



HAL
open science

Interaction entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'Ostréid herpesvirus OsHV-1 : influence de la salinité et du pH

Marine Fuhrmann

► To cite this version:

Marine Fuhrmann. Interaction entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'Ostréid herpesvirus OsHV-1 : influence de la salinité et du pH. *Biologie animale*. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0091 . tel-01673826

HAL Id: tel-01673826

<https://theses.hal.science/tel-01673826>

Submitted on 1 Jan 2018

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

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

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

Mention : Biologie marine

École Doctorale des sciences de la mer

présentée par

Marine Fuhrmann

Préparée à l'institut français pour
l'exploitation de la mer (Ifremer),
Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin (LEMAR)

**Interaction entre
l'huître creuse
Crassostrea gigas et
l'Ostréid herpesvirus
OsHV-1 : Influence
de la salinité et du pH**

Thèse soutenue le 6 décembre 2016

devant le jury composé de :

Colleen BURGE

Assistant professeur, PhD, University of Maryland Baltimore county
/ Rapporteur

Isabelle ARZUL

Directeur de recherche, Ifremer / Rapporteur

Vianney PICHEREAU

Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale /
Examineur

Guillaume MITTA

Professeur des universités, Université de Perpignan / Examineur

Frédéric GAZEAU

Chargé de recherche, UMR 7093 / CNRS, Laboratoire
océanologique de Villefranche-sur-Mer / Examineur

Gwenaëlle LE BLAY

Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale /
Examineur

Christine PAILLARD

Directeur de recherche, CNRS / Examineur

Fabrice PERNET

Directeur de recherche, Ifremer / Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier Colleen Burge et Isabelle Arzul d'avoir accepté de corriger mon manuscrit, ainsi que Christine Paillard, Gwenaëlle Le Blay, Frédéric Gazeau, Guillaume Mitta et Vianney Pichereau pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Merci à Pierre Boudry pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins pendant ces 3 années. Je le remercie aussi pour toujours avoir été de bons conseils dans les moments importants. Merci à Marianne Alumno-Bruscia et à Elodie Fleury pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Physiologie des Invertébrés.

Je ne remercierai jamais assez Fabrice Pernet, ou plutôt Feubwice, pour avoir été un super papa chercheur pendant ces 3 années de thèse. Merci pour son suivi, son écoute, ses conseils précieux et la confiance qu'il m'a accordée.

Merci infiniment à Bruno Petton, le sauveur d'Argenton pour avoir partagé tout son savoir expérimental, pour son aide si précieuse pendant les expérimentations et les diverses discussions enrichissantes qu'on a pu avoir.

Merci à Charlotte Corporeau pour sa bonne humeur et son humour. Je retiendrai un bon florilège de ses expressions que je n'ai malheureusement pas toutes répertoriées. Merci à Claudie Quéré pour m'avoir fait découvrir et appris les techniques de biochimie, à Virgile Quillien pour m'avoir initié à la biomol, à Lizenn Delisle pour avoir partagé son savoir sur VDAC et la protéo. Merci à Arnaud Huvet pour les discussions et les bons conseils.

Je tiens à remercier toutes les personnes du LPI, Pierrick Le Souchu, Dominique Iliou, Véronique Loiseau, Catherine Seguneau, Marc Suquet, Christian Mingant, Stéphane Pouvreau, Isabelle Quéau, Jacqueline Le Grand, Dominique Ratiskol, Mathias, Martin Protat, Mathieu Poulhazan, Anaïs Guyon, Morgane Chapolin, Marine Salou, François Audrezet, Philippe Miner et Charlotte Lahot.

Je remercie également Pierre Gernez, Vianney Pichereau, Philippe Soudant pour avoir fait partie de mon comité de thèse.

Je remercie bien évidemment l'équipe de La Tremblade pour m'avoir accueilli pendant 2 semaines et plus particulièrement merci à Benjamin Morga, Nicole Faury pour m'avoir appris à quantifier l'expression de gènes viraux et à Agnès Travers pour avoir donné de son temps pour m'initier au monde des Vibrios et à Claire Martenot pour les échanges que nous avons eu.

