive enzymes, immunity, hepatic antioxidant activity, and disease resistance of *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings. *Aquaculture* 563, 738948. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738948>
- Accardo, F., Prandi, B., Dellafiora, L., Tedeschi, T., Sforza, S., 2024. How D-amino acids embedded in the protein sequence modify its digestibility: Behaviour of digestive enzymes tested on a model peptide used as target. *Food Chem.* 458, 140175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140175>
- Afzal, M., Vijay, A.K., Stapleton, F., Willcox, M.D.P., 2022. Genomics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Infectious and Non-Infectious Ocular Conditions. *Antibiotics* 11, 1011. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081011>
- Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Fadaei Raieni, R., Dadar, M., Yilmaz, S., Dawood, M.A.O., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. Benefits of Dietary Polyphenols and Polyphenol-Rich Additives to Aquatic Animal Health: An Overview. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 29, 478–511. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1818689>
- Ahmed, T., Sun, X., Udenigwe, C.C., 2022. Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: A systematic review. *Trends Food Sci. Technol.* 120, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.008>
- Alcock, B.P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K.W., Raphenya, A.R., Wlodarski, M.A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S.A., Tsang, K.K., Baker, S.J.C., Dave, M., McCarthy, M.C., Mukiri, K.M., Nasir, J.A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., Liang, Z.C., Niu, K.C., Shan, P., Yang, J.Y.J., Gray, K.L., Hoad, G.R., Jia, B., Bhandu, T., Carfrae, L.A., Farha, M.A., French, S., Gordzevich, R., Rachwalski, K., Tu, M.M., Bordeleau, E., Dooley, D., Griffiths, E., Zubyk, H.L., Brown, E.D., Maguire, F., Beiko, R.G., Hsiao, W.W.L., Brinkman, F.S.L., Van Domselaar, G., McArthur, A.G., 2022. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* gkac920. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Alfei, S., Schito, A.M., 2020. Positively Charged Polymers as Promising Devices against Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. *Polymers* 12, 1195. <https://doi.org/10.3390/polym12051195>
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. <https://doi.org/10.3354/dao048221>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., Martinez, J.L., 2013. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00007>

- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Pérez-Sánchez, T., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Ruiz-Zarzuela, I., Cintas, L.M., 2015. Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of Aquatic Origin as a Defense Mechanism to Protect Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Against *Lactococcus garvieae*. *Mar. Biotechnol.* 17, 820–830. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9660-x>
- Arfken, A., Song, B., Allen, S.K., Carnegie, R.B., 2021. Comparing larval microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) raised in different hatcheries. *Aquaculture* 531, 735955. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735955>
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., Nithya, C., 2020. *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochem.* 94, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029>
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M., Renault, T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 85, 67–75. <https://doi.org/10.3354/dao02047>
- Bachère, E., Rosa, R.D., Schmitt, P., Poirier, A.C., Merou, N., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol., SI: Molluscan Immunity* 46, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040>
- Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., Nieves Delgado, A., 2020. The holobiont concept before Margulis. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 334, 149–155. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22931>
- Bakala N’Goma, J.-C., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., Carrière, F., 2012. Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther. Deliv.* 3, 105–124. <https://doi.org/10.4155/tde.11.138>
- Banu, M.R., Akter, S., Islam, M.R., Mondol, M.N., Hossain, M.A., 2020. Probiotic yeast enhanced growth performance and disease resistance in freshwater catfish gulsa tengra, *Mystus cavasius*. *Aquac. Rep.* 16, 100237. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100237>
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., Chauvin, C., 2017. *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater—An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. *Front. Microbiol.* 8, 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>
- Batista, F.M., López-Sanmartín, M., Grade, A., Morgado, I., Valente, M., Navas, J.I., Power, D.M., Ruano, F., 2015. Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread. *Aquaculture* 435, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.016>
- Beecham, J., 2008. A Literature review on particle assimilation by molluscs and crustaceans April 2008.
- Benini, S., Toccafondi, M., Rejzek, M., Musiani, F., Wagstaff, B.A., Wuerges, J., Cianci, M., Field, R.A., 2017. Glucose-1-phosphate uridylyltransferase from *Erwinia amylovora*: Activity, structure and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1865, 1348–1357. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.015>

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., Souza, R.S.C. de, van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., Schloter, M., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M., 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74, 409–413. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78183-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78183-6)

Bertani, B., Ruiz, N., 2018. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 8, 10.1128/ecosalplus.ESP-0001–2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2018>

Beurmann, S., Ushijima, B., Videau, P., Svoboda, C.M., Smith, A.M., Rivers, O.S., Aeby, G.S., Callahan, S.M., 2017. *Pseudoalteromonas piratica* strain OCN003 is a coral pathogen that causes a switch from chronic to acute Montipora white syndrome in *Montipora capitata*. *PLoS ONE* 12, e0188319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188319>

Bezkorovainy, A., 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 399s–405s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s>

Bharti, R., Grimm, D.G., 2021. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief. Bioinform.* 22, 178–193. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>

Bhogoju, S., Nahashon, S., 2022. Recent Advances in Probiotic Application in Animal Health and Nutrition: A Review. *Agriculture*.

Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Heather Lim, N.J., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M., 2005. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753–6761. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005>

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hoft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R.,

- Caporaso, J.G., 2019a. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bondad-Reantaso, M.G., MacKinnon, B., Karunasagar, Iddya, Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, Indrani, Hao, B., Dall’Occo, A., Urbani, R., Caputo, A., 2023. Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Rev. Aquac.* 15, 1421–1451. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>
- Bourdichon, F., Patrone, V., Fontana, A., Milani, G., Morelli, L., 2021. Safety demonstration of a microbial species for use in the food chain: *Weissella confusa*. *Int. J. Food Microbiol.* 339, 109028. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109028>
- Bowman, J.P., 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* 5. <https://doi.org/10.3390/md504220>
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., Coenye, T., 2011. Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2655–2661. <https://doi.org/10.1128/aac.00045-11>
- Briand, J.-F., Pollet, T., Misson, B., Garnier, C., Lejars, M., Maintenay, M., Barry-Martinet, R., Portas, A., Ghiglione, J.-F., Bressy, C., 2022. Surface Characteristics Together With Environmental Conditions Shape Marine Biofilm Dynamics in Coastal NW Mediterranean Locations. *Front. Mar. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.746383>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I., 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* 14, 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., Gouilletquer, P., 2009. History, Status, and Future of Oyster Culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820. <https://doi.org/10.2983/035.028.0410>
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Calero, V., Rodrigues, P.M., Dias, T., Ainla, A., Vilaça, A., Pastrana, L., Xavier, M., Gonçalves, C., 2024. A miniaturised semi-dynamic *in-vitro* model of human digestion. *Sci. Rep.* 14, 11923. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54612-w>
- Callac, N., Boulo, V., Giraud, C., Beauvais, M., Ansquer, D., Ballan, V., Maillez, J.-R., Wabete, N., Pham, D., 2022. Microbiota of the Rearing Water of *Penaeus stylirostris* Larvae Influenced by Lagoon Seawater and Specific Key Microbial Lineages of Larval Stage and Survival. *Microbiol. Spectr.* 10, e04241-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04241-22>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Cardona-Costa, J., García-Ximénez, F., Espinós, F.J., 2010. Seasonal Evolution of Gonadal Maturation, Gamete Quality, and Fertilizability of Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*) on the Western Mediterranean Coast. *J. Shellfish Res.* 29, 833–837. <https://doi.org/10.2983/035.029.0417>
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.025>
- Cashman-Kadri, S., Lagüe, P., Fliss, I., Beaulieu, L., 2023. Assessing the Activity under Different Physico-Chemical Conditions, Digestibility, and Innocuity of a GAPDH-Related Fish Antimicrobial Peptide and Analogs Thereof. *Antibiotics* 12, 1410. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091410>
- Cashman-Kadri, S., Lagüe, P., Fliss, I., Beaulieu, L., 2022. Determination of the Relationships between the Chemical Structure and Antimicrobial Activity of a GAPDH-Related Fish Antimicrobial Peptide and Analogs Thereof. *Antibiotics* 11, 297. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030297>
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* 294, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.016>
- Cattoir, V., 2004. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol. Biol. (Paris)* 52, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.001>
- Caudal, F., Rodrigues, S., Dufour, A., Artigaud, S., Le Blay, G., Petek, S., Bazire, A., 2023. Extracts from Wallis Sponges Inhibit *Vibrio harveyi* Biofilm Formation. *Microorganisms* 11, 1762. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071762>
- Chemaxon, 2024. MarvinSketch.
- Chen, M., Li, B., 2012. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.009>
- Chen, Y., Guarnieri, M.T., Vasil, A.I., Vasil, M.L., Mant, C.T., Hodges, R.S., 2007. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1398–1406. <https://doi.org/10.1128/aac.00925-06>
- Chen, Y., Zhang, X., Ma, M., Zhuang, Y., Chang, L., Xiao, L., Wang, G., 2023. Extracellular Compounds from Pathogenic Bacterium *Pseudoalteromonas piscicida* X-8 Cause Bleaching Disease, Triggering Active Defense Responses in Commercially Farmed *Saccharina japonica*. *Biology* 12, 47. <https://doi.org/10.3390/biology12010047>
- Chevignon, G., Dotto-Maurel, A., Serpin, D., Chollet, B., Arzul, I., 2022. De Novo Transcriptome Assembly and Analysis of the Flat Oyster Pathogenic Protozoa *Bonamia Ostreae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 921136. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.921136>
- Cholewińska, P., Moniuszko, H., Wojnarowski, K., Pokorny, P., Szeligowska, N., Dobicki, W., Polechoński, R., Górniak, W., 2022. The Occurrence of Microplastics and the Formation of Biofilms by Pathogenic and Opportunistic Bacteria as Threats in Aquaculture. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 8137. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138137>

Choudhury, J.D., Pramanik, A., Webster, N.S., Llewellyn, L.E., Gachhui, R., Mukherjee, J., 2015. The Pathogen of the Great Barrier Reef Sponge *Rhopaloeides odorabile* Is a New Strain of *Pseudoalteromonas agarivorans* Containing Abundant and Diverse Virulence-Related Genes. *Mar. Biotechnol.* N. Y. N 17, 463–478. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9627-y>

Chowdhury, S., Rheman, S., Debnath, N., Delamare-Deboutteville, J., Akhtar, Z., Ghosh, S., Parveen, S., Islam, K., Islam, Md.A., Rashid, Md.M., Khan, Z.H., Rahman, M., Chadag, V.M., Chowdhury, F., 2022. Antibiotics usage practices in aquaculture in Bangladesh and their associated factors. *One Health* 15, 100445. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100445>

Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., Toulza, E., 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front. Microbiol.* 11, 311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00311>

CLSI, 2020. *Methods for Antimicrobial Both Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*, 2nd Edition.

CNC, 2019. Les huîtres - Coquillages [WWW Document]. URL <https://coquillages.com/les-huitres/> (accessed 5.6.23).

Colclough, A.L., Alav, I., Whittle, E.E., Pugh, H.L., Darby, E.M., Legood, S.W., McNeil, H.E., Blair, J.M., 2020. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 15, 143–157. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0235>

Contente, D., Díaz-Formoso, L., Feito, J., Hernández, P.E., Muñoz-Atienza, E., Borrero, J., Poeta, P., Cintas, L.M., 2024. Genomic and Functional Evaluation of Two *Lacticaseibacillus paracasei* and Two *Lactiplantibacillus plantarum* Strains, Isolated from a Rearing Tank of Rotifers (*Brachionus plicatilis*), as Probiotics for Aquaculture. *Genes* 15, 64. <https://doi.org/10.3390/genes15010064>

COP21 [WWW Document], 2015. Ministère Agric. Souveraineté Aliment. URL <https://agriculture.gouv.fr/cop21-lagriculture-et-la-foret-en-premiere-ligne-pour-le-climat> (accessed 5.4.24).

Cordonnier, C., Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Alric, M., Livrelli, V., Blanquet-Diot, S., 2015. Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. *Microorganisms* 3, 725–745. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040725>

Cosofret, V.V., 1982. CHAPTER 18 - Miscellaneous Compounds, in: Cosofret, V.V. (Ed.), *Membrane Electrodes in Drug-Substances Analysis*. Pergamon, pp. 332–343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-026264-2.50024-5>

Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., Périchon, B., 2010. Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH Confers Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4389–4393. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>

Craig, L., Forest, K.T., Maier, B., 2019. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 429–440. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>

Cresti, L., Cappello, G., Pini, A., 2024. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application—A Long History to Be Concluded. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 4870. <https://doi.org/10.3390/ijms25094870>

Crossman, L.C., Chen, H., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Brooks, K., Quail, M.A., Pineiro, S.A., Hobley, L., Sockett, R.E., Bentley, S.D., Parkhill, J., Williams, H.N., Stine, O.C., 2013. A small predatory core genome in the divergent marine *Bacteriovorax marinus* SJ and the terrestrial *Bdellovibrio bacteriovorus*. ISME J. 7, 148–160. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.90>

Cuny, H., 2022. Rapport d'activité du projet PAQMAN. Développement de Probiotiques innovants pour l'Aquaculture MAriNe.

Cuny, H., 2021a. Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, peptides antibiotiques produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* (Thèse de doctorat). Brest.

Cuny, H., 2021b. Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, peptides antibiotiques produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* (Thèse de doctorat). Brest.

Cuny, H., Offret, C., Boukerb, A.M., Parizadeh, L., Lesouhaitier, O., Le Chevalier, P., Jégou, C., Bazire, A., Brillet, B., Fleury, Y., 2021. *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71, 005070. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005070>

Dang, H., Lovell, C.R., 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 68, 496–504. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.496-504.2002>

Dantan, L., 2023. Caractérisation des effets bénéfiques de la microflore naturelle de l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* en vue d'applications en conchyliculture (Thèse de doctorat). Perpignan.

Dantan, L., Toulza, E., Petton, B., Montagnani, C., Degremont, L., Morga, B., Fleury, Y., Mitta, G., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., Cosseau, C., 2024. Microbial education for marine invertebrate disease prevention in aquaculture. Rev. Aquac. n/a. <https://doi.org/10.1111/raq.12893>

Dash, A., Modak, R., 2021. Protein Acetyltransferases Mediate Bacterial Adaptation to a Diverse Environment. J. Bacteriol. 203, e00231-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00231-21>

Dawood, M.A.O., El Basuini, M.F., Zaineldin, A.I., Yilmaz, S., Hasan, M.T., Ahmadifar, E., El Asely, A.M., Abdel-Latif, H.M.R., Alagawany, M., Abu-Elala, N.M., Van Doan, H., Sewilam, H., 2021. Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. Pathogens 10, 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Pérignon, A., Régler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. Nat. Commun. 9, 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>

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

- Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2013a. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>
- Delisle, L., Laroche, O., Hilton, Z., Burguin, J.-F., Rolton, A., Berry, J., Pochon, X., Boudry, P., Vignier, J., 2022. Understanding the Dynamic of POMS Infection and the Role of Microbiota Composition in the Survival of Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*. *Microbiol. Spectr.* 10, e01959-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01959-22>
- Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 23, 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
- Desriac, F., 2010. Bivalves et Probiotiques : Sélection et étude de bactéries productrices de peptides antibactériens en vue d'une utilisation comme probiotiques en aquaculture (Thèse de doctorat). Brest.
- Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnère, M., Got, P., Destoumieux-Garzón, D., Fleury, Y., 2020. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs* 18, 630. <https://doi.org/10.3390/md18120630>
- Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., Fleury, Y., 2014. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 107–116. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12308>
- Destoumieux-Garzón, D., Montagnani, C., Dantan, L., Nicolas, N. de S., Travers, M.-A., Duperret, L., Charrière, G.M., Toulza, E., Mitta, G., Cosseau, C., Escoubas, J.-M., 2024. Cross-talk and mutual shaping between the immune system and the microbiota during an oyster's life. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 379. <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0065>
- Devi, A.A., Khan, M.I.R., Choudhury, T.G., Kamilya, D., 2022. *In Vitro* Assessment of Probiotic Potential of an Autochthonous Bacterial Isolate, *Pseudomonas mosselii* COFCAU_PMP5. *Microbiology* 91, 207–214. <https://doi.org/10.1134/S0026261722020047>
- Dharmaraj, S., Dhevendaran, K., 2010. Evaluation of Streptomyces as a Probiotic Feed for the Growth of Ornamental Fish *Xiphophorus helleri*. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 497–504.
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P., 2013. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 157–202. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.157>
- Di Somma, A., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A., Duilio, A., 2020. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* 10, 652. <https://doi.org/10.3390/biom10040652>
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E.W., Barja, P.P., Palumbo, E., Notredame, C., 2017. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat. Biotechnol.* 35, 316–319. <https://doi.org/10.1038/nbt.3820>
- Dindhorja, K., Kumar, S., Baliyan, N., Raphel, S., Halami, P.M., Kumar, R., 2022. *Bacillus licheniformis* MCC 2514 genome sequencing and functional annotation for providing genetic evidence for probiotic gut

adhesion properties and its applicability as a bio-preservative agent. *Gene* 840, 146744. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146744>

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>

Donaghy, L., Hong, H.-K., Lee, H.-J., Jun, J.-C., Park, Y.-J., Choi, K.-S., 2010. Hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* a year after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea. *Helgol. Mar. Res.* 64, 349–355. <https://doi.org/10.1007/s10152-010-0190-7>

Done, H.Y., Halden, R.U., 2015. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. *J. Hazard. Mater., Advances in Analysis, Treatment Technologies, and Environmental Fate of Emerging Contaminants* 282, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.075>

Dsouza, F.P., Dinesh, S., Sharma, S., 2024. Understanding the intricacies of microbial biofilm formation and its endurance in chronic infections: a key to advancing biofilm-targeted therapeutic strategies. *Arch. Microbiol.* 206, 85. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03802-7>

Dubert, J., Romalde, J.L., Prado, S., Barja, J.L., 2016. *Vibrio bivalvicida* sp. nov., a novel larval pathogen for bivalve molluscs reared in a hatchery. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.syam.2015.10.006>

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

Edwards, I.A., Elliott, A.G., Kavanagh, A.M., Zuegg, J., Blaskovich, M.A.T., Cooper, M.A., 2016. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. *ACS Infect. Dis.* 2, 442–450. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00045>

Edwards, J.L., Smith, D.L., Connolly, J., McDonald, J.E., Cox, M.J., Joint, I., Edwards, C., McCarthy, A.J., 2010. Identification of Carbohydrate Metabolism Genes in the Metagenome of a Marine Biofilm Community Shown to Be Dominated by *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes*. *Genes* 1, 371–384. <https://doi.org/10.3390/genes1030371>

EFSA, 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Probiotic LACTINA® (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*) for chickens for fattening and piglets. *EFSA J.* 11, 3170. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3170>

EFSA, E.F.S., 2021. EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. *EFSA J.* 19, e06506. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6506>

EFSA, E.F.S., 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA J.* 5, 587. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>

EFSA (FEEDAP), Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., Anguita, M., Dujardin, B., Galobart, J., Innocenti, M.L., 2017. Guidance on the assessment of the safety of feed additives for the consumer. EFSA J. 15, e05022. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5022>

EL-Haroun, E.R., Goda, A.M. a.-S., Chowdhury, M.A.K., 2006. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquac. Res. 37, 1473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>

El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A.O., Dhama, K., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. Fish Shellfish Immunol. 117, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>

EUCAST, 2024. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website.

Evan Ward, J., Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., VOLUME 300 Special Issue 300, 83–130. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>

Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. Vaccine 22, 3769–3773. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.012>

Falcinelli, S., Picchietti, S., Rodiles, A., Cossignani, L., Merrifield, D.L., Taddei, A.R., Maradonna, F., Olivotto, I., Gioacchini, G., Carnevali, O., 2015. *Lactobacillus rhamnosus* lowers zebrafish lipid content by changing gut microbiota and host transcription of genes involved in lipid metabolism. Sci. Rep. 5, 9336. <https://doi.org/10.1038/srep09336>

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

FAO, 2024a. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2024 - La transformation bleue en action. Rome.

FAO, 2024b. FishStatJ - Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series.

FAO, 2024c. *Ostrea edulis*. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. Pêche et aquaculture. Rome [WWW Document]. URL https://www.fao.org/fishery/fr/culturedspecies/ostrea_edulis_fr/fr (accessed 8.26.24).

FAO, 2024d. Résumé de La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2024. La transformation bleue en action.

