

CARACTÉRISATION DES EFFETS IMMUNOMODULATEURS DE LA MICROFLORE NATURELLE DE L'HUÎTRE CRASSOSTREA GIGAS ET DÉVELOPPEMENT DE PROBIOTIQUES POUR LA CONCHYLICULTURE.

CARACTERISATION OF THE IMMUNOMODULTORY EFFECT OF NATURAL ENVIRONMETAL MICROFLORA ON CRASSOSTREA GIGAS ET PROBIOTIC APPLICATION FOR AQUACULTURE

Établissement **Université de Perpignan Via Domitia**

École doctorale **Energie et Environnement**

Spécialité **Biologie**

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

Directeur de la thèse Céline COSSEAU

Co-Encadrant Eve TOULZA

Financement du 01-10-2019 au 30-09-2022 origine **allocation doctorale Région Occitanie** Employeur **UPVD**

Début de la thèse le **1 octobre 2019**

Date limite de candidature **10 juin 2019**

Mots clés - Keywords

Crassostrea gigas, microflore, probiotique, immunomodulation, compétition positive

Crassostrea gigas, microflora, Probiotic, Immunomodulation, Positive competition

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

Le ou la candidature devra avoir un intérêt pour le domaine des interactions hôte-microorganismes. Il devra s'investir dans des analyses de jeu de données issus de séquençage et donc, il devra être familier avec des interfaces d'analyses (Type R). Des compétences en microbiologie peuvent être un atout.

The candidate should have an interest for the field of host microorganisms interactions. He will have to analyse datasets from sequencing projects and therefore should be familiar with analysing interface (such as R). competence in microbiology will be helpfull.

Description de la problématique de recherche - Project description

De plus en plus d'études récentes montrent que l'unité de sélection évolutive n'est pas l'individu isolé mais l'holobionte, c'est-à-dire l'animal ou la plante avec tous les microorganismes qui lui sont associés. Les microorganismes sont bénéfiques pour la survie, la nutrition, l'homéostasie et le développement des hôtes auxquels ils sont associés (1). Tout particulièrement, le rôle immunomodulateur de certaines bactéries commensales a été mis en évidence chez les mammifères et la commercialisation de bactéries sous forme de probiotiques est largement appliquée en prophylaxie en santé humaine. Chez les organismes marins d'intérêt économique, plusieurs études rapportent la possibilité d'étendre l'utilisation de probiotiques aux pratiques d'élevage aquacole (2), y compris en conchyliculture (3). L'intensification de l'aquaculture et l'apparition de crises sanitaires sur les élevages ont encouragé la recherche à développer des solutions durables sans compromettre l'environnement (alternatives aux antibiotiques) afin d'enrayer les maladies. C'est ainsi que l'utilisation de probiotiques s'est étendue à l'aquaculture et a montré des résultats prometteurs. Toutefois ces applications concernent essentiellement les élevages piscicoles et la culture des crevettes (2). Très peu d'études se sont consacrées à la mise en application sur des élevages conchylicoles. L'huître *C. gigas* subit depuis 2008 des épisodes de mortalités massives menaçant la filière ostréicole française. Dans le cadre de l'étude de ces mortalités estivales, nous avons caractérisé l'étiologie d'une des maladies survenant sur les stades juvéniles (Pacific Oyster Mortality Syndrome, POMS). Nous avons montré qu'une bactériémie sévère opportuniste était à l'origine des mortalités et qu'elle survenait suite à une déstabilisation du microbiote consécutive à une immunodépression des huîtres causée par l'infection avec le virus OsHV-1 μ Var (4). Par ailleurs, nous avons montré qu'il était possible de stimuler les défenses immunitaires des huîtres en les traitant avec une microflore environnementale au cours de leur développement larvaire. Cette stimulation permet aux huîtres de mieux survivre lors d'un épisode infectieux (5). Egalement, nous avons montré que des huîtres résistantes présentent, en période infectieuse en milieu naturel, une association systématique avec un groupe spécifique de cyanobactéries, suggérant un rôle protecteur de ces bactéries au cours de la pathogénèse potentiellement par compétition positive (6). Ces résultats ouvrent les perspectives d'un champ d'application pour l'usage de probiotiques appliqués à l'ostréiculture. La thèse proposée se fera dans la suite de ces travaux, les études envisagées auront pour objectif:

- Identifier et générer une collection d'espèces bactériennes préférentiellement associées aux huîtres ayant une meilleure survie lors d'épisode infectieux (Partie 1)
- Caractériser l'effet immunomodulateur de ces bactéries sur les huîtres (Partie 2)

- Proposer une formule probiotique permettant de répondre aux besoins de la profession (partie 3)