Merci au labexmer et à la National Shellfisheries Association pour m'avoir permis de participer à des congrès internationaux. Je remercie aussi la direction scientifique de l'Ifremer pour m'avoir accordé une bourse de mobilité en 2016. Cela m'a permis de découvrir pendant 2 mois le laboratoire vétérinaire de l'université de Sydney à Camden. Je remercie chaleureusement Richard Whittington pour son accueil au laboratoire. Je le remercie aussi pour sa générosité et sa confiance. En effet, merci à lui et à Ann-Michele, de m'avoir laissé entre les mains une voiture, et de m'avoir fait découvrir la côte de NSW. Plus largement, merci à Paul Hick, Olivia Evans, Maximilien de Kantzow, Erandi Parameti pour m'avoir accordé leur temps qui était précieux et pour le partage de leurs connaissances. Merci encore à Vicky, Alison, Craig pour leurs conseils et leur aide pendant les expérimentations. Je n'oublie pas non plus, Len et Bruce qui m'ont fait découvrir leur lieu de travail, la George River et Hawkesbury River, ainsi que les discussions que nous avons pu avoir sur leur beau métier d'ostréiculteur. Je garde aussi un très bon souvenir des échanges dans la cuisine de la résidence avec Momena, Cristina, Chang wei, San ti et bien d'autres.

Un énorme merci aux copains qui m'ont soutenu et m'ont permis de finir la thèse en étant moralement intacte. Je ne pourrais pas énumérer tous les bons moments passés avec eux durant ces 3 années, mais

j'essaierais d'en nommer certains. Merci donc à Gaëlle Richard avec qui on a fait un duo de choc, la grande brune et la petite blonde, à Yanouk Epelboin, toujours partant pour une tite pause-café pour recharger les batteries et bien rigoler, à Laura Frère pour les footings ou les séances de muscu pendant la rédaction, à Nina le rayon de soleil du bureau toujours prête à se marrer, à Audrey Mat pour son humour belge, à Clémentine Gélébart à Yann Foury, les vieux amis, toujours là quand il faut, à Carmen pour sa joie de vivre andalouse, à Ewan, Marta et bien d'autres.

Enfin merci beaucoup à la famille pour votre soutien tout au long de la thèse, qui n'est pas toujours un long fleuve tranquille, mais qui est une expérience si enrichissante qu'elle vaut largement la peine d'être vécue.

Valorisation

1 Publications présentées dans le manuscrit

1. **Fuhrmann M**, Petton B, Quillien V, Faury N, Morga B, Pernet F (2016) Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture Environment Interactions* 8:543-552
2. **Fuhrmann M**, Petton B, Pernet F, Metabolism of oyster *Crassostrea gigas* is influenced by salinity and modulates its survival to the ostreid herpesvirus OsHV-1 (will be submitted in *Journal of Experimental Biology*)
3. **Fuhrmann M**, Richard G, Quéré C, Petton B, Pernet F, Low pH reduced survival of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the ostreid herpesvirus 1 by altering the metabolic response of the host (will be submitted in *Journal of Experimental Biology*)

2 Présentations orales

1. **Fuhrmann M**, Petton B, Pernet F (2014) Effet de la salinité sur la transmission d'agents pathogènes et la mortalité associée chez *Crassostrea gigas*. Journées de restitution des résultats du projet ANR GIGASSAT, 20 novembre 2014, Ifremer Brest, France
2. **Fuhrmann M**, Petton B, Pernet F (2015) Disease transmission and associated mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: does salinity matter? National Shellfisheries Association, 22 au 26 mars 2015, Monterey, Californie, Etats-Unis

3. **Fuhrmann M**, Petton B, Pernet F (2016) Disease transmission and associated mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: does salinity matter? World Aquaculture Association, 22 au 26 février 2016, Las Vegas, Nevada, Etats-Unis
4. **Fuhrmann M**, Petton B, Pernet F (2016) How does ocean acidification influence disease susceptibility of oyster *Crassostrea gigas*? 4th International Symposium on the Ocean in a High-CO2 World, 3 au 6 mai 2016, Hobart, Tasmanie, Australie
5. **Fuhrmann M**, Richard G, Quéré C, Quillien V, Faury N, Morga B, Petton B, Pernet F (2016) Quand l'environnement module l'interaction *C. gigas* – OsHV-1 : le cas de la salinité et du pH. Journées de restitution finale des résultats du projet ANR GIGASSAT, 12 au 13 octobre 2016, Ifremer Brest, France