FAO, 2022. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022: Vers une transformation bleue, La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (SOFIA). FAO, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/cc0461fr>

- Fitzsimons, J., Branigan, S., Brumbaugh, R., McDonald, T., zu Ermgassen, P., 2019. Restoration Guidelines for Shellfish Reefs. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22511.38563>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- France Naissain, 2023. L'anatomie de l'huître.
- FranceAgriMer, 2023. Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2023.
- Frank-Lawale, A., Allen, S.K., Dégremont, L., 2014. Breeding and Domestication of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Lines for Culture in the Mid-Atlantic, Usa: Line Development and Mass Selection for Disease Resistance. *J. Shellfish Res.* 33, 153–165. <https://doi.org/10.2983/035.033.0115>
- Fraune, S., Bosch, T.C.G., 2007. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13146–13151. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703375104>
- Fu, Q., Yu, Z., Zhao, J., Gao, L., Kong, N., Wang, L., Song, L., 2024. Spatial compartmentalization and temporal stability of associated microbiota in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Oceanol. Limnol.* 42, 1348–1358. <https://doi.org/10.1007/s00343-024-3189-7>
- Fu, S., Yang, Q., He, F., Lan, R., Hao, J., Ni, P., Liu, Y., Li, R., 2020. National Safety Survey of Animal-use Commercial Probiotics and Their Spillover Effects From Farm to Humans: An Emerging Threat to Public Health. *Clin. Infect. Dis.* 70, 2386–2395. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz642>
- Fu, T.-J., Abbott, U.R., Hatzos, C., 2002. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7154–7160. <https://doi.org/10.1021/jf020599h>
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., Xu, L., 2012. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res.* 46, 2355–2364. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.004>
- García Bernal, M., Trabal Fernández, N., Saucedo Lastra, P. e., Medina Marrero, R., Mazón-Suástegui, J. m., 2017. *Streptomyces* effect on the bacterial microbiota associated to *Crassostrea sikamea* oyster. *J. Appl. Microbiol.* 122, 601–614. <https://doi.org/10.1111/jam.13382>
- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J.-L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R., 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 755–761. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-755>
- Ghori, I., Tubassam, M., Ahmad, T., Zuberi, A., Imran, M., 2022. Gut microbiome modulation mediated by probiotics: Positive impact on growth and health status of *Labeo rohita*. *Front. Physiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.949559>

- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquac. Res.* 38, 518–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01696.x>
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gignoux-Wolfsohn, S.A., Newcomb, M.S.R., Ruiz, G.M., Pagenkopp Lohan, K.M., 2020. Environmental factors drive the release of *Perkinsus marinus* from infected oysters. *Parasitology* 148, 532–538. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002383>
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00431-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00431-2)
- Gonzalez-Araya, R., 2012. Incidence de la nutrition sur la reproduction et le développement larvaire d'*Ostrea edulis* (Thèse de doctorat). Brest.
- Gordon, L., Giraud, E., Ganière, J.-P., Armand, F., Bouju-Albert, A., de la Cotte, N., Mangion, C., Le Bris, H., 2007. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03138.x>
- Granvogl, B., Plöscher, M., Eichacker, L.A., 2007. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 991–1002. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1451-4>
- Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., Vallee-Rehel, K., Haras, D., 2003. Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria. *Biofouling* 19, 307–313. <https://doi.org/10.1080/0892701031000121041>
- Green, T.J., Vergnes, A., Montagnani, C., de Lorgeril, J., 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Vet. Res.* 47, 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0356-7>
- Grooters, K.E., Ku, J.C., Richter, D.M., Krinock, M.J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., Li, Y., 2024. Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14, 1352273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>
- Gulla, S., Lund, V., Kristoffersen, A.B., Sørum, H., Colquhoun, D.J., 2016. *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *J. Fish Dis.* 39, 329–342. <https://doi.org/10.1111/jfd.12367>
- Guzmán-Villanueva, L.T., Escobedo-Fregoso, C., Barajas-Sandoval, D.R., Gomez-Gil, B., Peña-Rodríguez, A., Martínez-Díaz, S.F., Balcázar, J.L., Quiroz-Guzmán, E., 2020. Assessment of microbial dynamics and antioxidant enzyme gene expression following probiotic administration in farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 519, 734907. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734907>
- Hall, A.E., Moraru, C.I., 2022. Comparative effects of high pressure processing and heat treatment on in vitro digestibility of pea protein and starch. *Npj Sci. Food* 6, 2. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00116-0>

- Hanke, I., Hassenrück, C., Ampe, B., Kunzmann, A., Gärdes, A., Aerts, J., 2020. Chronic stress under commercial aquaculture conditions: Scale cortisol to identify and quantify potential stressors in milkfish (*Chanos chanos*) mariculture. *Aquaculture* 526, 735352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735352>
- Helm, M.M., Bourne, N., 2006. Écloserie de bivalves. Un manuel pratique, in: *FAO Document Technique Sur Les Pêches*. Rome.
- Henry, M.A., Secombes, C.J., 2000. The A-layer influences the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to antibacterial peptides. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 637–642. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0288>
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011a. Transitions in bacterial communities along the 2000km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011b. Transitions in bacterial communities along the 2000km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Herman, L., Chemaly, M., Cocconcelli, P.S., Fernandez, P., Klein, G., Peixe, L., Prieto, M., Querol, A., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlak, J., Correia, S., 2019. The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past. *FEMS Microbiol. Lett.* 366, fny260. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny260>
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* 146, 2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
- Hidalgo, M. c., Skalli, A., Abellán, E., Arizcun, M., Cardenete, G., 2006. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquac. Nutr.* 12, 256–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00408.x>
- Hine, P.M., 2020. *Haplosporidian* host:parasite interactions. *Fish Shellfish Immunol.* 103, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.004>
- Hirota-Takahata, Y., Kozuma, S., Kuraya, N., Fukuda, D., Nakajima, M., Takatsu, T., Ando, O., 2017. Ogipeptins, novel inhibitors of LPS: physicochemical properties and structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* 70, 84–89. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.61>
- Ho Sui, S.J., Fedynak, A., Hsiao, W.W.L., Langille, M.G.I., Brinkman, F.S.L., 2009. The Association of Virulence Factors with Genomic Islands. *PLoS ONE* 4, e8094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008094>
- Hotel, A., 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – Joint FAO/WHO Expert Consultation 2014.
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., Liu, Q., 2022. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* 3, e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>

- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Irie, Y., Borlee, B.R., O'Connor, J.R., Hill, P.J., Harwood, C.S., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20632–20636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217993109>
- ISO 20776-1, 2019. ISO 20776-1:2019(fr), Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1: Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses [WWW Document]. URL <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:20776:-1:ed-2:v2:fr> (accessed 7.19.24).
- Ivanova, E.P., Kiprianova, E.A., Mikhailov, V.V., Levanova, G.F., Garagulya, A.D., Gorshkova, N.M., Vysotskii, M.V., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Yoshikawa, S., 1998. Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 1, 247–256. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-247>
- Jin, Q., Kirk, M.F., 2018. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front. Environ. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>
- Johnson, M., Hillier, K., 2007. Pancreatin, in: Enna, S.J., Bylund, D.B. (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, New York, pp. 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62359-1>
- Jouault, A., Gobet, A., Simon, M., Portier, E., Perennou, M., Corre, E., Gaillard, F., Vallenet, D., Michel, G., Fleury, Y., Bazire, A., Dufour, A., 2020. Alterocin, an Antibiofilm Protein Secreted by *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00893-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00893-20>
- Jun, J.W., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Chai, J.Y., Park, S.C., 2013. Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 416–417, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.045>
- Kassambara, A., 2020. Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests [R package rstatix version 0.6.0].
- Kheadr, E., Zihler, A., Dabour, N., Lacroix, C., Le Blay, G., Fliss, I., 2010. Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model. *J. Appl. Microbiol.* 109, 54–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04644.x>
- King, W.L., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K.R., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2020. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 96, fiae054. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae054>
- Kirthika, P., Jawalagatti, V., Senevirathne, A., Lee, J.H., 2022. Coordinated interaction between Lon protease and catalase-peroxidase regulates virulence and oxidative stress management during Salmonellosis. *Gut Microbes* 14, 2064705. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2064705>

- Kremsmayr, T., Aljnabi, A., Blanco-Canosa, J.B., Tran, H.N.T., Emidio, N.B., Muttenthaler, M., 2022. On the Utility of Chemical Strategies to Improve Peptide Gut Stability. *J. Med. Chem.* 65, 6191–6206. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00094>
- Kumar, S., Ishaq Ahmed, V.P., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Sarath Babu, V., Sahul Hameed, A.S., 2008. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.004>
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7, 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Lamy, B., Baron, S., Barraud, O., 2022. *Aeromonas*: the multifaceted middleman in the *One Health* world. *Curr. Opin. Microbiol.* 65, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.012>
- Lane, H., Webb, S., Duncan, J., 2016. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Dis. Aquat. Organ.* 118, 55–63. <https://doi.org/10.3354/dao02960>
- Lasa, A., di Cesare, A., Tassistro, G., Borello, A., Gualdi, S., Furones, D., Carrasco, N., Cheslett, D., Brechon, A., Paillard, C., Bidault, A., Pernet, F., Canesi, L., Edomi, P., Pallavicini, A., Pruzzo, C., Vezzulli, L., 2019. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environ. Microbiol.* 21, 4548–4562. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14750>
- Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K.M., 2019. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>
- Lebeau, I., Lammertyn, E., De Buck, E., Maes, L., Geukens, N., Van Mellaert, L., Arckens, L., Anné, J., Clerens, S., 2005. First proteomic analysis of *Legionella pneumophila* based on its developing genome sequence. *Res. Microbiol.* 156, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.08.010>
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., Moëgne-Loccoz, Y., 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.* 22, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>
- Lentle, R.G., Janssen, P.W.M., 2011. *The Physical Processes of Digestion*. Springer Science & Business Media.
- Li, B., Jin, D., Etareri Evivie, S., Li, N., Yan, F., Zhao, L., Liu, F., Huo, G., 2017. Safety Assessment of *Lactobacillus helveticus* KLDS1.8701 Based on Whole Genome Sequencing and Oral Toxicity Studies. *Toxins* 9, 301. <https://doi.org/10.3390/toxins9100301>
- Li, C., Hu, Y., Li, S., Yi, X., Shao, S., Yu, W., Li, E., 2023. Biological factors controlling starch digestibility in human digestive system. *Food Sci. Hum. Wellness* 12, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.037>
- Li, J., Chen, Y., Yuan, N., Zeng, M., Zhao, Y., Yu, R., Liu, Z., Wu, H., Dong, S., 2018. A Novel Natural Influenza A H1N1 Virus Neuraminidase Inhibitory Peptide Derived from Cod Skin Hydrolysates and Its Antiviral Mechanism. *Mar. Drugs* 16, 377. <https://doi.org/10.3390/md16100377>

- Li, L., Lin, S.-L., Deng, L., Liu, Z.-G., 2013. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Fish Dis.* 36, 987–995. <https://doi.org/10.1111/jfd.12032>
- Li, S., Tran, N.T., 2022. Paraprobiotics in Aquaculture, in: Austin, B., Sharifuzzaman, S.M. (Eds.), *Probiotics in Aquaculture*. Springer International Publishing, Cham, pp. 131–164. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98621-6_7
- Li, X., Yang, B., Shi, C., Wang, H., Yu, R., Li, Q., Liu, S., 2022. Synergistic Interaction of Low Salinity Stress With *Vibrio* Infection Causes Mass Mortalities in the Oyster by Inducing Host Microflora Imbalance and Immune Dysregulation. *Front. Immunol.* 13, 859975. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.859975>
- Li, Y., Yun, H., Chen, R., Jiao, N., Zheng, Q., Yang, Y., Zhang, R., 2023. Characterization of a Vibriophage Infecting Pathogenic *Vibrio harveyi*. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 16202. <https://doi.org/10.3390/ijms242216202>
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O., Zhang, Q., 2003. Critical Role of Multidrug Efflux Pump CmeABC in Bile Resistance and In Vivo Colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 71, 4250–4259. <https://doi.org/10.1128/iai.71.8.4250-4259.2003>
- Lin, T.-L., Shu, C.-C., Chen, Y.-M., Lu, J.-J., Wu, T.-S., Lai, W.-F., Tzeng, C.-M., Lai, H.-C., Lu, C.-C., 2020. Like Cures Like: Pharmacological Activity of Anti-Inflammatory Lipopolysaccharides From Gut Microbiome. *Front. Pharmacol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00554>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J., 2022. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [WWW Document]. URL <https://academic.oup.com/nar/article/50/D1/D912/64446532> (accessed 12.19.22).
- Lokmer, A., Goedknecht, M.A., Thielges, D.W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J.F., Wegner, K.M., 2016a. Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Front. Microbiol.* 7.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F., Wegner, K.M., 2016b. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environ. Microbiol.* 18, 970–987. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13163>
- Lokmer, A., Mathias Wegner, K., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* 9, 670–682. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160>
- Lu, Z., Lin, W., Li, Q., Wu, Q., Ren, Z., Mu, C., Wang, C., Shi, C., Ye, Y., 2024. Recirculating aquaculture system as microbial community and water quality management strategy in the larviculture of *Scylla paramamosain*. *Water Res.* 252, 121218. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121218>
- Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., Xin, B., 2022. Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms. *Front. Microbiol.* 12, 757327. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.757327>
- Madison, D., Schubiger, C., Lunda, S., Mueller, R.S., Langdon, C., 2022. A marine probiotic treatment against the bacterial pathogen *Vibrio coralliilyticus* to improve the performance of Pacific (*Crassostrea gigas*) and Kumamoto (*C. sikamea*) oyster larvae. *Aquaculture* 560, 738611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738611>

- Malazarte, J., Muotka, T., Jyväsjärvi, J., Lehosmaa, K., Nyberg, J., Huttunen, K.-L., 2022. Bacterial communities in a subarctic stream network: Spatial and seasonal patterns of benthic biofilm and bacterioplankton. *Mol. Ecol.* 31, 6649–6663. <https://doi.org/10.1111/mec.16711>
- Malberg Tetzschner, A.M., Johnson, J.R., Johnston, B.D., Lund, O., Scheutz, F., 2020. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* 58, e01269-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>
- Maneiro, V., Santos, Y., Pazos, A.J., Silva, A., Torres-Corral, Y., Sánchez, J.L., Pérez-Parallé, M.L., 2020. Effects of food ration, water flow rate and bacteriological levels of broodstock on the reproductive conditioning of the European flat oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758). *Aquac. Rep.* 18, 100412. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100412>
- Margulis, L., Fester, R., 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation : speciation and morphogenesis | Semantic Scholar. MIT Press.
- Martin, A., Littaye-Mariette, A., Langlade, A., Allenou, J., 1995. Cycle de reproduction naturelle de l’huitre plate *Ostrea edulis*.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramírez Saad, H.C., 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. *Int. Sch. Res. Not.* 2012, e916845. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Matsumoto, K., Sakami, T., Watanabe, T., Taniuchi, Y., Kuwata, A., Kakehi, S., Engkong, T., Igarashi, Y., Kinoshita, S., Asakawa, S., Hattori, M., Watabe, S., Ishino, Y., Kobayashi, T., Gojobori, T., Ikeo, K., 2021. Metagenomic analysis provides functional insights into seasonal change of a non-cyanobacterial prokaryotic community in temperate coastal waters. *PLOS ONE* 16, e0257862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257862>
- McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O’Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D., 2013. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McCullough, C., ALBRIGHT, B., Abbe, G., Barker, L., Dungan, C., 2009. Acquisition and progression of *Perkinsus marinus* infections by specific-pathogen-free juvenile oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in a mesohaline Chesapeake Bay tributary. *J. Shellfish Res.* 26, 465–477. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[465:AAPOPM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[465:AAPOPM]2.0.CO;2)
- McGinnis, S., Madden, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32, W20–W25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- McLoughlin, K., Schluter, J., Rakoff-Nahoum, S., Smith, A.L., Foster, K.R., 2016. Host Selection of Microbiota via Differential Adhesion. *Cell Host Microbe* 19, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.021>

- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendoza, J.A., Ignacio, J.L., Buckley, C.M., 2021. The Hsp60 Protein of *Helicobacter Pylori* Exhibits Chaperone and ATPase Activities at Elevated Temperatures. BioChem 1, 19–25. <https://doi.org/10.3390/biochem1010002>
- Merino, S., De Mendoza, E., Canals, R., Tomás, J.M., 2015. Functional Genomics of the *Aeromonas salmonicida* Lipopolysaccharide O-Antigen and A-Layer from Typical and Atypical Strains. Mar. Drugs 13, 3791–3808. <https://doi.org/10.3390/md13063791>
- Merrifield, D. I., Bradley, G., Baker, R. t. m., Davies, S. j., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. Aquac. Nutr. 16, 496–503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x>
- Mesías-Gansbiller, C., Silva, A., Maneiro, V., Pazos, A., Sánchez, J.L., Pérez-Parallé, M.L., 2013. Effects of chemical cues on larval settlement of the flat oyster (*Ostrea edulis* L.): A hatchery approach. Aquaculture 376–379, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.022>
- Miller, S.I., 2016. Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. mBio 7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-16>
- Minekus, M., 2015. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM), in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), The Impact of Food Bioactives on Health: *In Vitro* and *Ex Vivo* Models. Springer International Publishing, Cham, pp. 37–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_5
- Mion, S., Remy, B., Plener, L., Chabrière, É., Daudé, D., 2019. Quorum sensing et quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? médecine/sciences 35, 31–38. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018310>
- Mohapatra, S.S., Dwibedy, S.K., Padhy, I., 2021. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. J. Biosci. 46, 85. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>
- Moran, N.A., Sloan, D.B., 2015. The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? PLOS Biol. 13, e1002311. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Moravkova, M., Kostovova, I., Kavanova, K., Pechar, R., Stanek, S., Brychta, A., Zeman, M., Kubasova, T., 2023. Antibiotic Susceptibility, Resistance Gene Determinants and Corresponding Genomic Regions in *Lactobacillus amylovorus* Isolates Derived from Wild Boars and Domestic Pigs. Microorganisms 11, 103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010103>
- Muhammad, M.H., Idris, A.L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., Huang, T., 2020. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. Front. Microbiol. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>

- Naimi, S., Zirah, S., Hammami, R., Fernandez, B., Rebuffat, S., Fliss, I., 2018. Fate and Biological Activity of the Antimicrobial Lasso Peptide Microcin J25 Under Gastrointestinal Tract Conditions. *Front. Microbiol.* 9, 1764. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01764>
- Narsaiah, K., Jha, S.N., Wilson, R.A., Mandge, H.M., Manikantan, M.R., 2014. Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *J. Food Sci. Technol.* 51, 4054–4059. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0886-6>
- Navarro-Torre, S., Carro, L., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., Caviedes, M.Á., Igual, J.M., Klenk, H.-P., Montero-Calasanz, M.D.C., 2020. *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant growth-promoting bacterium with potential use in phytoremediation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 3287–3294. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004167>
- Nayak, S.K., 2021. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Rev. Aquac.* 13, 862–906. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Newaj-Fyzul, A., Austin, B., 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J. Fish Dis.* 38, 937–955. <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>
- Nguyen, V.K., King, W.L., Siboni, N., Mahbub, K.R., Dove, M., O'Connor, W., Seymour, J.R., Labbate, M., 2020. The Sydney rock oyster microbiota is influenced by location, season and genetics. *Aquaculture* 527, 735472. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735472>
- Noël, C., Quintric, L., Cormier, A., Leroi, L., Durand, P., 2021. SAMBA: Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses workflow. <https://doi.org/10.48546/WORKFLOWHUB.WORKFLOW.156.1>
- Noh, D.O., Gilliland, S.E., 1993. Influence of Bile on Cellular Integrity and β -Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus* 1. *J. Dairy Sci.* 76, 1253–1259. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77454-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77454-8)
- NORA, 2024. NORA : the Native Oyster Restoration Alliance [WWW Document]. URL <https://nora-europe.eu/native-oyster/>
- Offret, C., Cuny, H., Bodet, P.-E., Desriac, F., Jegou, C., Bazire, A., Chevrot, R., Thiery, V., Brillet, B., Fleury, Y., 2022. Alterins, a new family of marine antibacterial cyclolipopeptides. *Int. J. Antimicrob. Agents* 59, 106514. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106514>
- Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jégou, C., Fleury, Y., 2016a. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar. Drugs* 14, E129. <https://doi.org/10.3390/md14070129>
- Offret, C., Fliss, I., Bazinet, L., Murette, A., Beaulieu, L., 2019a. Identification of A Novel Antibacterial Peptide from Atlantic Mackerel belonging to the GAPDH-Related Antimicrobial Family and Its In Vitro Digestibility. *Mar. Drugs* 17, 413. <https://doi.org/10.3390/md17070413>
- Offret, C., Jégou, C., Mounier, J., Fleury, Y., Le Chevalier, P., 2019b. New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1023–1031. <https://doi.org/10.1111/jam.14184>

Offret, C., Paulino, S., Gauthier, O., Château, K., Bidault, A., Corporeau, C., Miner, P., Petton, B., Pernet, F., Fabioux, C., Paillard, C., Blay, G.L., 2020. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 96, fiaa078. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa078>

Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2019c. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11, 239–247. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9389-8>

Okon, E.M., Birikorang, H.N., Munir, M.B., Kari, Z.A., Téllez-Isaías, G., Khalifa, N.E., Abdelnour, S.A., Eissa, M.E.H., Al-Farga, A., Dighiesh, H.S., Eissa, E.-S.H., 2023. A Global Analysis of Climate Change and the Impacts on Oyster Diseases. *Sustainability* 15, 12775. <https://doi.org/10.3390/su151712775>

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O’Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Wagner, H., 2015. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 22-1 2, 1–2.

Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., hara, R., Solymos, P., STEVENS, H., Szöcs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Cáceres, M., Durand, S., Weedon, J., 2022. vegan community ecology package version 2.6-2 April 2022.

Olesen, S.W., Duvallet, C., Alm, E.J., 2017. dbOTU3: A new implementation of distribution-based OTU calling. *PLOS ONE* 12, e0176335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176335>

OMS, 2023. Une seule santé [WWW Document]. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/one-health> (accessed 7.5.24).

Padayhag, B.M., Nada, M.A.L., Baquiran, J.I.P., Sison-Mangus, M.P., San Diego-McGlone, M.L., Cabaitan, P.C., Conaco, C., 2023. Microbial community structure and settlement induction capacity of marine biofilms developed under varied reef conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 193, 115138. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115138>

Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K.M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Arzul, I., 2022. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.026>

Pantel, L., Florin, T., Dobosz-Bartoszek, M., Racine, E., Sarciaux, M., Serri, M., Houard, J., Campagne, J.-M., de Figueiredo, R.M., Midrier, C., Gaudriault, S., Givaudan, A., Lanois, A., Forst, S., Aumelas, A., Cotteaux-Lautard, C., Bolla, J.-M., Vingsbo Lundberg, C., Huseby, D.L., Hughes, D., Villain-Guillot, P., Mankin, A.S., Polikanov, Y.S., Gualtieri, M., 2018. Odilorhabdins, Antibacterial Agents that Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site. *Mol. Cell* 70, 83-94.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.001>

Panthee, S., Paudel, A., Hamamoto, H., Ogasawara, A.A., Iwasa, T., Blom, J., Sekimizu, K., 2021. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis* EF-2001, a probiotic bacterium. *Genomics* 113, 1534–1542. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.021>

Pappalardo, P., Collins, A.G., Pagenkopp Lohan, K.M., Hanson, K.M., Truskey, S.B., Jaeckle, W., Ames, C.L., Goodheart, J.A., Bush, S.L., Biancani, L.M., Strong, E.E., Vecchione, M., Harasewych, M.G., Reed, K., Lin, C., Hartil, E.C., Whelpley, J., Blumberg, J., Matterson, K., Redmond, N.E., Becker, A., Boyle, M.J.,

- Osborn, K.J., 2021. The role of taxonomic expertise in interpretation of metabarcoding studies. *ICES J. Mar. Sci.* 78, 3397–3410. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab082>
- Paquet, V.E., Vincent, A.T., Moineau, S., Charette, S.J., 2019. Beyond the A-layer: adsorption of lipopolysaccharides and characterization of bacteriophage-insensitive mutants of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Mol. Microbiol.* 112, 667–677. <https://doi.org/10.1111/mmi.14308>
- Parisi, K., Poon, S., Renda, R.F., Sahota, G., English, J., Yalpani, N., Bleackley, M.R., Anderson, M.A., van der Weerden, N.L., 2020. Improving the Digestibility of Plant Defensins to Meet Regulatory Requirements for Transgene Products in Crop Protection. *Front. Plant Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01227>
- Patel, K.S., Thavamani, A., 2024. Physiology, Peristalsis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods* 10, 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- Pereira, W.A., Mendonça, C.M.N., Urquiza, A.V., Marteinsson, V.P., LeBlanc, J.G., Cotter, P.D., Villalobos, E.F., Romero, J., Oliveira, R.P.S., 2022. Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms* 10, 1705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., Balcázar, J.L., 2018a. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends Microbiol.* 26, 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Petrosillo, I., Scardia Scardia, A.M., Ungaro, N., Specchiulli, A., Fanelli, G., Centoducati, G., De Serio, F., Carlucci, R., Valente, D., Barbone, E., Pini, A., Giannuzzi, C.G., Scirocco, T., Lovello, E.M., Deflorio, M., Lillo, A.O., De Padova, D., Papa, L., Goffredo, E., Mancini, M.E., Mossa, M., 2023. Towards sustainable marine spatial planning of aquaculture. *Ecol. Indic.* 154, 110542. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110542>
- Petton, B., Destoumieux-Garzón, D., Pernet, F., Toulza, E., de Lorigeril, J., Degremont, L., Mitta, G., 2021. The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of Knowledge and Future Directions. *Front. Immunol.* 12, 630343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>
- Picot, D., Layec, S., Seynhaeve, E., Dussaulx, L., Trivin, F., Carsin-Mahe, M., 2020. Chyme Reinfusion in Intestinal Failure Related to Temporary Double Enterostomies and Enteroatmospheric Fistulas. *Nutrients* 12, 1376. <https://doi.org/10.3390/nu12051376>
- Piddock, L.J.V., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>
- Pierce, M., 2016. The Microbiome of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791): Temporal and Spatial Variation, Environmental Influences, and its Impact on Host Physiology. Thèse de doctorat.
- Pierce, M., Ward, J., 2018. Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family *Ostreidae*. *J. Shellfish Res.* 37, 793–806. <https://doi.org/10.2983/035.037.0410>

- Pires, D.P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., Lu, T.K., 2016. Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 80, 523–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15>
- Planas, M., Vázquez, J.A., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M.P., Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 240, 313–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.016>
- Pogoda, B., 2019. Current Status of European Oyster Decline and Restoration in Germany. *Humanities* 8, 9. <https://doi.org/10.3390/h8010009>
- Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Posit team, 2024. RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA.
- Pradel, E., Ewbank, J.J., 2004. Genetic models in pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 38, 347–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092528>
- Prado, S., Dubert, J., Barja, J.L., 2015. Characterization of pathogenic vibrios isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. europaeus [corrected] subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.11.005>
- Prado, S., Romalde, J.L., Barja, J.L., 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet. Microbiol.* 145, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.021>
- Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J., Barja, J.L., 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 209–215. <https://doi.org/10.3354/dao067209>
- Preena, P.G., Swaminathan, T.R., Kumar, V.J.R., Singh, I.S.B., 2020a. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia (Bratisl.)* 75, 1497–1517. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>
- Pulido, D., Nogués, M.V., Boix, E., Torrent, M., 2012. Lipopolysaccharide Neutralization by Antimicrobial Peptides: A Gambit in the Innate Host Defense Strategy. *J. Innate Immun.* 4, 327–336. <https://doi.org/10.1159/000336713>
- Rahman, M.A., Ashrafudoulla, M., Akter, S., Park, S.H., Ha, S.-D., 2023. Probiotics and biofilm interaction in aquaculture for sustainable food security: A review and bibliometric analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2249114>
- Rahmani, A., Parizadeh, L., Baud, M., Francois, Y., Bazire, A., Rodrigues, S., Fleury, Y., Cuny, H., Debossé, E., Cabon, J., Louboutin, L., Bellec, L., Danion, M., Morin, T., 2023. Potential of Marine Strains of *Pseudoalteromonas* to Improve Resistance of Juvenile Sea Bass to Pathogens and Limit Biofilm Development. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10180-5>
- Rajeev, R., Adithya, K. k., Kiran, G.S., Selvin, J., 2021. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. *Rev. Aquac.* 13, 238–258. <https://doi.org/10.1111/raq.12471>

Ramsay, P.T., Carr, A., 2011. Gastric acid and digestive physiology. *Surg. Clin. North Am.* 91, 977–982. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2011.06.010>

Remple, K.L., Silbiger, N.J., Quinlan, Z.A., Fox, M.D., Kelly, L.W., Donahue, M.J., Nelson, C.E., 2021. Coral reef biofilm bacterial diversity and successional trajectories are structured by reef benthic organisms and shift under chronic nutrient enrichment. *Npj Biofilms Microbiomes* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00252-1>

Reygaert, W.C., 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 4, 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., Bergeron, N., Laurent-Lewandowski, S., Fairbrother, J.M., Letellier, A., 2015. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Res. Vet. Sci.* 102, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.005>

Rizzo, C., Perrin, E., Poli, A., Finore, I., Fani, R., Lo Giudice, A., 2022. Characterization of the exopolymer-producing *Pseudoalteromonas* sp. S8-8 from Antarctic sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 7173–7185. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12180-x>

Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., Bazire, A., 2015. Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 45–51. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9173-3>

Rogers, K., 2010. The digestive system. *Britannica Educational Publishing.*

Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., Ferdous, Z., Siddik, M.A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., Shahjahan, M., 2022. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 120, 569–589. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.037>

Roquigny, R., Mougin, J., Le Bris, C., Bonnin-Jusserand, M., Doyen, P., Grard, T., 2021. Characterization of the marine aquaculture microbiome: A seasonal survey in a seabass farm. *Aquaculture* 531, 735987. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735987>

Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6, 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>

Roux, F.L., Blokesch, M., 2018. Eco-evolutionary Dynamics Linked to Horizontal Gene Transfer in *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 89–110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062148>

Rutherford, S.T., van Kessel, J.C., Shao, Y., Bassler, B.L., 2011. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes Dev.* 25, 397–408. <https://doi.org/10.1101/gad.2015011>

Sakura, N., Itoh, T., Uchida, Y., Ohki, K., Okimura, K., Chiba, K., Sato, Y., Sawanishi, H., 2004. The Contribution of the N-Terminal Structure of Polymyxin B Peptides to Antimicrobial and Lipopolysaccharide Binding Activity. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 1915–1924. <https://doi.org/10.1246/bcsj.77.1915>

Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., Briand, J.-F., 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12186>

- Sanders, M.E., Akkermans, L.M.A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J.T., Hörmannspurger, G., Huys, G., 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1, 164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Sanders, M.E., Merenstein, D., Merrifield, C.A., Hutkins, R., 2018. Probiotics for human use. *Nutr. Bull.* 43, 212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>
- Sangsawad, P., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J., 2017. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. *J. Funct. Foods* 29, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.005>
- Santos, L., Ramos, F., 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Sarciaux, M., Pantel, L., Midrier, C., Serri, M., Gerber, C., Marcia de Figueiredo, R., Campagne, J.-M., Villain-Guillot, P., Gualtieri, M., Racine, E., 2018. Total Synthesis and Structure–Activity Relationships Study of Odilorhaptins, a New Class of Peptides Showing Potent Antibacterial Activity. *J. Med. Chem.* 61, 7814–7826. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00790>
- Schar, D., Zhao, C., Wang, Y., Larsson, D.G.J., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P., 2021. Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia. *Nat. Commun.* 12, 5384. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25655-8>
- Scheufele, F., Schirren, R., Friess, H., Reim, D., 2020. Selective decontamination of the digestive tract in upper gastrointestinal surgery: systematic review with meta-analysis of randomized clinical trials. *BJS Open* 4, 1015–1021. <https://doi.org/10.1002/bjs5.50332>
- Schmidt, R., Etalo, D.W., de Jager, V., Gerards, S., Zweers, H., de Boer, W., Garbeva, P., 2016. Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01495>
- Schmitt, P., Rosa, R.D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2012. The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front. Microbiol.* 3, 160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160>
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>
- Sensoy, I., 2021. A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Curr. Res. Food Sci.* 4, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S.D., Schwartz, S.A., Bruggemann, L., Aalinkeel, R., 2023. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* 11, 1614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>

- Shikata, M., Hayashi, N., Fujimoto, A., Nakamura, T., Matsui, N., Ishiyama, A., Maekawa, Y., Gotoh, N., 2016. The pilT gene contributes to type III ExoS effector injection into epithelial cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 22, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.12.012>
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J.B., Ho, Y.W., 2017. Probiotics: From Isolation to Application. *J. Am. Coll. Nutr.* 36, 666–676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>
- Slingerland, C.J., Martin, N.I., 2024. Recent Advances in the Development of Polymyxin Antibiotics: 2010–2023. *ACS Infect. Dis.* 10, 1056–1079. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.3c00630>
- Soltani, S., Zirah, S., Rebuffat, S., Couture, F., Boutin, Y., Biron, E., Subirade, M., Fliss, I., 2022. Gastrointestinal Stability and Cytotoxicity of Bacteriocins From Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Comparative *in vitro* Study. *Front. Microbiol.* 12, 780355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.780355>
- Stevick, R.J., Sohn, S., Modak, T.H., Nelson, D.R., Rowley, D.C., Tammi, K., Smolowitz, R., Markey Lundgren, K., Post, A.F., Gómez-Chiarri, M., 2019. Bacterial Community Dynamics in an Oyster Hatchery in Response to Probiotic Treatment. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01060>
- Suquet, M., Pouvreau, S., Queau, I., Boulais, M., Grand, J.L., Ratiskol, D., Cosson, J., 2018. Biological characteristics of sperm in European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Aquat. Living Resour.* 31, 20. <https://doi.org/10.1051/alr/2018008>
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Tabassum, T., Sofi Uddin Mahamud, A.G.M., Acharjee, T.K., Hassan, R., Akter Snigdha, T., Islam, T., Alam, R., Khoiam, Md.U., Akter, F., Azad, Md.R., Al Mahamud, Md.A., Ahmed, G.U., Rahman, T., 2021. Probiotic supplementations improve growth, water quality, hematology, gut microbiota and intestinal morphology of *Nile tilapia*. *Aquac. Rep.* 21, 100972. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100972>
- Takiguchi, S., Hirota-Takahata, Y., Nishi, T., 2022. Total Synthesis and Structural Elucidation of Ogipeptins | *Organic Letters* 4935–4938. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c01863>
- Takiguchi, S., Homma, H., Fujisawa, T., Hirota-Takahata, Y., Ono, Y., Kizuka, M., Ishii, Y., Yoshimura, S., Nishi, T., 2021. Syntheses and antimicrobial activities of ogipeptin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 42, 128093. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128093>
- Takyi, E., LaPorte, J., Sohn, S., Stevick, R.J., Witkop, E.M., Gregg, L.S., Chesler-Poole, A., Small, J., White, M.M., Giray, C., Rowley, D.C., Nelson, D.R., Gomez-Chiarri, M., 2023. Development and evaluation of a formulation of probiont *Phaeobacter inhibens* S4 for the management of vibriosis in bivalve hatcheries. *Aquac. Fish Fish.* 3, 256–267. <https://doi.org/10.1002/aff2.112>
- Takyi, E., Stevick, R.J., Witkop, E.M., Gregg, L., Chesler-Poole, A., Small, J.M., White, M.M., Hudson, R., Giray, C., Rowley, D.C., Nelson, D.R., Gomez-Chiarri, M., 2024. Probiotic treatment modulates the bacterial microbiome of larval eastern oysters, *Crassostrea virginica*, in hatcheries. *Aquaculture* 583, 740624. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740624>
- Tang, H., Huang, W., Yao, Y.-F., 2023. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microb. Cell* 10, 49–62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>

- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Jeon, M.-J., Bai, S.C., Lee, W.-J., Yuge, K., Koshio, S., 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72, 310–321. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x>
- Theis, K.R., Dheilly, N.M., Klassen, J.L., Brucker, R.M., Baines, J.F., Bosch, T.C.G., Cryan, J.F., Gilbert, S.F., Goodnight, C.J., Lloyd, E.A., Sapp, J., Vandenkoornhuysen, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., Bordenstein, S.R., 2016. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 1, e00028-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16>
- Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R.A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A., Tello, M., Bermúdez-Humarán, L.G., 2024. Importance of Probiotics in Fish Aquaculture: Towards the Identification and Design of Novel Probiotics. *Microorganisms* 12, 626. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030626>
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., Lésel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00650-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00650-0)
- Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Romero, J., 2014. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 69–83. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12270>
- Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Morales-Bojórquez, E., Romero, J., 2012. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. *Microb. Ecol.* 64, 555–569. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0039-5>
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J. Invertebr. Pathol.* 123, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.009>
- Trimble, M.J., Mlynářčík, P., Kolář, M., Hancock, R.E.W., 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025288. <https://doi.org/10.1101/csh.perspect.a025288>
- Tsuchiya, Y., Hiraki, A., Kiriya, C., Arakawa, T., Kusakabe, R., Morisaki, H., 2011. Seasonal Change of Bacterial Community Structure in a Biofilm Formed on the Surface of the Aquatic Macrophyte *Phragmites australis*. *Microbes Environ.* 26, 113–119. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10183>
- Tsuji, S., Inui, R., Nakao, R., Miyazono, S., Saito, M., Kono, T., Akamatsu, Y., 2022. Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Sci. Rep.* 12, 21524. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25274-3>
- Ucieklak, K., Wojtys-Tekiel, S., Leroy, G., Le Devendec, L., Baron, S., Kaszowska, M., 2024. New Structure of *Aeromonas salmonicida* O-Polysaccharide Isolated from Ill Farmed Fish. *Microorganisms* 12, 1575. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081575>

- Ugurlu, T., Turkoglu, M., Gurer, U.S., Akarsu, B.G., 2007. Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.016>
- Unzueta-Martínez, A., Scanes, E., Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W., Bowen, J.L., 2022a. Microbiomes of the Sydney Rock Oyster are acquired through both vertical and horizontal transmission. *Anim. Microbiome* 4, 32. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00186-9>
- Unzueta-Martínez, A., Welch, H., Bowen, J.L., 2022b. Determining the Composition of Resident and Transient Members of the Oyster Microbiome. *Front. Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.828692>
- Urdaneta, V., Casadesús, J., 2017. Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. *Front. Med.* 4, 163. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00163>
- Usyk, M., Peters, B.A., Karthikeyan, S., McDonald, D., Sollecito, C.C., Vazquez-Baeza, Y., Shaffer, J.P., Gellman, M.D., Talavera, G.A., Daviglus, M.L., Thyagarajan, B., Knight, R., Qi, Q., Kaplan, R., Burk, R.D., 2023. Comprehensive evaluation of shotgun metagenomics, amplicon sequencing, and harmonization of these platforms for epidemiological studies. *Cell Rep. Methods* 3, 100391. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100391>
- Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., Médigue, C., 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res.* 34, 53–65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj406>
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L.R., Hernández-Mendoza, A., Cicala, F., Lago-Lestón, A., Martínez-Porchas, M., 2021. Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? *Aquaculture* 544, 737050. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737050>
- Vasconcelos, G.J., Lee, J.S., 1972. Microbial Flora of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) Subjected to Ultraviolet-Irradiated Seawater. *Appl. Microbiol.* 23, 11–16. <https://doi.org/10.1128/am.23.1.11-16.1972>
- Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J., 2010. Structure—Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* 53, 1898–1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>
- Venema, K., Verhoeven, J., Verbruggen, S., Espinosa, L., Courau, S., 2019. Probiotic survival during a multi-layered tablet development as tested in a dynamic, computer-controlled *in vitro* model of the stomach and small intestine (TIM-1). *Lett. Appl. Microbiol.* 69, 325–332. <https://doi.org/10.1111/lam.13211>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000>
- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., Pruzzo, C., 2018. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microb. Ecol.* 75, 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6>

- Wali, U.M., Mori, Y., Maenaka, R., Kai, K., Tanaka, M., Ohnishi, K., Kiba, A., Hikichi, Y., 2015. The N-acetyltransferase gene-implicated iron acquisition contributes to host specificity of *Pseudomonas cichorii* strain SPC9018 and its virulence. *Physiol. Mol. Plant Pathol., Special Section on Molecular interactions between crops and pathogens* 92, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.08.008>
- Wang, B., Xie, N., Li, B., 2019. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and *in vitro* bioavailability: A review. *J. Food Biochem.* 43, e12571. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12571>
- Wang, F., Ghonimy, A., Wang, X., 2024. Whole-genome sequencing of *Pseudoalteromonas piscicida* 2515 revealed its antibacterial potency against *Vibrio anguillarum*: a preliminary *in vitro* study. *Antonie Van Leeuwenhoek* 117, 84. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01974-w>
- Wang, Y., Zhu, S., Zhang, T., Gao, M., Zhan, X., 2024. New Horizons in Probiotics: Unraveling the Potential of Edible Microbial Polysaccharides through In Vitro Digestion Models. *Foods* 13, 713. <https://doi.org/10.3390/foods13050713>
- Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., Hale, M., 2017. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar. Drugs* 15, 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- Wegner, K.M., Volkenborn, N., Peter, H., Eiler, A., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol.* 13, 252. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-252>
- Weinstein, M.M., Prem, A., Jin, M., Tang, S., Bhasin, J.M., 2019. FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. <https://doi.org/10.1101/610394>
- Whitcomb, D.C., Lowe, M.E., 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>
- Wietz, M., Hall, M.R., Høj, L., 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.04.001>
- Wu, Y., Liu, D., Zhao, S., Huang, Y., Yu, J., Zhou, Q., 2022. Assessing the safety and probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* 13002 based on complete genome and phenotype analysis. *LWT* 155, 112847. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112847>
- Xia, X., Zhang, L., Wang, Y., 2015. The antimicrobial peptide cathelicidin-BF could be a potential therapeutic for *Salmonella typhimurium* infection. *Microbiol. Res.* 171, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.009>
- Xie, N., Wang, B., Jiang, L., Liu, C., Li, B., 2015. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption. *Food Res. Int. Ott. Ont* 76, 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.025>
- Xu, S., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Dai, Z., Zhou, L., Feng, T., Chen, M., Wu, T., Hu, E., Yu, G., 2023. *MicrobiotaProcess*: A comprehensive R package for deep mining microbiome. *The Innovation* 4, 100388. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>