Pour la partie 1, les travaux pourront être effectués en se basant sur les données générées dans les projets précédents et/ou en cours de finalisation (Chercheur d'avenir 2015 transgigas, ANR Decipher, IFREMER AMIGO). L'identification d'autres phylogroupes associés positivement à une meilleure survie des huîtres en conditions infectieuses pourra s'effectuer en se basant sur ces jeux de données (barcoding 16S) générés sur les stades larvaires et sur les stades juvéniles. La mise en culture de ces bactéries constituera un autre volet de cette étude et permettra de générer une collection de bactéries à effets potentiellement bénéfiques pour les huîtres. Le phénotype protecteur pourra ensuite être testé en laboratoire pour chacune des souches isolées et connues pour être positivement associées à la survie des animaux (partie 2). Ces expériences pourront être réalisées dans les installations expérimentales d'IFREMER pour lesquelles notre unité est partenaire. Ces probiotiques seront appliqués lors du développement larvaire (effets immunomodulateurs) et lors des stades juvéniles (effets à compétition positive) avant la mise en pleine mer des huîtres. Ces stimulations pourront se faire sur des captages naturels et sur des animaux issus d'écloserie. Les travaux précédents ont permis d'identifier des gènes et épiallèles marqueurs d'une meilleure réponse immunitaire face à la maladie (4, 5). L'expression de ces gènes et leur empreinte épigénétique pourra être suivie comme marqueur des capacités immunitaires sur plusieurs individus immunostimulés par les bactéries probiotiques. L'effet protecteur de ces bactéries sera ensuite validé par une induction de la pathogénèse en conditions contrôlées.

La sélection de souches à effets protecteurs et leur potentielle application en tant que probiotique pourra ensuite ouvrir un champ d'application pour la profession. Cette partie est envisagée en fin de projet au travers de la collaboration avec le Comité Régional de Conchyliculture Méditerranéen et le Cevalmar (Partie 3). Cette interaction nous permettra d'intervenir sur l'étang de Thau et d'étudier le phénotype de protection induit après exposition des huîtres par des bactéries probiotiques en conditions infectieuses sur le terrain. Les travaux de cette thèse seront financés par les projets en cours et feront l'objet d'une demande de financement à l'appel d'offre EC2CO 2020 dans le cadre de l'action thématique « MICROBiologie ENvironnementale ».

(1) McFall-Ngai et al. Proc Natl Acad Sci. 2013

(2) Lazado et al. Fish Shellfish Immunol. 2015

(3) Desriac et al. FEMS Microbiol Lett. 2014

(4) De Iorgeril et al. Nat Commun. 2018

(5) Fallet et al. ESEB Congress 2018

(6) Clerissi et al. BioRxiv 2018

Associations between micro- and macro-organisms (forming holobionts) are common and mostly specific in nature. Microbial associates might provide benefits to their hosts for survival, but also homeostasis and development (1). Especially, the immunomodulatory role of some commensal bacteria has been clearly demonstrated in mammals for which probiotic bacteria are commercially available and applied in prophylactic treatment. In marine organisms of economic relevance, several studies have shown that the usage of probiotic could be extended to aquaculture (2), including shellfish farming (3). The intensification of aquaculture and the recent emergence of infectious disease in farms have encouraged researchers to develop sustainable solutions without compromising the environment (alternatives to antibiotics) in order to face the diseases. As a result, the use of probiotics has spread to aquaculture and has shown promising results. However, these applications mainly concern fish farms and shrimp culture (2). Very few studies have focused on application to shellfish farms. The oyster *Crassostrea gigas* undergoes since 2008 massive mortalities threatening the French oyster industry. Our laboratory has recently characterized the etiology of one of the diseases occurring on the juvenile stages (Pacific Oyster Mortality Syndrome, POMS). We have shown that a severe opportunistic bacteremia was responsible for the mortality and that it occurred following a destabilization of the microbiota resulting from an immunodepression of oysters caused by infection with the OsHV-1 μ Var virus (4). In addition, we have shown that it is possible to stimulate the immune defenses of oysters by treating them with an environmental microflora during their larval development. This stimulation allows oysters to survive better during an infectious episode (5). Furthermore, we have shown that resistant oysters exhibit a systematic association with a specific group of cyanobacteria, suggesting a protective role of these bacteria during the pathogenesis potentially by positive competition (6). These results open perspectives of application for the use of probiotics applied to oyster culture. The proposed thesis will be done in the continuation of this work and have for objectives:

- Identify and generate a collection of bacterial species preferentially associated with oysters which display a better survival phenotype during an infectious episode (Part 1)

- Characterize the immunomodulatory effect of those bacteria (part 2)

- Propose a probiotic formula which meet the needs of the profession (part 3)