Table des matières

Remerciements.....	
Valorisation.....	
Liste des figures hors publications.....	1
Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	5
Etat de l'art.....	12
1 Le modèle d'étude : l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	13
1.1 Systématique et zone de répartition	13
1.2 Cycle de vie et reproduction	13
1.3 Anatomie et éléments de physiologie	14
1.4 Energétique	16
1.5 Système de défense	18
1.6 Membranes cellulaires et acides gras	21
2 Mortalité massive de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> infectée par l'ostreïd herpèsvirus OsHV-1 25	
2.1 Historique de la maladie	25
2.2 L'agent pathogène : l'ostreïd herpèsvirus OsHV-1.....	25
2.3 Facteurs de risque de l'infection par OsHV-1.....	30

2.4	Changements physiologiques de <i>C. gigas</i> associés à l'infection par OsHV-1.....	33
3	La salinité.....	34
3.1	Notions d'osmolarité et de salinité.....	34
3.2	Les bivalves estuariens: des organismes euryhalins et osmoconformes	34
3.3	Salinité et métabolisme énergétique.....	36
3.4	Salinité et système de défense.....	37
3.5	Salinité et maladies de bivalves	39
4	Le pH	40
4.1	Les notions de pH et de PCO ₂	40
4.2	Rappels sur l'acidification des océans	41
4.3	Effet du pH sur les organismes marins	43
4.4	pH et système de défense	45
4.5	pH et maladies de bivalves.....	46
	Matériel et méthode	49
1	Matériel biologique.....	50
2	Protocole d'infection en milieu contrôlé.....	51
3	Analyses des échantillons	54
3.1	Quantification de l'ADN d'OsHV-1	55
3.2	Expression de 4 gènes d'OsHV-1	55
3.3	Glucides	56
3.4	Lipides et acides gras	57
3.5	Protéines et enzymes	59

3.6	Prostaglandines	65
4	Statistiques	66
4.1	Analyse de survie	66
4.2	Analyse de la variance ; plan d'expérience en parcelles divisées	67
4.3	Régression multiple pas à pas	67
4.4	Analyse descriptive des données.....	68
Chapitre 1 : Effet de la salinité sur la transmission de la maladie induite par OsHV-1 et la mortalité associée de l'huître creuse.....		
		69
1	Présentation de l'Article 1.....	70
2	Article 1	74
2.1	Corps de l'article.....	74
2.2	Informations supplémentaires	84
3	Complément d'étude	89
Chapitre 2 : Réponse métabolique de l'huître creuse à la salinité et l'infection par OsHV-1		
		91
1	Présentation de l'Article 2.....	92
2	Article 2	95
2.1	Corps de l'article.....	95
2.2	Informations supplémentaires	118
Chapitre 3 : Effet du pH sur la transmission de la maladie induite par OsHV-1 et la mortalité associée de C. gigas		
		124
1	Présentation de l'Article 3.....	125
2	Article 3	129
2.1	Corps de l'article.....	129

2.2	Informations supplémentaires	147
3	Complément d'étude	163
Discussion générale et perspectives		165
1	La salinité et le pH modulent-ils la survie des huîtres à une infection par OsHV-1 ?	166
2	La salinité et le pH ont-ils un effet sur l'infectiosité d' OsHV-1 ?	167
3	La salinité et le pH modulent-ils la réponse métabolique de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> à l'infection par OsHV-1 ?.....	170
3.1	Métabolisme énergétique	170
3.2	Réponses antioxydante et immunitaire	171
4	D'autres facteurs explicatifs des différences de survie ?	173
4.1	Réponse immunitaire	173
4.2	Bactéries.....	173
5	Perspectives.....	174
Bibliographie.....		177