- Yang, B., Zhai, S., Li, X., Tian, J., Li, Q., Shan, H., Liu, S., 2021. Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 535, 736363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736363>
- Yoon, E.-J., Nait Chabane, Y., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., Grillot-Courvalin, C., 2015. Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio* 6, 10.1128/mbio.00309-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00309-15>
- Yuan, F., Yin, S., Xu, Y., Xiang, L., Wang, H., Li, Z., Fan, K., Pan, G., 2021. The Richness and Diversity of Catalases in Bacteria. *Front. Microbiol.* 12, 645477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645477>
- Zack, K.M., Sorenson, T., Joshi, S.G., 2024. Types and Mechanisms of Efflux Pump Systems and the Potential of Efflux Pump Inhibitors in the Restoration of Antimicrobial Susceptibility, with a Special Reference to *Acinetobacter baumannii*. *Pathogens* 13, 197. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030197>
- Zavascki, A.P., Nation, R.L., 2017. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02319-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02319-16>
- Zhang, L., Zhao, F., Xu, H., Chen, Y., Qi, C., Liu, J., 2022. HtrA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a virulence factor that confers resistance to heat shock and oxidative stress. *Gene* 841, 146771. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146771>
- Zhao, X., Zhang, M., Muhammad, I., Cui, Q., Zhang, H., Jia, Y., Xu, Q., Kong, L., Ma, H., 2021. An Antibacterial Peptide with High Resistance to Trypsin Obtained by Substituting d-Amino Acids for Trypsin Cleavage Sites. *Antibiotics* 10, 1465. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121465>
- Zhou, H., Tan, Y., McClements, D.J., 2023. Applications of the INFOGEST *In Vitro* Digestion Model to Foods: A Review. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 14, 135–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>
- Zinger, L., Gobet, A., Pommier, T., 2012. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Mol. Ecol.* 21, 1878–1896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05362.x>
- Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>
- zu Ermgassen, P.S.E., Albentosa, M., Bakker, N., Blanco, A., Bonačić, K., Carboni, S., Brundu, G., Colsoul, B., Piñeiro, N.A., Costa, F. da, Dubbeldam, M., Fabra, M., Galley, T., Gowland, D., Jones, N., Hernández, Á., Hernandis, S., Laugen, A.T., Magnesen, T., Malham, S., Pogoda, B., Preston, J., Sas, H., Saurel, C., Barja, J.L., Kamermans, P., 2023a. Ten priority questions for increasing the consistency and success in hatchery production of the European flat oyster for habitat restoration. *Aquat. Living Resour.* 36, 29. <https://doi.org/10.1051/alr/2023025>

zu Ermgassen, P.S.E., Bonačić, K., Boudry, P., Bromley, C.A., Cameron, T.C., Colsoul, B., Coolen, J.W.P., Frankić, A., Hancock, B., van der Have, T.M., Holbrook, Z., Kamermans, P., Laugen, A.T., Nevejan, N., Pogoda, B., Pouvreau, S., Preston, J., Ranger, C.J., Sanderson, W.G., Sas, H., Strand, Å., Sutherland, W.J., 2020. Forty questions of importance to the policy and practice of native oyster reef restoration in Europe. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 30, 2038–2049. <https://doi.org/10.1002/aqc.3462>

zu Ermgassen, P.S.E., Strand, Å., Bakker, N., Blanco, A., Bonačić, K., Boudry, P., Brundu, G., Cameron, T.C., Connellan, I., Costa, F. da, Debney, A., Fabra, M., Frankic, A., Gamble, C., Gray, M.W., Helmer, L., Holbrook, Z., Hugh-Jones, T., Kamermans, P., Magnesen, T., Nielsen, P., Preston, J., Ranger, C.J., Saurel, C., Smyth, D., Stechele, B., Theodorou, J.A., Colsoul, B., 2023b. Overcoming *Ostrea edulis* seed production limitations to meet ecosystem restoration demands in the UN decade on restoration. *Aquat. Living Resour.* 36, 16. <https://doi.org/10.1051/alr/2023012>

Zweifel, U.L., Hagstrom, A., 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2180–2185. <https://doi.org/10.1128/aem.61.6.2180-2185.1995>

1 **ARTICLE EN PRÉPARATION**

2

3 **The *Pseudoalteromonas* paradox: when adding *Pseudoalteromonas* strains in** 4 **cultivation of the flat oyster *Ostrea edulis* reduces biofilm biovolume without** 5 **altering its richness and diversity**

6 Garance Leroy^{†1}, Leila Parizadeh^{†*1} Héléna Cuny¹, Clément Offret¹, Martin Protat², Alexis
7 Bazire³, Sophie Rodrigues³, Patrick Le Chevalier¹, Benjamin Brillet¹, Camille Jégou¹, Ricardo
8 Gonzalez-Araya³, Yannick Fleury^{1°}

9 ¹Univ Brest, Univ Bretagne Sud, CNRS EMR 6076, IUEM, LBCM, F-29000 Quimper, France.

10 ²Comité Régional de la Conchyliculture de Bretagne-Nord (CRC BN), F-29678 Morlaix, France.

11 ³Univ Bretagne Sud, CNRS EMR 6076, IUEM, LBCM, F-56100 Lorient, France.

12 †: The authors have contributed equally to this work.

13 *Present address: Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, Laboratoire LIENSs, F-17031 La Rochelle, France.

14 °For correspondence. Address : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, 6 rue de l'Université, 29334, Quimper
15 CEDEX. E-mail: yannick.fleury@univ-brest.fr. Tel +33 2 98 64 19 34.

16 **Acknowledgements**

17 This work has been supported by the project 'Développement de Probiotiques Innovants
18 pour l'Aquaculture MARiNe' (PAQMAN) financed by the program of European Fund for Maritime
19 Affairs and Fisheries (FEAMP).

20 **Abstract**

21 Biofilms in aquaculture tanks pose significant challenges for the aquaculture field since they
22 complicate cleaning processes and may harbour bacterial pathogens. We investigated the
23 effects of four different *Pseudoalteromonas* strains and a control condition on the cultivation of
24 the flat oyster, *Ostrea edulis*, with a particular focus on biofilm biovolume within tanks. None of
25 these treatments resulted in excessive mortality among the flat oysters. The biofilms formed
26 during the experiment were analyzed using (i) confocal laser scanning microscopy to observe
27 the biovolume and thickness of the biofilm and (ii) 16S metabarcoding to characterize the
28 bacterial communities in both the biofilm and seawater. Differences in the structure of bacterial
29 communities between biofilm and seawater samples were highlighted and a significant
30 evolution of bacterial communities was observed throughout the sexual maturation period of
31 the flat oyster. β -diversity analyses demonstrated that each *Pseudoalteromonas* strain used for

32 supplementation had a specific influence on microbial communities. However, all
33 *Pseudoalteromonas* strains significantly reduced the biofilm biovolume without decreasing the
34 richness or diversity of the resident bacterial communities. Therefore, we described a
35 *Pseudoalteromonas* paradox in oyster cultivation, whereby these strains reduce biofilm
36 biovolume while maintaining microbial diversity and richness. This finding suggests that
37 *Pseudoalteromonas* strains are promising additives or probiotics for aquaculture, offering
38 benefits such as reduced cleaning time and costs, and decreased biocide use.

39 Keywords: *Pseudoalteromonas*; biofilms; microbiota; *Ostrea edulis*; aquaculture.

40 1. Introduction

41 One of the main challenges in coming decades will consist of feeding 9 billion people by 2050
42 in a context of global climate change which is recognized as a fundamental threat to the security
43 of the food supply (“COP21,” 2015). According to the FAO, aquaculture will play a strategic role
44 in producing high-quality food, as well as ensuring economically and socially sustainable
45 development (Petrosillo *et al.*, 2023). In 2022, global fishery and aquaculture production
46 reached an unprecedented volume of 223.2 million tons (FAO, 2024d). In France, shellfish
47 farming is the most common form of aquaculture with an oyster production of 80 943 tons in
48 2021 (FranceAgriMer, 2023). However, in recent years, aquaculture has been negatively
49 affected by mortality events, resulting from anthropogenic factors, such as global warming
50 (Okon *et al.*, 2023), the use of traditional breeding techniques, genetic selection (El-Saadony *et*
51 *al.*, 2021; Martínez Cruz *et al.*, 2012) as well as microbial diseases (Yang *et al.*, 2021). Bacterial
52 diseases cause massive mortalities among vertebrates and invertebrates, responsible for
53 considerable economic losses in aquaculture. To remedy this, antibiotics are widely used in
54 many countries, as an attempt to limit the economic risks associated with bacterial infections
55 (Y. Li *et al.*, 2023). The use of antibiotics is nonetheless associated with the emergence of
56 resistant bacteria (Ghori *et al.*, 2022) which is one of the greatest threats to global health. It is
57 therefore essential to limit or even eradicate the use of antibiotics in favor of natural alternatives
58 such as probiotics (Pereira *et al.*, 2022). Biofilms on aquaculture systems like tank walls can also
59 act as a reservoir for pathogenic microorganisms such as *Vibrio* spp. (Cholewińska *et al.*, 2022).
60 Moreover, the biofilms formed within aquaculture tanks appear to exacerbate the phenomenon
61 of antibiotic resistance as they persist and lead to horizontal transfers of antimicrobial resistance

62 genes (Arunkumar *et al.*, 2020). Biofilm bacterial communities seem to play a key role in the
63 persistence of pathogens in oyster hatcheries (Preena *et al.*, 2020; Schar *et al.*, 2021).
64 Antibiofilm strategies are currently under development to limit the risks associated with
65 pathogenic bacteria. This can be achieved by modifying abiotic surfaces through antimicrobial
66 peptide coating (Di Somma *et al.*, 2020), modulating communication pathways with quorum
67 sensing inhibitors (Caudal *et al.*, 2023; Rutherford *et al.*, 2011), using dietary supplements such
68 as phytogetic additives (Ahmadifar *et al.*, 2021) or using probiotics (Abdel-Latif *et al.*, 2023).
69 Some of the probiotics currently used and tested in aquaculture are lactic acid bacteria, *Bacillus*
70 *sp.*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* or
71 *Pseudoalteromonas sp.* (Banu *et al.*, 2020; Devi *et al.*, 2022). These probiotics are mainly used
72 to control disease, boost immune response, and provide nutritional and enzymatic
73 contributions, and could also improve water quality. In this context, marine bacteria belonging
74 to the genus *Pseudoalteromonas* are well-known for their biotechnological potential, notably
75 for their ability to produce antimicrobial (Offret *et al.*, 2016) and antibiofilm metabolites
76 (Jouault *et al.*, 2020). Previous studies led to the isolation of two bacteria from oyster
77 hemolymph, both belonging to the genus *Pseudoalteromonas* (Defer *et al.*, 2013; Cuny, 2021).
78 They were identified as *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* hCg-42 and *Pseudoalteromonas*
79 *ostreae* hOe-125. Both strains produce cationic cyclolipopeptides with *in vitro* antimicrobial
80 activity against Gram-negative bacteria (Offret *et al.*, 2022). Another *Pseudoalteromonas* strain
81 named *Pseudoalteromonas sp.* 3J6, isolated from glass sides immersed in seawater, was used
82 for its capability to inhibit *in vitro* the biofilm development of various pathogenic bacteria,
83 including *Vibrio spp.* (Rodrigues *et al.*, 2015). In this study, we investigated, for the first time,
84 the *in vivo* antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* strains hCg-42, hOe-125 and 3J6 using
85 glass slides immersed in the tanks of flat oysters *Ostrea edulis* with or without weekly bacterial
86 treatment for 120 consecutive days. The *Pseudoalteromonas* type strain, *Pseudoalteromonas*
87 *rhizosphaerae* RA15^T (Navarro-Torre *et al.*, 2020) was used as a biological control. The impact
88 of *Pseudoalteromonas* probiotic candidates on biofilm biovolume was monitored over 4 months
89 using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). In addition, we assessed the bacterial
90 communities observed in the presence/absence of *Pseudoalteromonas* strains using a
91 metabarcoding approach targeting the 16S rDNA gene.

92 2. Material & methods

93 2.1. Bacterial strains and growth conditions

94 *Pseudoalteromonas* strains hCg-42, hOe-125 and 3J6 were selected to evaluate their
95 antibiofilm activities *in vivo*. The *Pseudoalteromonas* hCg-42 and hOe-125 strains were isolated
96 in France from the hemolymph of healthy wild bivalves, *Magallena gigas* and *Ostrea edulis*,
97 respectively (Cuny et al., 2021; Defer et al., 2013b). The *Pseudoalteromonas* 3J6 strain was
98 isolated from a glass slide immersed in seawater at a depth of 1 meter for 3 or 6 hours in the
99 Morbihan Gulf in France (Grasland *et al.*, 2003). *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* RA15^T was
100 used as a control strain (Navarro-Torre *et al.*, 2020). The selected strains were cultivated in
101 Marine Broth (MB) medium (Difco™ 2216) at 18°C under agitation at 100 rpm for 48 h.

102 2.2. Preparation of *Pseudoalteromonas* suspensions

103 *Pseudoalteromonas* strains were cultivated from one colony in 200mL Erlenmeyer flasks
104 containing 20mL of MB, under stirring at 100rpm for 48h, to yield pre-cultures. These were used
105 to inoculate 1L of MB medium poured into 2L Erlenmeyer flasks, which were also incubated for
106 48h under stirring. First, the bacterial cultures were centrifuged at 7000g for 15 min and the
107 culture supernatant was discarded. Next, the cellular pellet was resuspended in a 3% sterile Sea
108 Salts solution and then centrifuged at 7000g for 15 min. This washing step was performed twice.
109 Finally, the bacterial cells were suspended in a 3% sterile Sea Salts solution. The bacterial
110 concentration of the *Pseudoalteromonas* suspensions was determined by bacterial
111 enumeration on MB agar plates. Hence, the quantity of suspensions poured in tanks during the
112 experiments was adjusted to reach a 10⁶ CFU/mL concentration in the tanks during the
113 balneations.

114 2.3. Biological samples

115 Three-year-old flat oysters (*Ostrea edulis* (L.), n=650, length=65 to 70 mm) were sampled
116 from the roadstead of Brest (Brittany, France). They were then transferred into an experimental
117 aquaculture platform (CRCBN, Lampaul-Plouarzel). Oysters were acclimated to the
118 experimental temperature (19°C) by gradually increasing the temperature for 15 days. During
119 this period, oysters were maintained in flow-through tanks and fed with a mixture of four

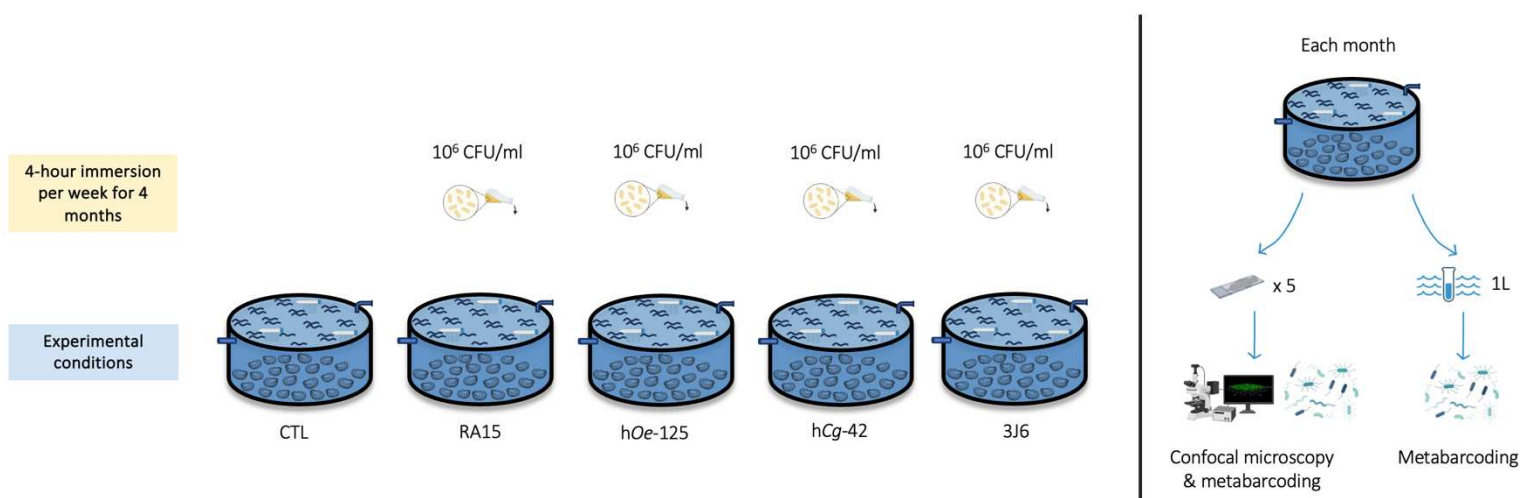
120 phytoplanktonic species: *Cylindrotheca gracilis*, *Rhodomonas salina*, *Conticriba weissflogii* and
121 *Skeletonema marinoi*.

122 2.4. Experimental design

123 After 2 weeks of acclimation, flat oysters (n=100 per experimental condition) were
124 distributed homogeneously in flow-through 300L breeding tanks containing 100L of seawater
125 (SW) maintained at 19°C. All tanks were aerated, and the seawater was replenished by 20%
126 every hour. Balneation of oysters with *Pseudoalteromonas* strains (1.10⁶ CFU/mL) was
127 performed during 4h (no seawater renewal) once a week from December 2022 to March 2023
128 (Figure 1). Five experimental conditions were undertaken using the *Pseudoalteromonas* strains
129 RA15^T, hOe-125, hCg-42 or 3J6, and a control condition consisting of the sterile Sea Salts
130 solution. To investigate the effects of *Pseudoalteromonas* strains on biofilm biovolume,
131 microscope glass slides (76x26mm, MGF) were immersed vertically in each tank for each
132 condition (30 glass slides/condition).

133 2.5. Sampling

134 Biofilm and Sea Water (SW) samples were collected throughout the 4-month experiments.
135 Every month, a total of five glass slides and 2L of SW were sampled in each tank for analyses.
136 One side of the glass slide was retrieved using a Cell Scraper (Biologix Europe, Germany) and
137 the other side used for CLSM analysis. Seawater samples were filtered through a 0.22µm
138 polycarbonate filter (Whatman, USA). Filters and scraped biofilms were stored at -80°C prior to
139 DNA extraction.



140 **Figure 1. Experimental design of the flat oysters' maturation at CRC Bretagne Nord**

141 2.6. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

142 2.6.1. Glass slides treatment and observation

143 Biofilm observations were performed with a CLSM microscope (Zeiss, LSM710) using a 63x
144 oil immersion objective. Glass slides were rinsed twice in 3% sterile Sea Salts solution and then
145 dried in the dark at room temperature for 15 minutes. Subsequently, glass slides were stained
146 with 50µL of 5µM SYTO9 green (Invitrogen – Life Science Technology) and incubated for 5min
147 at room temperature in the dark. SYTO9 green was excited using a 488-nm filter and
148 fluorescence emission was detected between 500 and 550nm. For the visualization of three-
149 dimensional (3D) structure, images were acquired every micrometer across the entire depth of
150 the biofilm. At least five random images were taken from each of the five replicate glass slides,
151 yielding a total of 25 image stacks per sampling day. 3D images were obtained and analyzed
152 using Zeiss Zen Blue 2 lite software (Zeiss, Germany). Biofilm biovolume was determined with
153 the COMSTAT software (Heydorn *et al.*, 2000).

154 2.6.2. Statistical analyses

155 Statistical analyses were performed using RStudio (v2023.12.1). A non-parametric Kruskal-
156 Wallis test was conducted, followed by the Dunn's multiple comparison test to assess statistical
157 differences.

158 2.7. 16S metabarcoding analyses

159 2.7.1. gDNA extraction and sequencing

160 Bacterial genomic DNA from biofilm samples and filters was extracted using Qiagen
161 PowerBiofilm and PowerWater kits, respectively, in accordance with the supplier's instructions.
162 Samples were sent for sequencing and analysis at Genome Québec Innovation Centre
163 (Montréal, QC, Canada). The amplicon libraries for each sample were generated using the
164 forward primer 341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and reverse primer 805R 5'-
165 GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Herlemann *et al.*, 2011b). These primers target the V3-V4
166 region of the 16S rDNA amplicons. Sequencing was then performed using Illumina MiSeq PE300
167 (10M reads per sample).