For part 1, the work can be done based on data generated in previous projects and or being finalized (Researcher for 2015 transgigas, ANR Decipher, IFREMER AMIGO). The identification of other phylogroups positively associated with a better survival of oysters in infectious conditions can be done based on these datasets (barcoding 16S) generated on the larval stages and on the juvenile stages. The culturing of these bacteria will be another part of this study and will generate a collection of bacteria with potentially beneficial effects for oysters. The protective phenotype can then be tested in the laboratory for each of the strains isolated and known to be positively associated with the survival of the animals (part 2). These experiments can be carried out in the IFREMER experimental farms for which our unit is a partner. These probiotics will be applied during larval development (immunomodulatory effects) and during juvenile stages (positive competition effects) before placing the oysters in the open sea. These stimulations can be done on natural oysters and on hatchery animals. Previous work has identified genes and epiallèle markers for a better immune response to disease (4, 5). The expression of these genes and their epigenetic imprint could be followed as a marker of immune abilities on several individuals immunostimulated by probiotic bacteria. The protective effect of these bacteria will then be validated by induction of pathogenesis under controlled conditions. The selection of strains with protective effects and their potential application as a probiotic may then open up perspectives of application in shellfish farms. This part is planned at the end of the project through the collaboration with the Comité Régional de Conchyliculture Méditerranéen and the Cevalmar (Part 3). This interaction will allow us to study the induced protection phenotype after oyster exposure by probiotic bacteria in infectious conditions in the field.

The work of this thesis will be funded by the ongoing projects and will be the subject of a request for funding for the EC2CO 2020 call for tender as part of the thematic action 'ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY'.

(1) McFall-Ngai et al. Proc Natl Acad Sci. 2013

(2) Lazado et al. Fish Shellfish Immunol. 2015

- (3) Desriac et al. FEMS Microbiol Lett. 2014
(4) De Iorgeril et al. Nat Commun. 2018
(5) Fallet et al. ESEB Congress 2018
(6) Clerissi et al. BioRxiv 2018

Thématique / Domaine / Contexte

Les travaux de thèse sont centrés sur le thème de la microflore et de l'immunité innée des invertébrés.

Ces travaux concernent le domaine des interactions hôtes - microorganismes - environnement.

L'huître creuse d'intérêt économique *Crassostrea gigas* subit depuis 2008 des épisodes de mortalités massives menaçant la filière ostréicole en région Occitanie. Les huîtres cultivées dans les lagunes méditerranéennes sont sévèrement touchées, avec des mortalités pouvant atteindre 85% chez les naissains en période estivale. Les travaux de recherche effectués dans l'unité IHPE sont consacrés à la compréhension de l'étiologie complexe de cette maladie.

Objectifs

Cette thèse consistera à étudier les mécanismes d'interactions entre la microflore de l'huître et la réponse immunitaire, et à identifier les bactéries clés immunomodulatrices. Ces travaux ont pour objectif appliqué de proposer des solutions probiotiques pour immunostimuler les huîtres lors de leur développement précoce et les rendre plus résistantes à la maladie au stade juvénile.

Méthode

Culture de bactéries sur boîte, étude de microflore par barcoding, étude de réponse transcriptomique par RNA-Seq, Etude de phénotype en réponse à la maladie par des approches zootechniques adaptées.

Résultats attendus - Expected results

Isolement de bactéries à effet bénéfique, Caractérisation de leur effet soit immunomodulateur sur l'huître, soit par compétition positive, mise en application sous forme de probiotique.

Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

Les encadrants s'engagent à suivre les étudiants en les formant dans les expériences de microbiologie, de biologie moléculaire et d'analyses de séquences qui sont inhérentes à leur projet. Ils s'engagent à développer des collaborations nécessaires à une meilleure valorisation du projet. L'encadrement comprend la préparation aux oraux et rapports écrits permettant de diffuser et valoriser les résultats. Le suivi du bon avancement de la thèse s'effectue par un entretien hebdomadaire.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Les expériences zootechniques pourront être réalisées dans les installations expérimentales d'IFREMER pour lesquelles le laboratoire IHPE est partenaire.

Les travaux de cette thèse seront financés par les projets en cours et feront l'objet d'une demande de financement à l'appel d'offre EC2CO 2020 dans le cadre de l'action thématique « MICROBiologie ENvironnementale ».

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

Pour la valorisation scientifique, les résultats attendus issus de ce projet vont susciter l'intérêt de plusieurs communautés scientifiques et peuvent être valorisés dans différents types de journaux. Les résultats pourront donc être publiés soit dans un journal directement en relation avec la microbiologie (Environmental microbiology IF=4.9), soit dans un journal en relation avec les sciences de l'évolution (Molecular Biology and Evolution IF=14.3 ou Journal of Evolutionary Biology IF=3.5 ou Evolutionary Biology IF=3.3), ou bien un journal publiant des résultats d'intérêt pour le domaine de l'aquaculture ou les sciences marines (Marine Biology IF=2.5, Aquaculture Environment Interactions IF=2.4)

Références bibliographiques

- McFall-Ngai et al. Proc Natl Acad Sci. 2013
Lazado et al. Fish Shellfish Immunol. 2015
Desriac et al. FEMS Microbiol Lett. 2014
De Iorgeril et al. Nat Commun. 2018
Fallet et al. ESEB Congress 2018
Clerissi et al. BioRxiv 2018