Liste des figures hors publications

Figure 1: Influence des paramètres environnementaux sur les hôtes et les agents pathogènes dans le milieu marin (modifié de Burge et al., 2014).....	7
Figure 2: Cycle de vie et de l'huître creuse (modifié de Bagusche (2013))	14
Figure 3: Anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	16
Figure 4 : Représentation schématique des processus de phagocytose et d'encapsulation (Le Grand 2010) d'après (Soudant et al. 2008)).....	19
Figure 5: Présentation des différentes voies de synthèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'action de certaines enzymes impliquées dans la défense antioxydante de la cellule (Storey 1996).....	21
Figure 6: Voies de synthèse des principaux acides gras chez le phytoplancton (1+2+3) et les mollusques marins (1) (Kraffe 2003).....	23
Figure 7: Distribution d'OsHV-1 et de ses variants (Ségarra 2014).....	26
Figure 8: (A) Microscopie du virus OsHV-1 dans le noyau d'une cellule du manteau d'huître <i>C.gigas</i> (Schikorski et al. 2011a), (B) cryo-microscopie électronique d'une capsid d'OsHV-1 (Davison et al. 2005), (C) structure d'un herpesvirus	27
Figure 9: Organisation du génome viral d'OsHV-1 (modifié de Martenot (2013))	28
Figure 10: Cycle de réplication hypothétique (Ségarra 2014).	29

Figure 11: Gestion d'un changement de salinité et régulation du volume cellulaire chez un organisme osmoconforme.....	36
Figure 12: Schéma explicatif de l'acidification des océans.....	42
Figure 13: Répartition des différentes espèces de carbone inorganique dissous en fonction du pH (mesuré sur l'échelle totale) (Solomon et al. 20017).....	43
Figure 14: Effet de l'AO sur les organismes marins (Modifié de Kroeker et al. (2013)).....	44
Figure 15: Présentation des différents protocoles d'infection par OsHV-1 dans la littérature scientifique et dans les travaux présentés dans cette thèse	53
Figure 16: Principe du dosage de la superoxide dismutase (SOD assay kit, Sigma-Aldrich, France).....	62
Figure 17:Principe de dosage de la prostaglandine E2 par quantification du PGEM (Cayman chemical, Prostaglandin E metabolite assay kit)	66
Figure 18: Schémas (A) de l'expérience 1 et (B) de l'expérience 2, SI ; source infectieuse.....	71
Figure 19: Expression du gène IFI44 (Delta Ct) de l'hôte <i>C. gigas</i> lors (A) de l'expérience 1 et (B) de l'expérience 2.....	89
Figure 20: Dispositif expérimental de l'expérience 3.....	126
Figure 21: Expression de 4 gènes d'OsHV-1 dans les tissus d'huîtres en fonction de l'infection et du pH (8.1 vs 7.8)	163

Liste des abréviations

AA : Acides aminés

ADN(c): Acide désoxyribonucléique (complémentaire)

ADP : Adénosine diphosphate

AG(PI) : Acide gras (polyinsaturés)

AO : Acidification des océans

ARN: Acide ryribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CAT: Catalase

CoA: Coenzyme A

CS: Citrate synthase

Ct: Treshold cycle

DMA : Diméthylacétal

DTNB: acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)

EDM : Eau de mer

EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA: Acide éthylène glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tétraacétique acid

ERO: Espèce réactive de l'oxygène

ERA: Espèce réactive de l'azote

Exp : Expérience

G6P(DH) : Gluconate-6-phosphate(déshydrogénase)

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GST : Glutathion S-transférase

GTP: Guanosine triphosphate

HK: Hexokinase

HPTLC: High thin layer chromatography

IFI44: InterFeron-Induced protein 44

iNOS: Oxyde nitrique synthase induite

LPI: Laboratoire de physiologie des invertébrés

MDA : Malondialdéhyde
MOREST : Mortalités estivales
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
NADP (+/H): Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (sous forme réduite/oxydée)
NMI : Acides gras non malonique
NSI : Naissain standardisé Ifremer
ORF: Open reading frame
OsHV-1: Ostréid herpesvirus 1
PBS: Phosphate buffer saline / tampon phosphate salin
PCR: Polymerase chain reaction / Réaction en chaîne par polymérase
pH: potential hydrogène
PMA : Monoazide de propidium
PR: Proportionnalité des risques
RT PCR: Retro transcriptase polymerase chain reaction
SI: Source infectieuse
SOD: superoxide dismutase
THC: Total hemocytes count / nombre total d'hémocytes
Tm: melting temperature
Tpm: Tour par minute
TNB: acide 5-thio(2 nitrobenzoïque)
WSSV: White spot syndrome virus / virus du syndrome de la tache blanche

Introduction

Les maladies infectieuses ont une place importante dans le fonctionnement des écosystèmes. Elles influencent la structure des communautés, les interactions trophiques ou encore les structures biotiques (Burge et al. 2014). Le milieu marin est un milieu dont les populations ont des distances de dispersion plus importantes que sur le continent (McCallum et al. 2004) et les maladies pourraient s'y propager plus rapidement (Harvell 2004).