168 2.7.2. Microbiota analyses

169 The fastq files resulting from these analyses were then processed using the SAMBA pipeline
170 v4.0.0 (Noël *et al.*, 2021). SAMBA is a Standardized and Automated Metabarcoding Analysis
171 Workflow developed by SeBiMER that uses Nextflow (Di Tommaso *et al.*, 2017) to enable a
172 reproducible computational workflow. Primers were removed from the obtained sequences
173 using Cutadapt (Martin, 2011) with a 1% error rate. The size of expected amplicons was set to
174 464 base pairs in the pipeline configuration. Data was processed with QIIME 2 (v2022.11 ;
175 Bolyen *et al.*, 2019) and DADA² (v1.26.0 ; Callahan *et al.*, 2016) to assess the quality of the
176 sequences, trim and filter the obtained ASVs as well as removing potential PCR chimeras.

177 2.7.3. Statistical analyses

178 The α -diversity analyses were conducted on RStudio (v2023.12.1.402 ; (Posit team, 2024)
179 using the plot_richness function from the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). The
180 Chao1, Shannon, and Inverse Simpson indices were calculated to assess the richness and
181 diversity of samples under different treatments (exposures to bacterial strains within various
182 tanks). An analysis of variance (ANOVA) was performed on these results using the anova_test
183 function from the rstatix package (Kassambara, 2020). Beforehand, the normality and the
184 homogeneity of variances were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene statistical tests
185 from the package rstatix. Regarding relative abundance analysis, only ASVs accounting for 99.6%
186 of the total abundance in the samples were kept for analysis. The data were normalized using
187 the Cumulative Sum Scaling method (CSS ; Paulson *et al.*, 2013) to allow comparison between
188 samples in the context of β -diversity analyses. A graphical representation (Principal Coordinate
189 Analysis- PCoA) was generated using Bray-Curtis distance to observe differences between
190 bacterial communities. The influence of the different sampling groups (seawater and biofilm)
191 and various conditions was assessed through a permutation-based analysis of variance
192 (PERMANOVA) using the adonis2 function from the vegan package (Oksanen *et al.*, 2015).
193 Differential abundance was studied with the MicrobiotaProcess package (Xu *et al.*, 2023).

194 3. Results

195 3.1. Sequencing data information

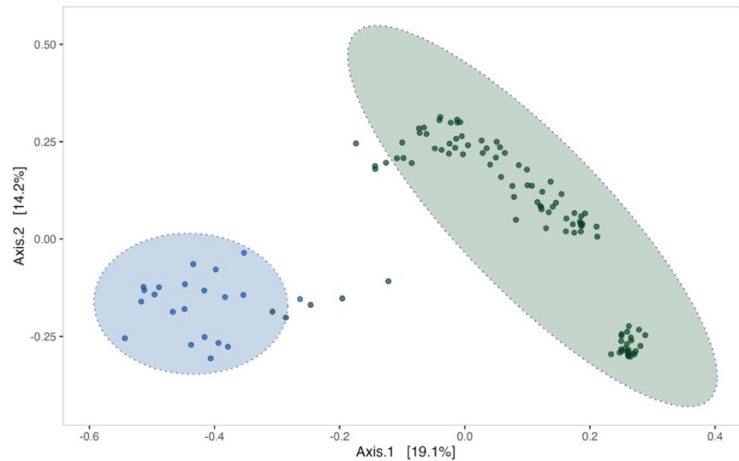
196 After demultiplexing, 6 838 523 sequence reads were used for analyses. A mean of 53 848
197 sequences per sample (n=120) was observed. From these sequence reads, 13 383 ASVs were
198 inferred via the SAMBA pipeline and 7069 remained after clustering (52.8%). Biofilm samples
199 (6523 ASVs) and seawater samples (1455 ASVs) shared 909 identical ASVs. Rarefaction curves
200 showed that the number of ASVs reach a plateau for a low sampling depth (Supplementary
201 Data, Figure S1). Hence, the sequencing depth can be regarded as sufficient to fully explore the
202 diversity of ASVs.

203 3.2. Bacterial structuration of oyster environment

204 3.2.1. Divergent community structure between seawater and biofilm samples

205 During the experimentation, bacterial communities from biofilms showed significantly
206 higher richness and diversity than those from seawater (Observed richness ANOVA test, p-value
207 < 0.001; Shannon index ANOVA test, p-value < 0.001; Supplementary Data, Table S1). Indeed,
208 343 ± 76 ASVs were found in biofilm samples against 203 ± 73 ASVs for seawater samples
209 whatever the conditions (Supplementary Data, Figure S2). Regarding diversity, the Simpson
210 Inverse index was 67.7 ± 30.5 and 27.9 ± 11.55 for biofilm and seawater samples, respectively.
211 β -diversity analyses (Figure 2) also showed that the shaping of microbial communities
212 significantly differed according to the sample origin (Biofilm vs seawater, PERMANOVA test, $R^2=$
213 0.1556 , $F=21.744$, p-value=0.001).

214



215

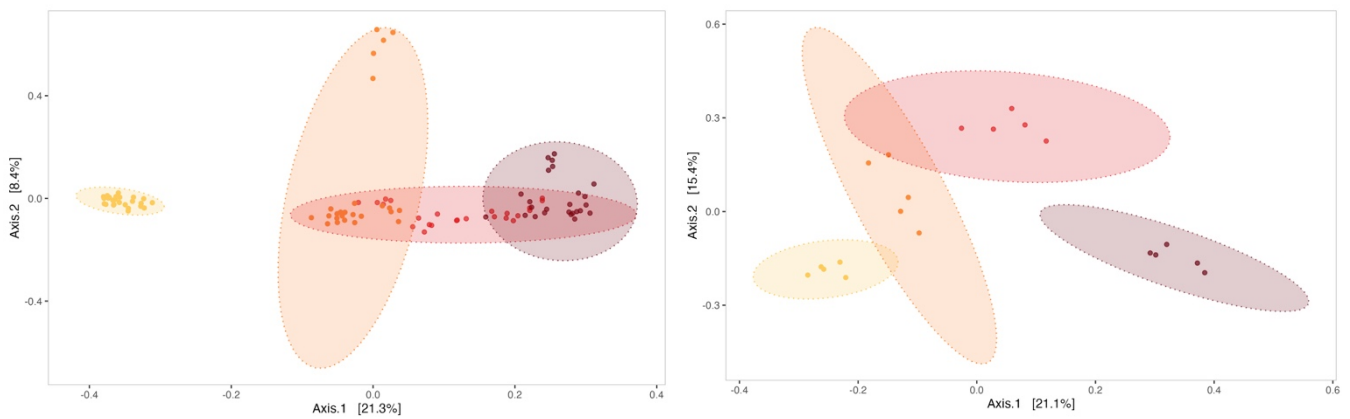
216 **Figure 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) using Bray-Curtis distance for bacterial communities**
 217 **from biofilm (green) or seawater (blue). Ellipses are drawn at a 95% confidence level for a multivariate t-**
 218 **distribution.**

219

220 3.2.2. Temporal dynamics of bacterial environmental communities

221 The evolution of biofilms formed within the tanks was measured over the 4-month sexual
 222 maturation of the flat oyster *Ostrea edulis*. Bacterial communities from biofilm were
 223 significantly enriched with new ASVs throughout the maturation (Observed richness ANOVA
 224 test, p-value < 0.001; Supplementary Data, Figure S3), while no significant enrichment was
 225 observed for seawater samples. For example, the bacterial community from the biofilm formed
 226 in the experimental control tank consisted of 267 ± 35 ASVs in the first month of the experiment,
 227 which increased to 419 ± 47 ASVs in the fourth month. Enrichment was observed for bacterial
 228 communities of all biofilm samples, treated or not with *Pseudoalteromonas* strains. On the
 229 other hand, β -diversity analyses have revealed a significant shift in the structure of microbial
 230 communities between all sampling times (PERMANOVA test, $R^2=0.30$, $F=13.54$, p-value= 0.001).
 231 This shifting appeared for both biofilm and seawater samples (Figure 3).

232



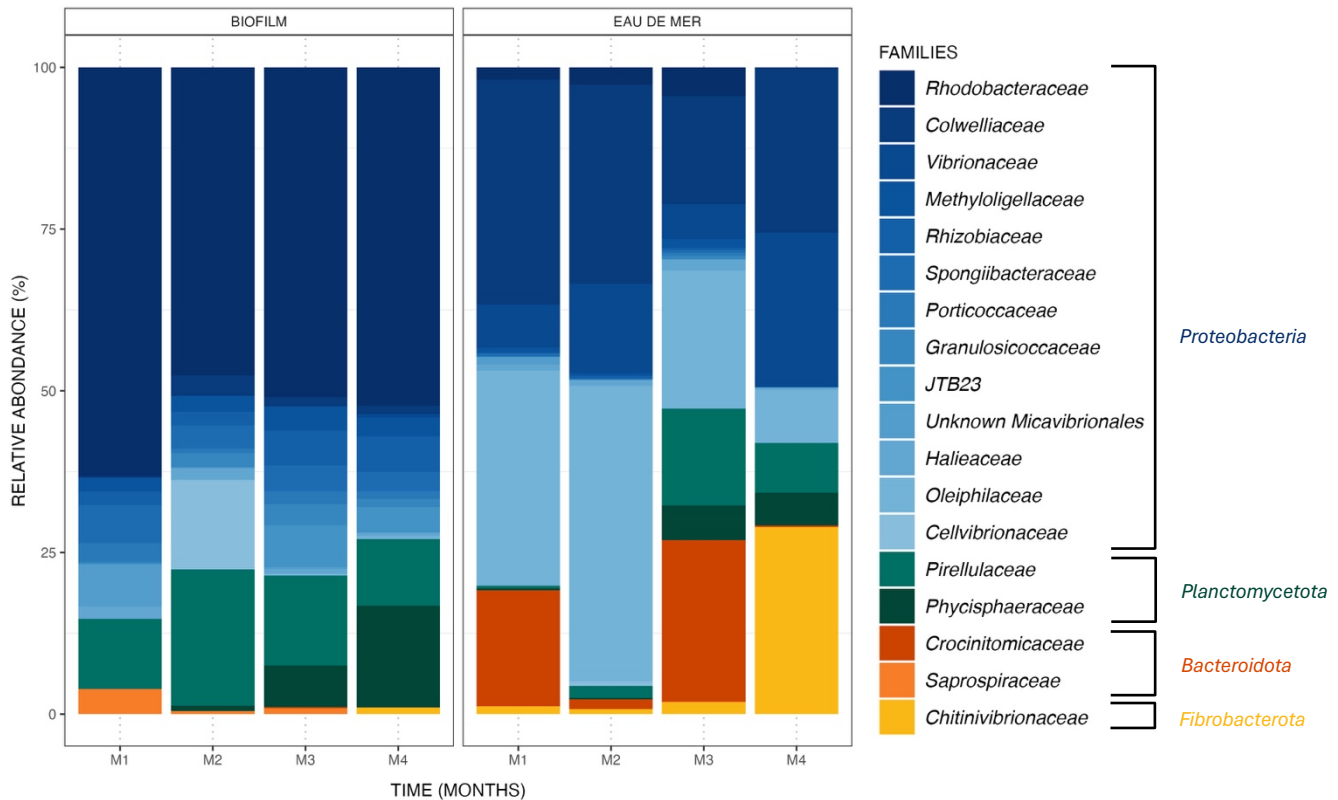
233 **Figure 3. PCoA of time effect on biofilm (A) and seawater (B) bacterial communities (M1 = yellow, M2**
 234 **= orange, M3 = light red, M4 = dark red). Ellipses were drawn at a 99% confidence level for a multivariate t-**
 235 **distribution.**

236

237 3.2.3. Differential taxonomic composition in biofilm versus seawater samples

238 Bacterial communities differed between biofilm and seawater samples, with differences in
 239 (1) the nature of the ASV observed and (2) their relative abundances. ASV (relative abundances
 240 > 0.4% of total sequences) found in biofilm and seawater (Figure 4) belonged to four phyla:
 241 *Proteobacteria*, *Planctomycoteta*, *Bacteroidota* and *Fibrobacterota*. ASVs affiliated to the phyla
 242 *Proteobacteria* were the most abundant in the bacterial communities of all samples from
 243 biofilm (78%) and seawater (71%). It is also noteworthy to observe that the phyla *Bacteroidota*
 244 and *Fibrobacterota* were found in seawater at higher relative abundances (11% and 8%,
 245 respectively) than in biofilms (1% and 0.2%). The difference in relative abundance between
 246 biofilm and seawater was hence observed at the phylum level, and it was also noted at the
 247 family level. For example, the *Rhodobacteraceae* family is dominant in biofilm bacterial
 248 communities, with an average relative abundance of 53%, all treatments combined (control
 249 included), which is not the case for seawater samples.

250



251
252
253
254

Figure 4. Relative abundance (%) of the major ASVs found in biofilm and seawater samples combining all experimental conditions. ASVs with relative abundance over 99.6% are represented at the family taxonomic rank.

255

3.2.4. Differential taxonomic abundances throughout the 4-month experiment

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

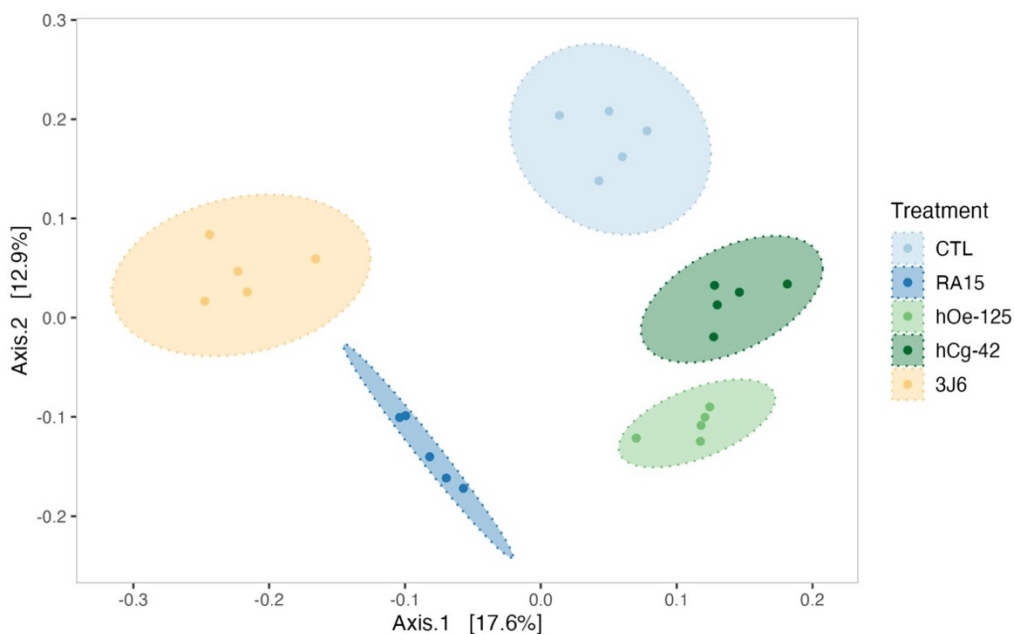
270

Changes in taxonomic relative abundances were also observed within biofilm and seawater microbial communities for each sampling month. A gradual increase of the relative abundance of the family *Phycisphaeraceae* amongst biofilm samples was noticed, with a 0.02%, 0.8%, 6.4% and 15.7% relative abundance score throughout the 4-month experiment. A brutal increase of the relative abundance of the family *Chitinivibrionaceae* (28.9%) was observed in seawater samples at month 4 (M4) (Figure 4). Differential abundance analysis was performed to obtain further details on biofilm bacterial communities structuration. Using a LDA score (Supplementary Data, Figure S4), the taxa contributing to the monthly evolution of biofilm bacterial communities were highlighted. Most specific taxa belonged either to the first or the fourth month of the experiment, underlining the fact that these months were the most dissimilar. These observations are consistent with the conclusions drawn from Figure 3 and Figure 4. The *Rhodobacteraceae* family was associated with the first month of the experiment with an elevated LDA score of 4.44. Other taxa were linked to the fourth month: the *Acidimicrobiia* class, the *Microtrichales* order and the *Actinobacteriota* phylum, with a LDA score of 3.90.

271 3.3. Modulation of biofilm structure induced by *Pseudoalteromonas* supplementation

272 3.3.1. Impact on microbial communities

273 The microbial communities of all biofilms formed under different conditions (with or without
274 the addition of *Pseudoalteromonas* strains) depended on the sampling month and were also
275 affected by the *Pseudoalteromonas* treatment. β -diversity analyses indicated a modulation of
276 biofilms microbial communities by *Pseudoalteromonas* strains treatment as early as the first
277 month of the experiment (PERMANOVA test, $R^2=0.455$, $F=4.17$, $p\text{-value}=0.001$). Indeed, 5
278 distinct ellipses represented each treatment during analysis (Figure 5).



279

280 **Figure 5. Principal Coordinate Analysis (PCoA) using Bray-Curtis distance for biofilms formed after the**
281 **first month of the experiment. Ellipses are drawn at a 95% confidence level for a multivariate t-distribution.**

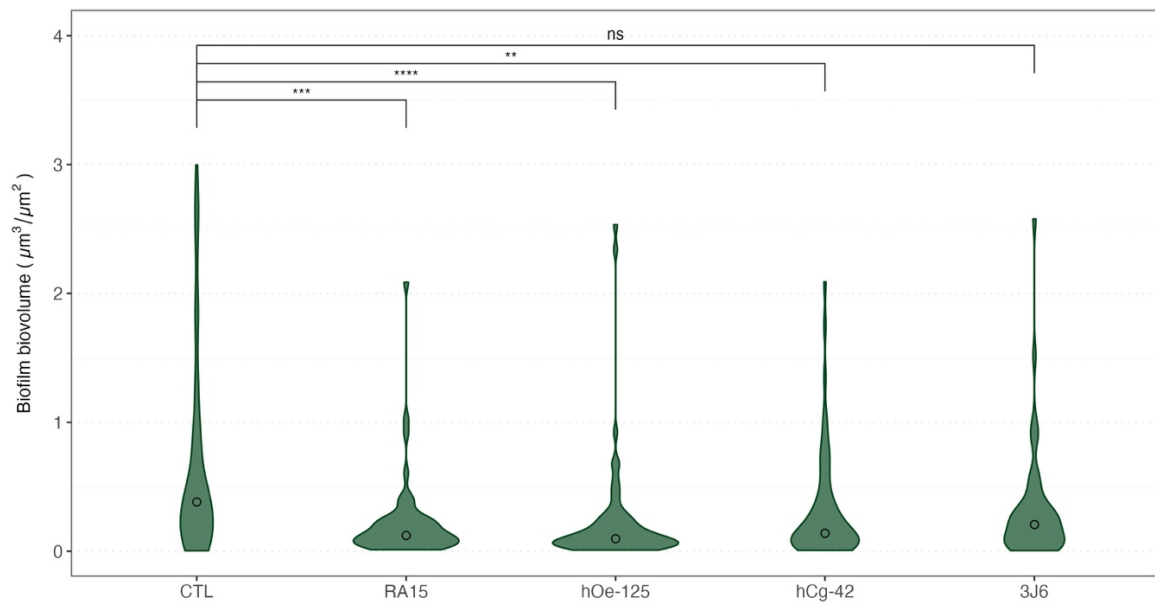
282

283 The effect of *Pseudoalteromonas* treatment on the bacterial communities of biofilm was
284 evidenced throughout the maturation with a significant PERMANOVA analysis for each month
285 (Supplementary Data, Table S2). Differential abundance analysis was once again performed to
286 assess biomarkers linked to each treatment. Results (Supplementary Data; Figure S5) showed
287 that most biomarkers were linked to the 3J6 treatment. *Planctomycetota* were linked to the 3J6
288 strain (4.49) as well as the *Pirellulaceae* family (4.34). The hCg-42 treatment seemed to contain
289 a higher proportion of *Proteobacteria* with a mean LDA score of 4.54. The OM190 clade, part
290 of the *Planctomycoteta* phylum, was associated with the RA15 experimental condition with a

291 mean LDA score of 3.68. The hOe-125 strain and control conditions did not show any specific
292 biomarker in our analysis.

293 3.3.2. Biofilm biovolumes exposed to *Pseudoalteromonas* strains

294 The biovolume of the biofilm formed during the maturation was also recorded each month.
295 The weekly balneation with the various *Pseudoalteromonas* strains resulted in a significant
296 reduction of the biofilm biovolume (Figure 6) throughout the oyster maturation.



297

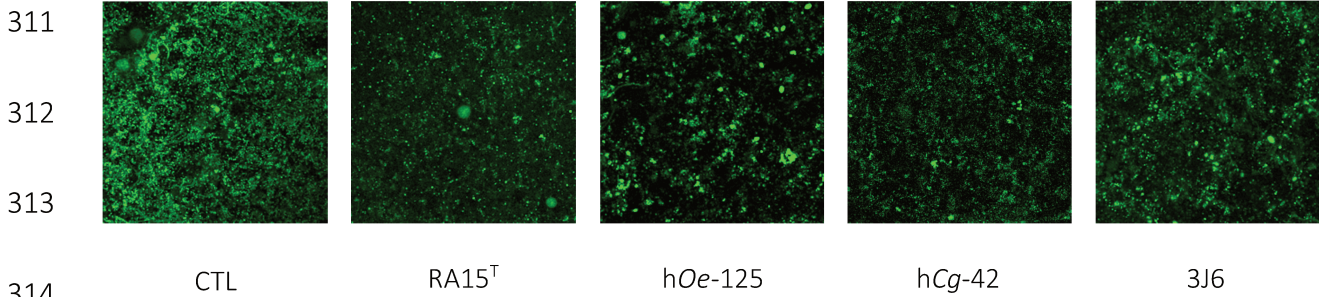
298 **Figure 6. Violin boxplot of the biovolume of the biofilms formed depending on the treatment for all**
299 **sampling times. Medians values were indicated with a circle for each boxplot. A non-parametric Kruskal-**
300 **Wallis test was conducted, followed by post-hoc Dunn testing, the results of which are depicted in this**
301 **figure. Significant codes: p-value = [0, 0.0001] (****), p-value = [0.0001, 0.001], p-value = [0.001, 0.01] (**).**

302

303 Indeed, as an average for the whole experimentation, a median biovolume value of $0.776 \pm$
304 $1.145 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ is obtained for the control condition. The biovolume was significantly reduced
305 for three *Pseudoalteromonas* strains treatments: $0.221 \pm 0.331 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (RA15), 0.230 ± 0.429
306 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (hOe-125) and $0.310 \pm 0.409 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (hCg-42). However, the 3J6 strain treatment
307 showed a non-significant biovolume reduction with a mean value of $0.328 \pm 0.459 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$.
308 These analyses were determined from biofilm images taken by CLSM (Figure 7).

309

310



315 **Figure 7. Pictures of biofilms formed in the different experimental conditions analyzed by CLSM.**

316 4. Discussion

317 We investigated the effects of weekly bathing with different strains of *Pseudoalteromonas*
318 on environmental bacterial communities and biofilm biovolume during a complete sexual
319 maturation cycle (4 months) of flat oysters, *Ostrea edulis*. Therefore, tank seawater and biofilm
320 bacterial communities were analyzed monthly using 16S metabarcoding.

321 4.1. Biofilm vs. Seawater: Unveiling the Differences in Bacterial Communities

322 Marine biofilms formed during the maturation of the flat oyster were primarily composed of
323 bacterial communities belonging to the phyla *Proteobacteria* and, to a lesser extent,
324 *Planctomycetota*. The phylum *Proteobacteria* is indeed ubiquitous and stands as the
325 predominant phylum in marine biofilms (Edwards et al., 2010; Salta et al., 2013; Wietz et al.,
326 2009b). ASVs affiliated with the phylum *Planctomycetota* were also commonly identified in
327 bacterial communities of biofilms but in lower relative abundances (Padayhag *et al.*, 2023;
328 Roquigny *et al.*, 2021). Seawater bacterial communities in aquaculture are also dominated by
329 the phylum *Proteobacteria* and more specifically by the classes *Alphaproteobacteria* and
330 *Gammaproteobacteria*. The phylum *Proteobacteria* precedes *Bacteroidota* in seawater
331 bacterial communities, which are also the main phyla observed in several studies (Callac *et al.*,
332 2022; Lu *et al.*, 2024).

333 α - and β -diversity analyses revealed dissimilarities between biofilm and seawater bacterial
334 communities. Bacterial communities associated with biofilms showed greater richness and
335 diversity than the communities observed in seawater (α -diversity). Biofilm bacterial
336 communities also presented unique community structuring dynamics (β -diversity). These
337 differences in bacterial diversities have already been observed from biofilms originated in

338 various aquatic environments, such as seawater, freshwater, and aquaculture hatcheries (Briand
339 *et al.*, 2022; Malazarte *et al.*, 2022; Remple *et al.*, 2021).

340 All of these dissimilarities could be explained by selective pressure, different environmental
341 factors (Remple *et al.*, 2021) and the ability of bacterial communities to form biofilms (Sharma
342 *et al.*, 2023). Seawater and biofilm bacterial communities are indeed influenced by
343 environmental factors such as temperature, dissolved oxygen, light intensity and salinity (Salta
344 *et al.*, 2013; Tsuchiya *et al.*, 2011). Interactions amongst microorganisms within the biofilm
345 matrix also seem to facilitate metabolic cooperation which may lead to a more stable
346 environment for bacterial communities (Dang and Lovell, 2002).

347 4.2. Temporal evolution of biofilm and seawater bacterial communities

348 Temporal dynamics were observed in the structuring of bacterial communities in seawater
349 and biofilms. Such dynamics have already been described in the study of aquaculture tank
350 seawater of the blue shrimp larvae, *Penaeus stylirostris*, with significant daily variations (Callac
351 *et al.*, 2022). Moreover, seasonal impacts on the bacterial communities in the seawater used
352 to supply aquaculture tanks could explain the dynamics observed in our experiment. Indeed,
353 certain bacterial communities such as the class *Flavobacteria* can exhibit high abundances
354 during periods of rapid and dense phytoplankton proliferation (Matsumoto *et al.*, 2021). It was
355 also shown that other communities, *e.g.* the SAR11 clade, are significantly more abundant when
356 there is a low nutrient availability.

357 A modulation of biofilm bacterial community structuring over time has also been observed
358 during the maturation of *Ostrea edulis* as well in open sea environments (Briand *et al.*, 2022)
359 and algaculture tanks (Remple *et al.*, 2021). Biofilms formed during the maturation of *Ostrea*
360 *edulis* showed an increased richness index overtime, corresponding to an increased number of
361 distinct ASVs. However, no significant changes were observed regarding diversity (α -diversity
362 analyses). This observation was consistent with other biofilm bacterial communities studies
363 observing the same phenomenon regarding not only richness but also diversity (Briand *et al.*,
364 2022; Malazarte *et al.*, 2022). Moreover, it appears that environmental biofilms harbored a
365 succession of bacterial communities associated with different stages of biofilm biovolume in

366 marine environments: these variations have been observed over short (Dang and Lovell, 2002)
367 as well as prolonged periods (Briand *et al.*, 2022; Malazarte *et al.*, 2022).

368 4.3. Modulation of biofilm by *Pseudoalteromonas* strains: potential applications

369 The weekly balneation with *Pseudoalteromonas* strains resulted in a significant reduction of
370 biofilm biovolume formed during a 4 month-long sexual maturation of *Ostrea edulis*. Such
371 natural treatments may be advantageous for the aquaculture sector, as biofilm presence
372 remains an ecological and economic issue (Wietz *et al.*, 2009a). This biofilm reduction could
373 have been associated with a significant reduction of specific taxa, resulting in a reduced specific
374 richness and diversity of the bacterial communities. It was indeed observed that bacterial
375 communities structures were impacted by the presence of the strains. However, this
376 structuration was surprisingly not accompanied by a modification of the richness nor diversity
377 of the bacterial communities. Therefore, adding the strains to the tanks did not seem to affect
378 the presence of ASVs belonging to specific phyla or families. One could have expected an action
379 of the strain against specific bacteria, especially against pathogens such as those belonging to
380 the family *Vibrionaceae* which could cause mortality events in aquaculture (Arunkumar *et al.*,
381 2020).

382 By limiting the volume of biofilm formed in the tanks, the use of *Pseudoalteromonas* could
383 be beneficial for the aquaculture sector. In the same way, this biovolume reduction was not
384 associated with a modification of bacterial communities richness and diversity (Luo *et al.*, 2022).
385 It also appeared that biofilm reduction was significant with all *Pseudoalteromonas* strains except
386 *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Furthermore, the antibiofilm activity observed *in vivo* with the
387 three other strains suggests that this reduction is not linked to the use of a specific strain.

388 As the sequencing method does not allow us to discriminate between the species in
389 presence, many hypotheses can be put forward to explain the phenomenon observed. Amongst
390 those hypotheses, one can think of competition with biofilm-forming bacteria for nutrient
391 availability (Dsouza *et al.*, 2024) or quorum quenching ability which can prevent the formation
392 of the biofilm (Brackman *et al.*, 2011). Nevertheless, it is paradoxical to note that the regular
393 addition of bacteria to an oyster farm results in a reduction in the biofilm formed, without
394 altering its richness.

395 5. Conclusion

396 The present study demonstrated that the weekly addition of certain bacteria from the genus
397 *Pseudoalteromonas* significantly reduced biofilm biovolume without affecting the diversity and
398 richness of the biofilm microbial communities. The mechanisms behind this paradox may
399 involve not only the specific strains used but also the host's microbiota, the host itself, or the
400 entire holobiont. Regardless, *Pseudoalteromonas* strains seem to act as biological agents that
401 modify environmental bacterial communities without causing significant mortality. Given the
402 tangible benefits, including reduced cleaning time and costs, and for the environment, through
403 decreased biocide use, these strains could find applications in aquacultures as production
404 additives or even probiotics in aquaculture.

405 6. CRediT authorship contribution statement

406 **Garance Leroy:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Leila**
407 **Parizadeh:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Hélène Cuny:** Methodology,
408 Investigation. **Clément Offret:** Writing – Review & Editing, Formal analysis. **Martin Protat:**
409 Investigation. **Alexis Bazire:** Investigation, Resources. **Sophie Rodrigues:** Investigation,
410 Resources. **Patrick Le Chevalier:** Conceptualization, Funding acquisition. **Benjamin Brillet:**
411 Conceptualization, Funding acquisition. **Camille Jégou:** Writing – Review & Editing, Formal
412 analysis, Validation. **Ricardo Gonzalez-Araya:** Conceptualization, Investigation, Funding
413 acquisition. **Yannick Fleury:** Writing – Review & Editing, Conceptualization, Validation,
414 Supervision, Project administration, Funding acquisition.

415 7. Declaration of competing interest

416 None declared.

417 8. Data statement

418 16S amplicon sequences used for metabarcoding analysis have been made available on the
419 NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession reference: PRJNA1135127.

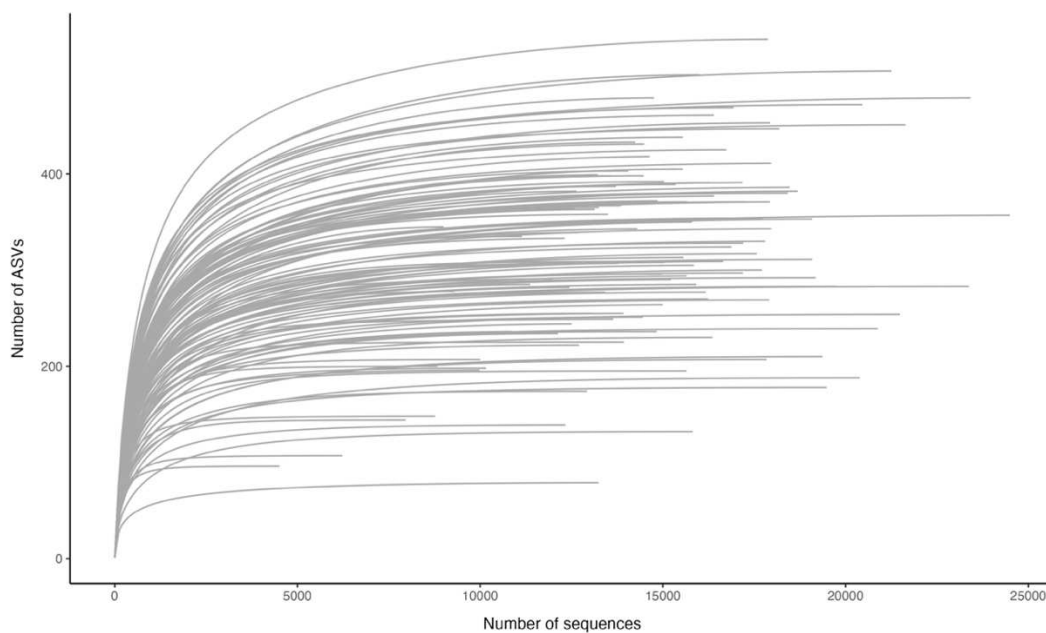
420 **9. Acknowledgements**

421 This work has been supported by the project 'Développement de Probiotiques Innovants
422 pour l'AQuaculture MAriNe' (PAQMAN) financed by the program of European Fund for Maritime
423 Affairs and Fisheries (FEAMP).

424

425 **10. Supplementary data**

426



427

428 **Figure S1. Rarefaction curve of all biofilm and seawater samples (n = 120) used in this study.**

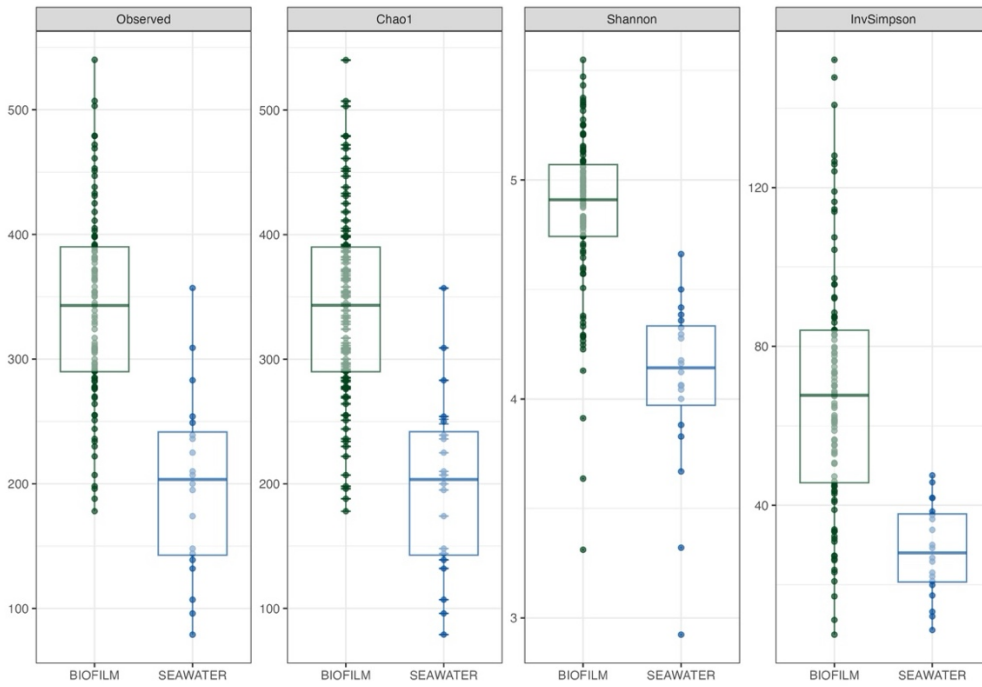
429

430 **Table S17. Analysis of Variance (ANOVA) test comparing sampling groups for different α -diversity measures.**

430

Measure	Effect	DFn	DFd	F	P-value
Observed	Sampling group	1	117	59.35	4.7×10^{-12}
Chao1	-	1	117	59.333	4.73×10^{-12}
Shannon	-	1	117	69.759	1.56×10^{-13}

431

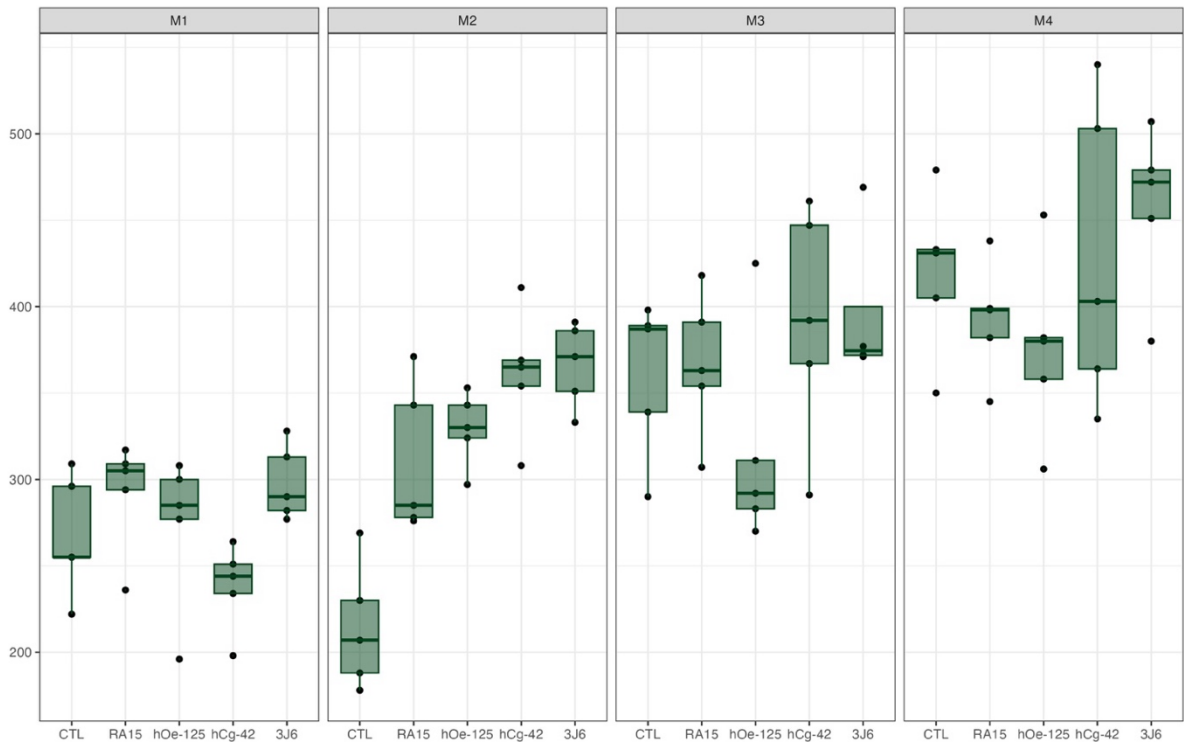


432

433 **Figure S2. α -diversity measures comparing biofilm and seawater samples. The Chao1 index shows a**
434 **good coverage of the samples richness.**

435

436

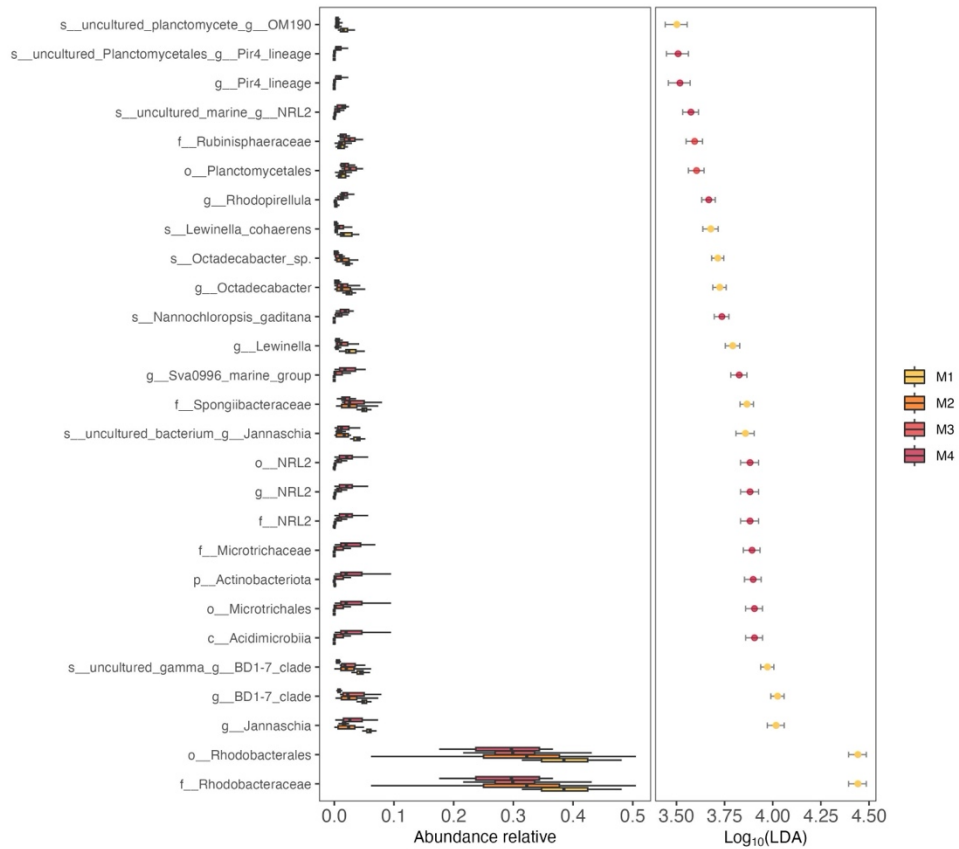


437

438

439

Figure S3. Observed richness in biofilm samples for each month and in all tanks.



440

441

442

443

444

445

Figure S4. LDA analysis displaying biomarkers of each sampling month of biofilms. Firstly, a Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests were applied, filtering the taxa displaying a significant relative abundance score (p -value < 0.01). The LDA score was calculated on the filtered taxa to assess their impact on microbial communities structuration.