Depuis une trentaine d'années, les maladies marines sont en augmentation et touchent une diversité d'organismes chez les vertébrés, tels que les mammifères, et certains reptiles comme les tortues, mais aussi chez les invertébrés, comme les coraux, les échinodermes ou encore les mollusques (Harvell et al. 2004, McCallum et al. 2004, Ward & Lafferty 2004). Dans les milieux terrestres et marins le risque de maladie dépend de la triple interaction hôte-pathogène-environnement. Beaucoup d'interactions hôte-pathogène sont vulnérables aux changements de l'environnement (Burge et al. 2014). Le contexte actuel est au changement climatique qui se caractérise par une augmentation de la température, des modifications des précipitations (conduisant à des modifications de salinité), et un nombre grandissant de phénomènes météorologiques extrêmes. L'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (CO₂) est aussi à l'origine de l'acidification des océans (Raven et al. 2005).

La température, la salinité et le pH ont des effets sur la virulence et l'abondance des agents pathogènes, mais aussi sur la physiologie et la réponse immunitaire des organismes hôtes (Burge et al. 2014) (Figure 1). On comprend alors que dans le contexte de changement climatique, le nombre de maladies en milieu marin augmente (Lafferty & Holt 2003, Harvell et al. 2004, Burge et al. 2014). Par exemple, l'élévation de la température favorise le développement de maladies infectieuses des récifs coralliens ou encore l'infection de l'ormeau *Haliotis tuberculata* par la bactérie *Vibrio harveyi* (Travers et al. 2008, Travers et al. 2009) et de l'huître *Crassostrea virginica* par les parasites *Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelsoni* (Hofmann et al. 2009, Soudant et al. 2013 for review). Les hémocytes de moules

Mytilus edulis en condition acidifiée sont plus sensibles à une infection par la bactérie *V. tubiashii* qu'en condition ambiante (Asplund et al. 2014).