Month	Effect	Df	Sum of Sqs	R2	F	P-value
M2	Treatment	4	3.5304	0.67637	10.45	0.001
M3	-	4	2.2200	0.4831	4.4394	0.001
M4	-	4	2.9243	0.54235	5.9255	0.001

446

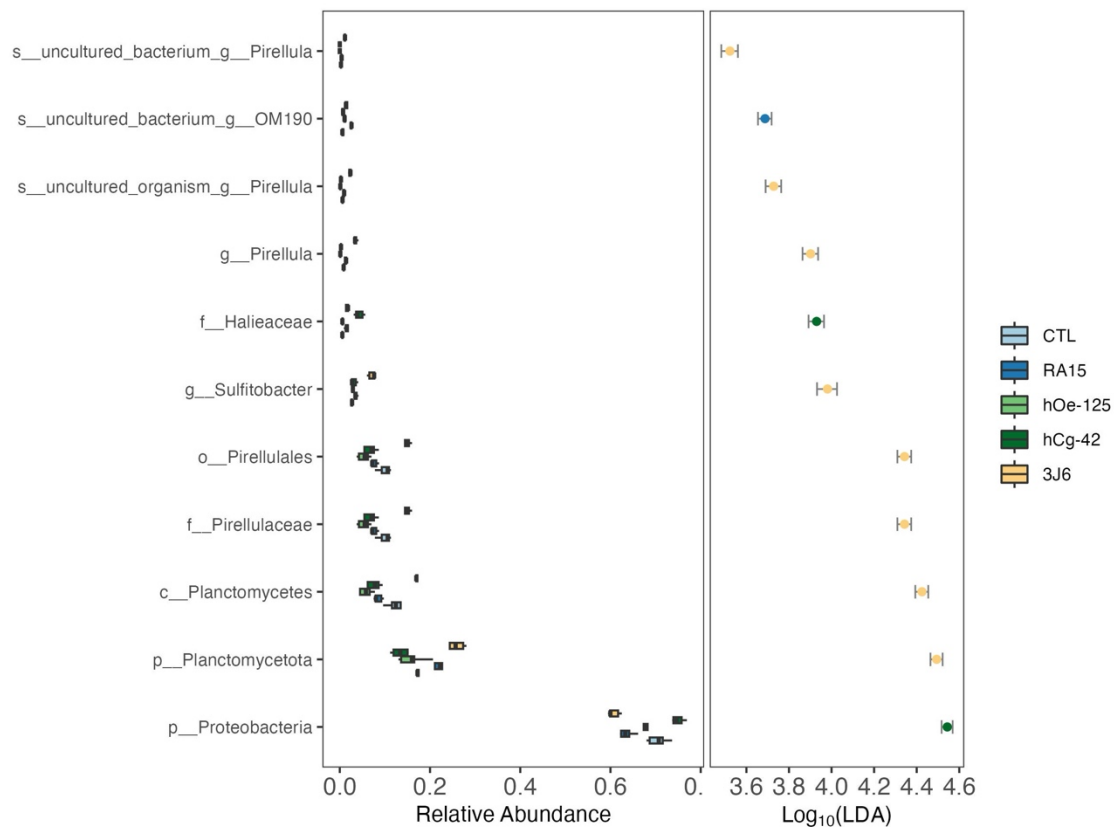
447

448

449

Table S18. Permutational analysis of variance (PERMANOVA) to test the impact of strains on biofilms formed for each month of the experiment using the Bray-Curtis distance. Significant P-values are bolded.

450



451

452 **Figure S5. LDA analysis displaying biomarkers found in biofilms of each treatment in the first month of**
 453 **the experiment. Firstly, Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests were applied, filtering the taxa displaying a**
 454 **significant relative abundance score (p-value < 0.01). The LDA score was calculated on the filtered taxa to**
 455 **assess their impact on microbial communities structuration.**

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466 11. References

- 467 Abdel-Latif, H.M.R. *et al.* (2023) 'A multispecies probiotic modulates growth, digestive enzymes,
468 immunity, hepatic antioxidant activity, and disease resistance of *Pangasianodon hypophthalmus*
469 fingerlings', *Aquaculture*, 563, p. 738948. Available at: [https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738948)
470 948.
- 471 Ahmadifar, E. *et al.* (2021) 'Benefits of Dietary Polyphenols and Polyphenol-Rich Additives to Aquatic
472 Animal Health: An Overview', *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4), pp. 478–511. Available
473 at: <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1818689>.
- 474 Arunkumar, M. *et al.* (2020) 'In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in
475 aquaculture', *Process Biochemistry*, 94, pp. 213–223. Available at: [https://doi.org/10.1016/j.procbio.](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029)
476 2020.04.029.
- 477 Banu, M.R. *et al.* (2020) 'Probiotic yeast enhanced growth performance and disease resistance in
478 freshwater catfish gulsa tengra, *Mystus cavasius*', *Aquaculture Reports*, 16, p. 100237. Available at:
479 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100237>.
- 480 Bolyen, E. *et al.* (2019) 'Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using
481 QIIME 2', *Nature Biotechnology*, 37(8), pp. 852–857. Available at: [https://doi.org/10.1038/s41587-019-](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9)
482 0209-9.
- 483 Brackman, G. *et al.* (2011) 'Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to
484 Antibiotics *In Vitro* and *In Vivo*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), pp. 2655–2661.
485 Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.00045-11>.
- 486 Briand, J.-F. *et al.* (2022) 'Surface Characteristics Together With Environmental Conditions Shape Marine
487 Biofilm Dynamics in Coastal NW Mediterranean Locations', *Frontiers in Marine Science*, 8. Available at:
488 <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.746383>.
- 489 Callac, N. *et al.* (2022) 'Microbiota of the Rearing Water of *Penaeus stylirostris* Larvae Influenced by
490 Lagoon Seawater and Specific Key Microbial Lineages of Larval Stage and Survival', *Microbiology*
491 *Spectrum*, 10(6), pp. e04241-22. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04241-22>.
- 492 Callahan, B.J. *et al.* (2016) 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data',
493 *Nature Methods*, 13(7), pp. 581–583. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- 494 Caudal, F. *et al.* (2023) 'Extracts from Wallis Sponges Inhibit *Vibrio harveyi* Biofilm biovolume',
495 *Microorganisms*, 11(7), p. 1762. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071762>.
- 496 Cholewińska, P. *et al.* (2022) 'The Occurrence of Microplastics and the Formation of Biofilms by
497 Pathogenic and Opportunistic Bacteria as Threats in Aquaculture', *International Journal of*
498 *Environmental Research and Public Health*, 19(13), p. 8137. Available at: [https://doi.org/10.3390/ijerph](https://doi.org/10.3390/ijerph19138137)
499 19138137.
- 500 COP21 (2015) *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*. Available at:
501 <https://agriculture.gouv.fr/cop21-lagriculture-et-la-foret-en-premiere-ligne-pour-le-climat> (Accessed:
502 4 May 2024).

- 503 Cuny, H. (2021) *Biosynthèse et régulation de l'expression des altérines, peptides antibiotiques produits*
504 *par des bactéries marines du genre Pseudoalteromonas*. Thèse de doctorat. Brest. Available at:
505 <https://www.theses.fr/2021BRES0084> (Accessed: 19 December 2022).
- 506 Cuny, H. *et al.* (2021) '*Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the
507 flat oyster *Ostrea edulis*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(11), p.
508 005070. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005070>.
- 509 Dang, H. and Lovell, C.R. (2002) 'Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter*
510 species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S
511 ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization', *Applied and Environmental*
512 *Microbiology*, 68(2), pp. 496–504. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.496-504.2002>.
- 513 Defer, D. *et al.* (2013) 'Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection', *Fish &*
514 *Shellfish Immunology*, 34(6), pp. 1439–1447. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>.
- 515 Devi, A.A. *et al.* (2022) 'In Vitro Assessment of Probiotic Potential of an Autochthonous Bacterial Isolate,
516 *Pseudomonas mosselii* COFCAU_PMP5', *Microbiology*, 91(2), pp. 207–214. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0026261722020047>.
- 518 Di Somma, A. *et al.* (2020) 'Antimicrobial and Antibiofilm Peptides', *Biomolecules*, 10(4), p. 652. Available
519 at: <https://doi.org/10.3390/biom10040652>.
- 520 Di Tommaso, P. *et al.* (2017) 'Nextflow enables reproducible computational workflows', *Nature*
521 *Biotechnology*, 35(4), pp. 316–319. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt.3820>.
- 522 Dsouza, F.P., Dinesh, S. and Sharma, S. (2024) 'Understanding the intricacies of microbial biofilm
523 biovolume and its endurance in chronic infections: a key to advancing biofilm-targeted therapeutic
524 strategies', *Archives of Microbiology*, 206(2), p. 85. Available at: [https://doi.org/10.1007/s00203-023-](https://doi.org/10.1007/s00203-023-03802-7)
525 [03802-7](https://doi.org/10.1007/s00203-023-03802-7).
- 526 Edwards, J.L. *et al.* (2010) 'Identification of Carbohydrate Metabolism Genes in the Metagenome of a
527 Marine Biofilm Community Shown to Be Dominated by *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes*',
528 *Genes*, 1(3), pp. 371–384. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes1030371>.
- 529 El-Saadony, M.T. *et al.* (2021) 'The functionality of probiotics in aquaculture: An overview', *Fish &*
530 *Shellfish Immunology*, 117, pp. 36–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>.
- 531 FAO (2024) 'Résumé de La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2024. La transformation
532 bleue en action'. Available at: <https://doi.org/10.4060/cd0690fr>.
- 533 FranceAgriMer (2023) 'Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2023'. Available at:
534 [https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/72218/document/CC_pêche_2023_FR.pdf?ver-](https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/72218/document/CC_pêche_2023_FR.pdf?version=14)
535 [sion=14](https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/72218/document/CC_pêche_2023_FR.pdf?version=14).
- 536 Ghori, I. *et al.* (2022) 'Gut microbiome modulation mediated by probiotics: Positive impact on growth
537 and health status of *Labeo rohita*', *Frontiers in Physiology*, 13. Available at: [https://doi.org/10.3389/](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.949559)
538 [fphys.2022.949559](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.949559).
- 539 Grasland, B. *et al.* (2003) 'Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine
540 Bacteria', *Biofouling*, 19(5), pp. 307–313. Available at: <https://doi.org/10.1080/0892701031000121041>.

- 541 Herlemann, D.P. *et al.* (2011) 'Transitions in bacterial communities along the 2000km salinity gradient
542 of the Baltic Sea', *The ISME journal*, 5(10), pp. 1571–1579. Available at: [https://doi.org/10.1038/ismej.](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41)
543 2011.41.
- 544 Jouault, A. *et al.* (2020) 'Alterocin, an Antibiofilm Protein Secreted by *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6',
545 *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20), pp. e00893–20. Available at: [https://doi.org/10.1128/](https://doi.org/10.1128/AEM.00893-20)
546 AEM.00893-20.
- 547 Kassambara, A. (2020) 'Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests [R package rstatix version
548 0.6.0]', in. Available at: [https://www.semanticscholar.org/paper/Pipe-Friendly-Framework-for-Basic-](https://www.semanticscholar.org/paper/Pipe-Friendly-Framework-for-Basic-Statistical-Tests-Kassambara/e1229cd67fd9b6d61c17e22939f25a16da87c442)
549 [Statistical-Tests-Kassambara/e1229cd67fd9b6d61c17e22939f25a16da87c442](https://www.semanticscholar.org/paper/Pipe-Friendly-Framework-for-Basic-Statistical-Tests-Kassambara/e1229cd67fd9b6d61c17e22939f25a16da87c442) (Accessed: 11 January
550 2024).
- 551 Li, Y. *et al.* (2023) 'Characterization of a Vibriophage Infecting Pathogenic *Vibrio harveyi*', *International*
552 *Journal of Molecular Sciences*, 24(22), p. 16202. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms242216202>.
- 553 Lu, Z. *et al.* (2024) 'Recirculating aquaculture system as microbial community and water quality
554 management strategy in the larviculture of *Scylla paramamosain*', *Water Research*, 252, p. 121218.
555 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121218>.
- 556 Luo, A. *et al.* (2022) 'Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms', *Frontiers in*
557 *Microbiology*, 12, p. 757327. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.757327>.
- 558 Malazarte, J. *et al.* (2022) 'Bacterial communities in a subarctic stream network: Spatial and seasonal
559 patterns of benthic biofilm and bacterioplankton', *Molecular Ecology*, 31(24), pp. 6649–6663. Available
560 at: <https://doi.org/10.1111/mec.16711>.
- 561 Martin, M. (2011) 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads',
562 *EMBnet.journal*, 17(1), pp. 10–12. Available at: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- 563 Martínez Cruz, P. *et al.* (2012) 'Use of Probiotics in Aquaculture', *International Scholarly Research*
564 *Notices*, 2012, p. e916845. Available at: <https://doi.org/10.5402/2012/916845>.
- 565 Matsumoto, K. *et al.* (2021) 'Metagenomic analysis provides functional insights into seasonal change of
566 a non-cyanobacterial prokaryotic community in temperate coastal waters', *PLOS ONE*, 16(10), p.
567 e0257862. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257862>.
- 568 McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) 'phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and
569 Graphics of Microbiome Census Data', *PLOS ONE*, 8(4), p. e61217. Available at: [https://doi.org/10.1371/](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
570 [journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217).
- 571 Navarro-Torre, S. *et al.* (2020) '*Pseudoalteromonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant growth-
572 promoting bacterium with potential use in phytoremediation', *International Journal of Systematic and*
573 *Evolutionary Microbiology*, 70(5), pp. 3287–3294. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004167>.
- 574 Noël, C. *et al.* (2021) 'SAMBA: Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses workflow'.
575 Available at: <https://doi.org/10.48546/WORKFLOWHUB.WORKFLOW.156.1>.
- 576 Offret, C. *et al.* (2016) 'Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria
577 *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance', *Marine Drugs*, 14(7), p. E129.
578 Available at: <https://doi.org/10.3390/md14070129>.

- 579 Okon, E.M. *et al.* (2023) 'A Global Analysis of Climate Change and the Impacts on Oyster Diseases',
580 *Sustainability*, 15(17), p. 12775. Available at: <https://doi.org/10.3390/su151712775>.
- 581 Oksanen, J. *et al.* (2015) 'Vegan: Community Ecology Package', *R Package Version 2.2-1*, 2, pp. 1–2.
- 582 Padayhag, B.M. *et al.* (2023) 'Microbial community structure and settlement induction capacity of
583 marine biofilms developed under varied reef conditions', *Marine Pollution Bulletin*, 193, p. 115138.
584 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115138>.
- 585 Papa, R. *et al.* (2013) 'Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas*
586 *haloplanktis* TAC125', *Research in Microbiology*, 164(5), pp. 450–456. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.01.010>.
587
- 588 Paulson, J.N. *et al.* (2013) 'Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys', *Nature*
589 *Methods*, 10(12), pp. 1200–1202. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>.
- 590 Pereira, W.A. *et al.* (2022) 'Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in
591 Aquaculture', *Microorganisms*, 10(9), p. 1705. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>.
592
- 593 Petrosillo, I. *et al.* (2023) 'Towards sustainable marine spatial planning of aquaculture', *Ecological*
594 *Indicators*, 154, p. 110542. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110542>.
- 595 Posit team (2024) 'RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston,
596 MA.' Available at: <http://www.posit.co/>.
- 597 Preena, P.G. *et al.* (2020) 'Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern', *Biologia*, 75(9),
598 pp. 1497–1517. Available at: <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>.
- 599 Remple, K.L. *et al.* (2021) 'Coral reef biofilm bacterial diversity and successional trajectories are
600 structured by reef benthic organisms and shift under chronic nutrient enrichment', *npj Biofilms and*
601 *Microbiomes*, 7(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00252-1>.
- 602 Rodrigues, S. *et al.* (2015) 'Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6
603 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*,
604 7(1), pp. 45–51. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9173-3>.
- 605 Roquigny, R. *et al.* (2021) 'Characterization of the marine aquaculture microbiome: A seasonal survey in
606 a seabass farm', *Aquaculture*, 531, p. 735987. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735987>.
607
- 608 Rutherford, S.T. *et al.* (2011) 'AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios',
609 *Genes & Development*, 25(4), pp. 397–408. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.2015011>.
- 610 Salta, M. *et al.* (2013) 'Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics', *Environmental*
611 *Microbiology*, 15(11), pp. 2879–2893. Available at: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12186>.
- 612 Schar, D. *et al.* (2021) 'Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in
613 Asia', *Nature Communications*, 12(1), p. 5384. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25655-8>.
614

- 615 Sharma, S. *et al.* (2023) 'Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance,
616 Control Measures, and Innovative Treatment', *Microorganisms*, 11(6), p. 1614. Available at:
617 <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>.
- 618 Tsuchiya, Y. *et al.* (2011) 'Seasonal Change of Bacterial Community Structure in a Biofilm Formed on the
619 Surface of the Aquatic Macrophyte *Phragmites australis*', *Microbes and Environments*, 26(2), pp. 113–
620 119. Available at: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10183>.
- 621 Wietz, M., Hall, M.R. and Høj, L. (2009a) 'Effects of seawater ozonation on biofilm development in
622 aquaculture tanks', *Systematic and Applied Microbiology*, 32(4), pp. 266–277. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.04.001>.
- 624 Xu, S. *et al.* (2023) '*MicrobiotaProcess*: A comprehensive R package for deep mining microbiome', *The
625 Innovation*, 4(2), p. 100388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>.
- 626 Yang, B. *et al.* (2021) 'Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass
627 summer mortality of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in China', *Aquaculture*, 535, p. 736363.
628 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736363>.
- 629

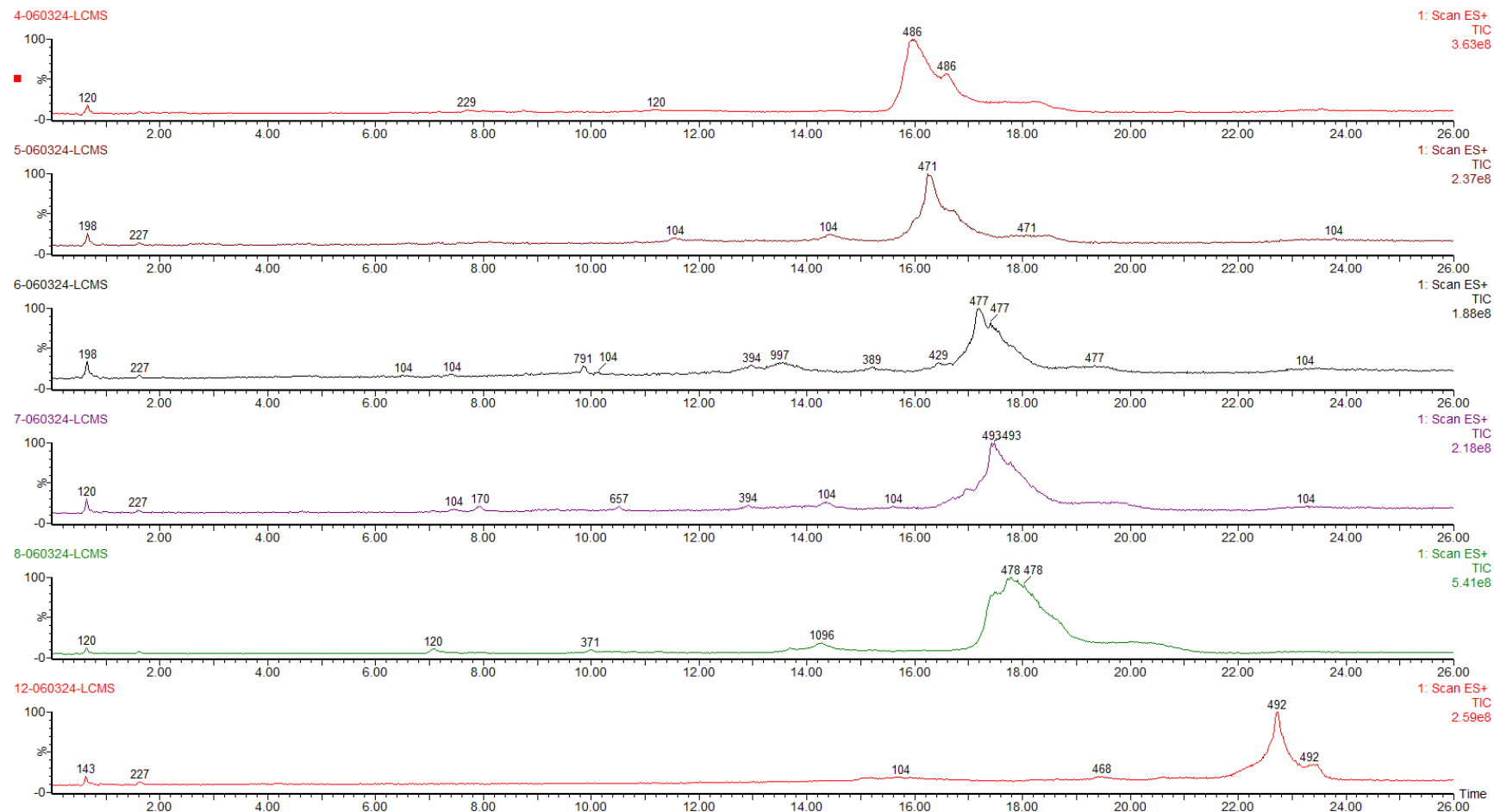


Figure A2. Scans en électrospray positif et chromatogrammes des ions totaux de chaque altérine purifiée par RP-HPLC. Les ions dichargés détectés correspondent aux ALT-970, ALT-940, ALT-952, ALT-984, ALT-954 et ALT-980, respectivement.

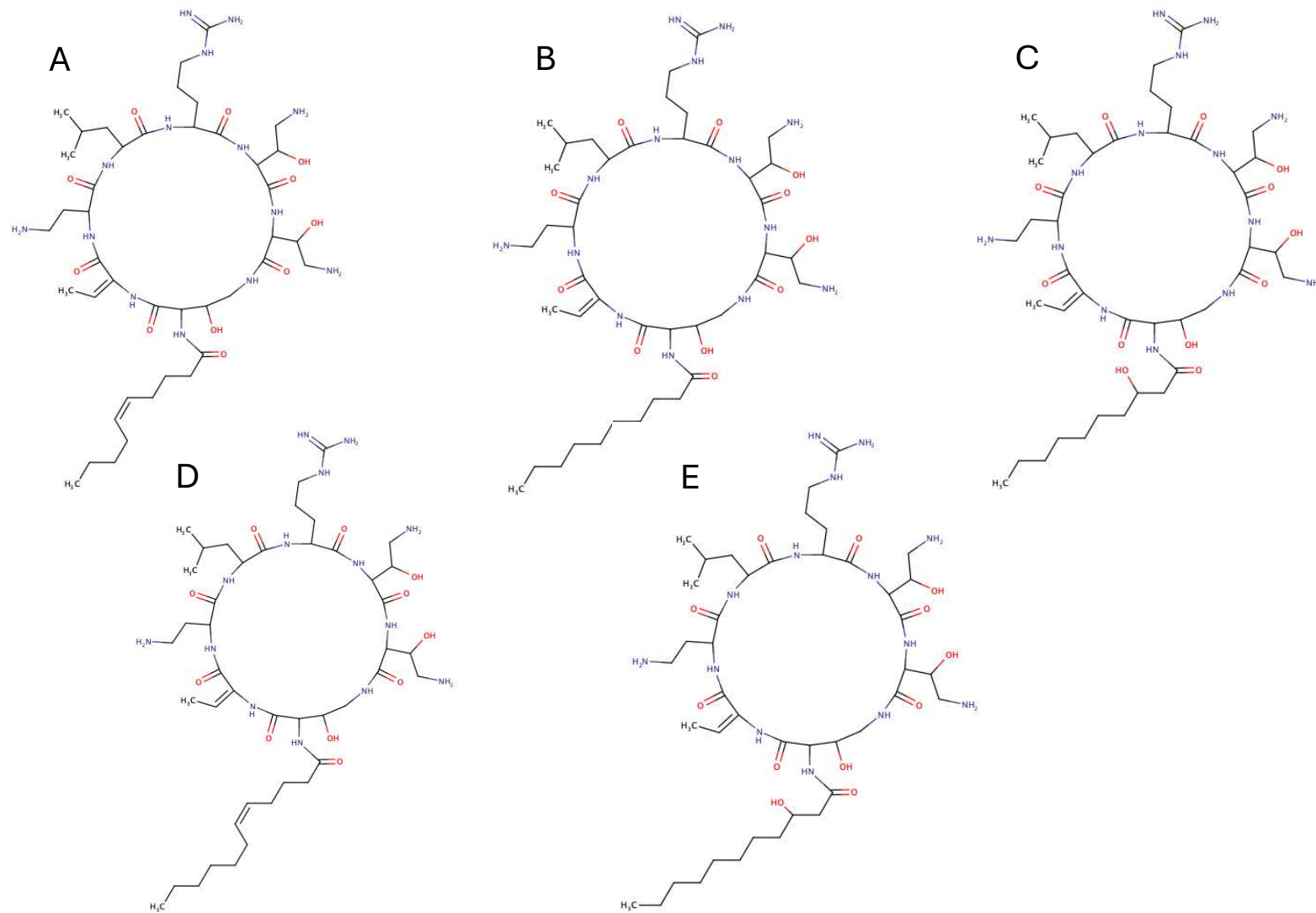


Figure A3. Structure des isoformes d'altérines purifiées : ALT-952 (A), ALT-954 (B), ALT-970 (C), ALT-980 (D), ALT-984 (E) d'après Offret *et al.*, 2022, réalisées sur MarvinSketch (24.3.0 ; Chemaxon, 2024).

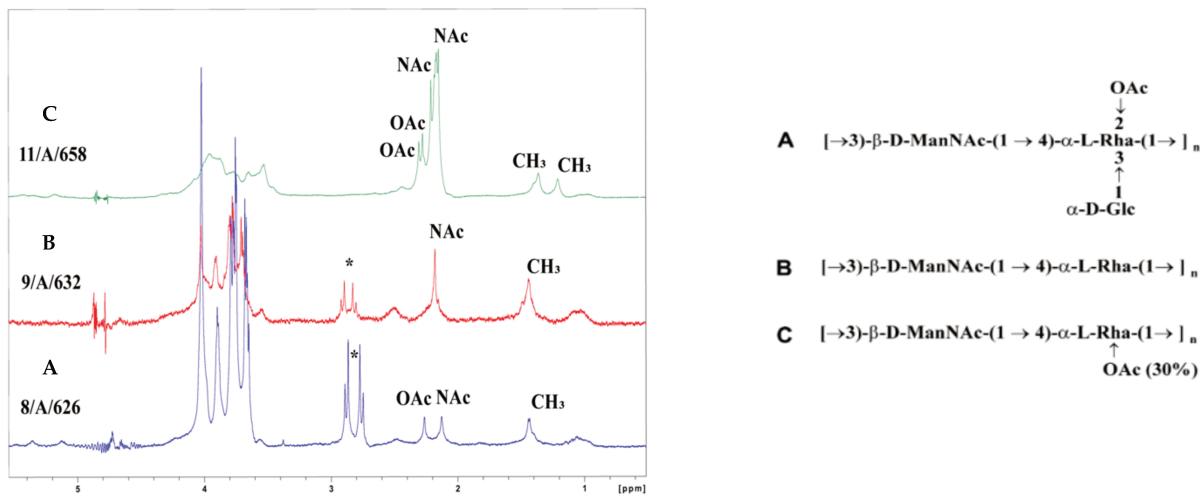


Figure A4. Spectres RMN des O-polysaccharides de souches de l'espèce *Aeromonas salmonicida*. Trois structures dont une nouvelle ont pu être identifiées (A, B et C). Figure adaptée de Ucieklak *et al.*, 2024.

ANNEXES CHAPITRE 2

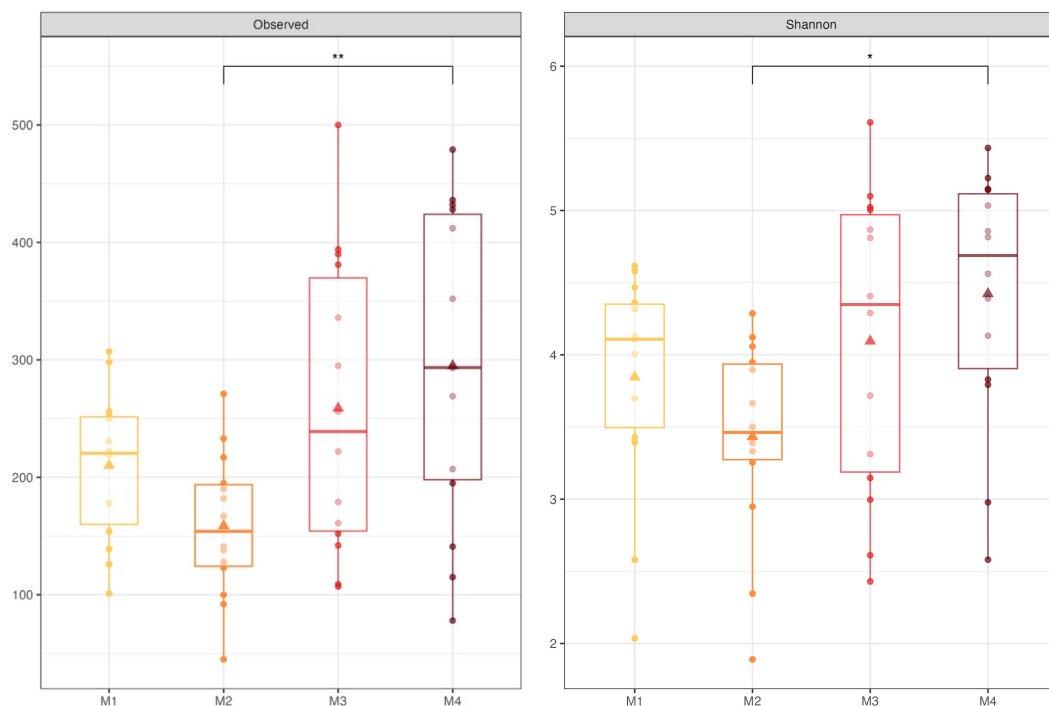


Figure A5. Mesures d' α -diversité pour les échantillons d'hémolymphe, de biofilm et d'eau de mer pour la condition contrôle au cours des 4 mois d'expérimentation (M1 à M4). La richesse observée (*Observed*) et la diversité (*Shannon*) sont ici représentées. Les valeurs moyennes sont symbolisées par un triangle. Les analyses statistiques (test de Tukey) sont indiquées avec le code suivant pour les valeurs de p-value : p-value = [0,01 ; 0,05] (*).

Tableau A1. Analyse de la variance par permutations (PERMANOVA) observant l'impact des conditions expérimentales au cours des différents mois de la maturation sur le microbiote hémolympatique des huîtres plates. La distance de Bray-Curtis est utilisée pour mesurer les dissimilarités.

Mois de la maturation	DF	Sum of Squares	R ²	F	P-value
M1	4	1,7155	0,1797	1,8621	0,001
M2	4	1,8490	0,1769	1,8806	0,001
M3	4	2,1833	0,2266	2,5636	0,001
M4	4	1,8473	0,1870	1,7246	0,001

Tableau A2. Analyse de la variance par permutations (PERMANOVA) observant l'impact des conditions expérimentales au cours des différents mois de la maturation sur les biofilms formés. La distance de Bray-Curtis est utilisée pour mesurer les dissimilarités.

Mois de la maturation	DF	Sum of Squares	R ²	F	P-value
M2	4	3,5304	0,67637	10,45	0.001
M3	4	2,2200	0,4831	4,4394	0.001
M4	4	2,9243	0,54235	5,9255	0.001

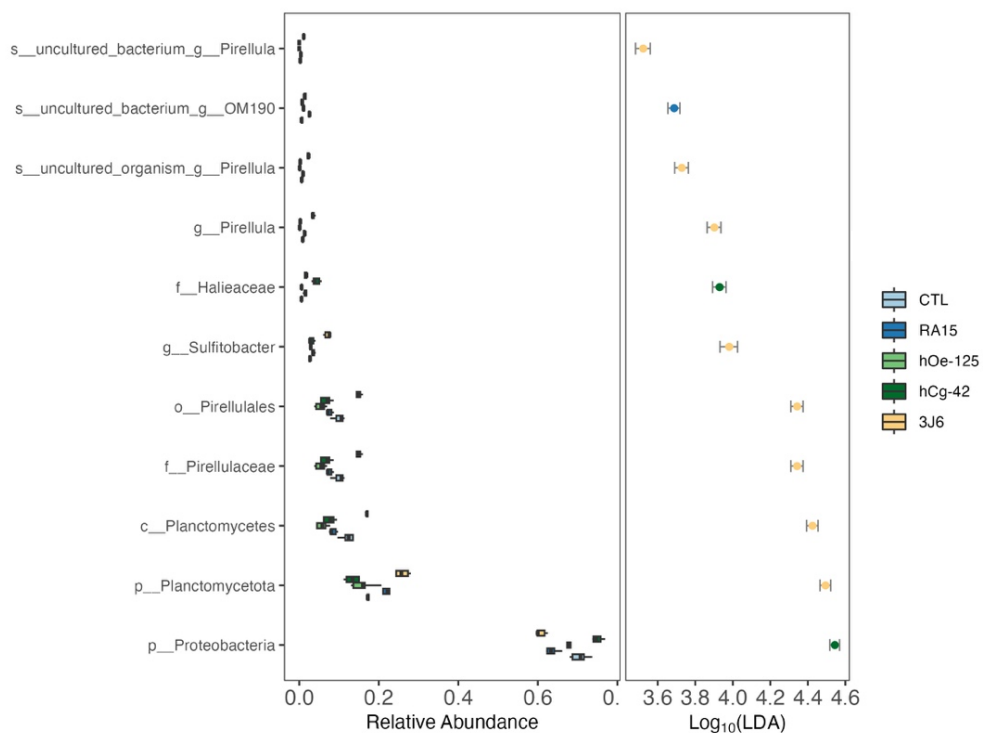


Figure A6. Analyse LDA identifiant les biomarqueurs associés aux communautés bactériennes du biofilm de chaque condition expérimentale, prélevés le premier mois de la maturation.

ANNEXES CHAPITRE 3

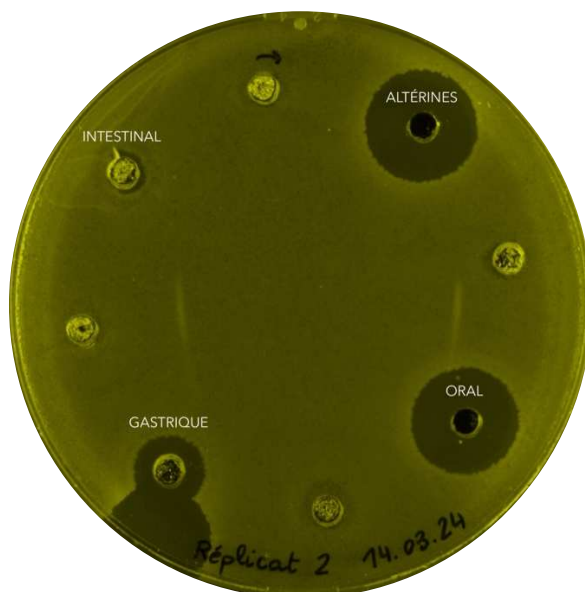


Figure A7. Test antimicrobien des échantillons de la digestion INFOGEST. Les témoins positifs et négatifs sont indiqués avec le signe T+ et T- respectivement. Les différentes phases de digestion sont ainsi décrites : ALTÉRINES = phase initiale, ORAL = phase orale, GASTRIQUE = phase gastrique, INTESTINAL = phase intestinale.

Tableau A3. Aires obtenues pour chaque altérine analysée en spectrométrie de masse détectée au cours de différentes phases de digestion statique INFOGEST.

	926 Da	970 Da	940 Da	954 Da	980 Da
Échantillon	m/z 464.29	m/z 486.3	m/z 471.30	m/z 478.3	m/z 491.31
T0 BLANC	ND	ND	ND	ND	ND
T1 TO ALTs	1,44E+07	5,37E+06	8,63E+06	2,23E+07	1,52E+07
T2 TO ALTs	1,70E+07	6,15E+06	9,99E+06	2,47E+07	1,80E+07
T3 TO ALTs	1,47E+07	5,35E+06	8,90E+06	2,21E+07	1,51E+07
PO BLANC	ND	ND	ND	ND	ND
T1 PO ALTs	1,56E+07	5,56E+06	8,93E+06	2,00E+07	1,22E+07
T2 PO ALTs	1,71E+07	5,94E+06	8,83E+06	2,12E+07	1,17E+07
T3 PO ALTs	1,33E+07	4,63E+06	7,41E+06	1,71E+07	9,07E+06
PG BLANC	ND	ND	ND	ND	ND
T1 PG ALTs	2,63E+06	1,05E+06	1,50E+06	2,96E+06	1,28E+06
T2 PG ALTs	1,88E+06	7,73E+05	1,18E+06	2,35E+06	1,01E+06
T3 PG ALTs	2,42E+06	1,91E+06	1,54E+06	3,15E+06	1,43E+06
PI BLANC	ND	ND	ND	ND	ND
T1 PI ALTs	7,40E+04	5,85E+04	7,09E+04	2,41E+05	1,36E+05
T2 PI ALTs	3,61E+05	2,87E+05	3,59E+05	7,90E+05	4,79E+05
T3 PI ALTs	1,63E+05	1,01E+05	1,29E+05	1,98E+05	9,44E+04

Tableau A4. Aires obtenues pour chaque altérine analysée en spectrométrie de masse détectée au cours de différentes phases de digestion dynamique, le TIM-1.

	926 Da	970 Da	940 Da	954 Da	980 Da
Échantillon	m/z 309.86	m/z 324.54	m/z 341.53	m/z 319.21	m/z 327.88
ALTs1 0 S	2,86E+05	1,19E+05	1,83E+05	4,77E+05	3,20E+05
ALTs2 0 S	1,70E+06	3,67E+05	6,25E+05	5,13E+05	1,61E+05
ALTs1 20 S	9,11E+06	3,76E+06	5,26E+06	1,42E+07	1,52E+07
ALTS2 20 S	4,01E+06	8,11E+05	1,25E+06	1,11E+06	4,14E+05

Titre : Investigation de souches de *Pseudoalteromonas* productrices d'altérines comme probiotique en ostréiculture : caractérisation et modulation des communautés bactériennes.

Mots clés : *Pseudoalteromonas*, probiotiques, *Ostrea edulis*, peptides antimicrobiens

Résumé : L'aquaculture est un secteur en plein essor. L'intensification des pratiques d'élevage provoque des épisodes de mortalité qui menacent son développement. L'usage d'antibiotiques étant proscrit pour limiter le développement de l'antibiorésistance, des alternatives telles que les probiotiques doivent être considérées. Les probiotiques sont des additifs microbiens ayant un effet bénéfique sur l'hôte qui invitent à le considérer avec son microbiote comme une entité à étudier pour mieux comprendre la santé des animaux d'élevage.

Des souches de *Pseudoalteromonas* ont été isolées de l'hémolymphe d'huîtres creuses et plates et produisent des peptides antibactériens, les altérines. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'incidence de ces souches un élevage d'huître plate a été évaluée et notamment sur les communautés bactériennes présentes. Les souches ainsi que les altérines qu'elles produisent, leur devenir dans un système digestif ont été caractérisées par analyses *in silico* et *in vitro*.

Les analyses génomiques prédisent que les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ne présentent pas de facteurs de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques. Leur utilisation en aquaculture peut donc être envisagée. De plus, le spectre antibactérien des altérines a été précisé. L'addition des souches en bassin ostréicole engendre une modulation des communautés bactériennes associées à l'huître plate et au biofilm. Une réduction du biovolume de biofilm a également été constatée suite à l'exposition aux souches de *Pseudoalteromonas*. Enfin, une dégradation rapide de ces bactéries et des altérines dans le tractus gastrointestinal a pu être observée.

Ces travaux de thèse ont donc permis d'illustrer les effets probiotiques des souches de *Pseudoalteromonas* sur l'huître plate *Ostrea edulis* et ouvrent des perspectives d'utilisation en élevage ostréicole.

Title: Investigation of alterin-producing *Pseudoalteromonas* strains as probiotics in oyster farming: characterization and modulation of bacterial communities.

Keywords: *Pseudoalteromonas*, probiotics, *Ostrea edulis*, antimicrobial peptides

Abstract: Aquaculture is a rapidly growing sector. The intensification of farming practices is leading to mortality events that threaten its development. Since the use of antibiotics is restricted to limit the rise of antibiotic resistance, alternatives like probiotics need to be considered. Probiotics are microbial additives that have a beneficial effect on the host and encourage viewing the host and its microbiome as a single entity to better understand the health of farmed animals.

Pseudoalteromonas strains have been isolated from the hemolymph of both Pacific and flat oysters. They are known to produce antibacterial peptides called alterins. In this thesis, the impact of these strains was investigated in flat oyster farming and more specifically on the bacterial communities.

The strains and alterins they produce, as well as their evolution in a digestive tract were characterized through both *in silico* and *in vitro* analyses. *Pseudoalteromonas* strains do not possess potential virulence factors or antibiotic resistance genes, making them suitable for use in aquaculture. Moreover, the antibacterial spectrum of alterins was further defined. The addition of these strains to oyster farming tanks resulted in a modulation of the bacterial communities associated with flat oysters and biofilm. A reduction in biofilm biovolume was also observed following exposure to *Pseudoalteromonas* strains. Lastly, a rapid degradation of these bacteria and alterins in the gastrointestinal tract was noted.

This thesis has demonstrated the probiotic effects of *Pseudoalteromonas* strains on the flat oyster, paving the way for potential applications in oyster farming.