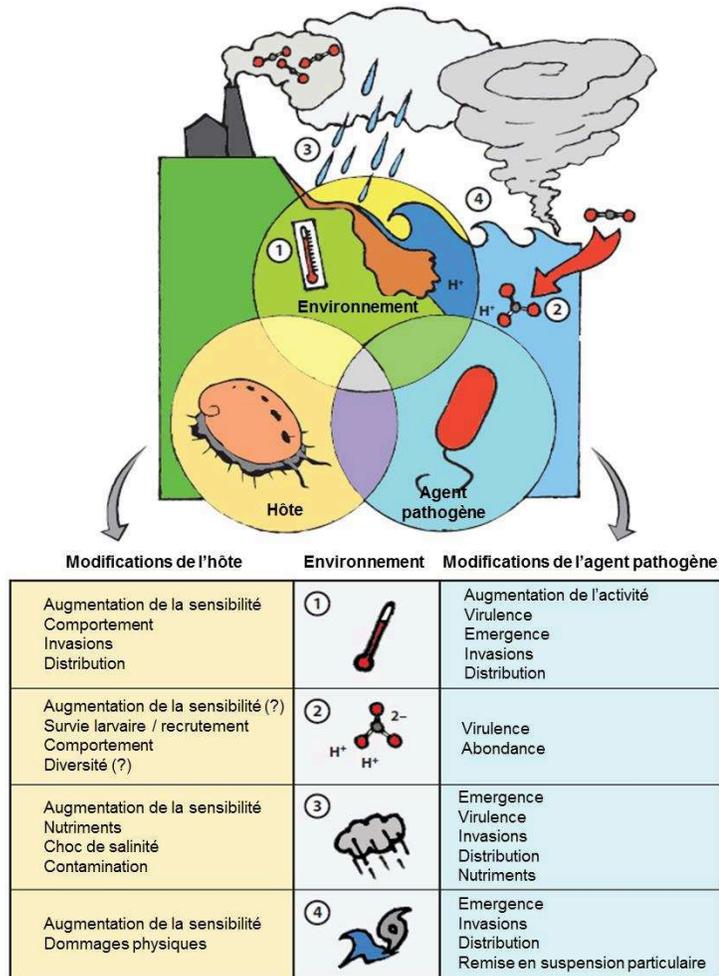


Figure 1: Influence des paramètres environnementaux sur les hôtes et les agents pathogènes dans le milieu marin (modifié de Burge et al., 2014)

Les maladies infectieuses ont des impacts économiques sur l'aquaculture. Elles touchent les fermes d'huîtres, de crevettes, d'ormeaux et de poissons et coûtent des milliards de dollars chaque année (Lafferty et al. 2015).

En 2014, la conchyliculture mondiale a eu une production de 16.1 millions de tonnes, dont 32% sont des huîtres. L'ostréiculture est dominée par la culture de l'huître Pacifique *Crassostrea gigas* (FAO

2014). Les principaux producteurs d'huîtres *C. gigas* sont la Chine (84%), la Corée (5.5%) et le Japon (3.6%) (FAO 2014). En 2014, la France a produit 76 610 t d'huîtres. Elle est le 4^{ème} producteur mondial (1.5%) et le 1^{er} producteur européen, en assurant 80 % de la production européenne (FAO 2014).

En France, l'ostréiculture est touchée par des maladies infectieuses. L'huître plate, *Ostrea edulis* endémique des côtes européennes, a été décimée par deux parasites, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* (Grizel 1983). L'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, a quant à elle été décimée par un iridovirus (Comps et al. 1976). Suite à la disparition de l'huître portugaise, l'huître *C. gigas* a été introduite en France à la fin des années 60, début des années 70. Elle est depuis exploitée tout le long des côtes françaises. Depuis une cinquantaine d'années, des épisodes de mortalité sont répertoriés partout où cette espèce est élevée comme au Japon, les Etats-Unis et la France. Ces événements se déroulent généralement pendant les mois les plus chauds de l'année et ont été qualifiés de « mortalité estivale ». Ces épisodes de mortalité ont une origine multifactorielle. Les facteurs de risque identifiés sont (i) la température (> 19 °C), (ii) la maturité sexuelle de l'huître (iii) la prédisposition génétique et (iv) la présence d'agents pathogènes, dont l'herpèsvirus OsHV-1 et des bactéries du genre *Vibrio*, (v) des conditions environnementales stressantes (pollution chimique, changement de salinité) (Samain & McCombie 2008).

Depuis 2008, les huîtres âgées de moins d'un an, meurent massivement. Ce phénomène de mortalité massive se manifeste maintenant dans d'autres pays européens (Peeler et al. 2012, Roque et al. 2012, Clegg et al. 2014), mais aussi en Australie et Nouvelle-Zélande (Jenkins et al. 2013, Paul-Pont et al. 2013b, a, Keeling et al. 2014, Paul-Pont et al. 2014). L'origine de cette mortalité est imputée à l'émergence d'un nouveau variant de l'ostréid herpèsvirus OsHV-1, le variant μ var (Segarra et al. 2010).

Afin de prévenir et de gérer ces maladies émergentes, il est nécessaire d'améliorer la surveillance des épizooties et d'en identifier les facteurs de risque et en particulier les facteurs environnementaux (Groner et al. 2016, Pernet et al. 2016). Depuis l'apparition des événements de mortalité massive d'huîtres creuses en 2008, les études ont porté sur l'effet de la température sur la transmission et la mortalité associée

de *C. gigas* lors d'une infection par OsHV-1 (Petton et al. 2013, Renault et al. 2014, Pernet et al. 2015, de Kantzow et al. 2016a).

Les huîtres sont élevées et sont naturellement présentes dans les écosystèmes estuariens et côtiers, caractérisés par des fluctuations de salinité et de pH (Wootton et al. 2008, Duarte et al. 2013, Fuhrmann et al. 2016) qui pourraient être exacerbées par le changement climatique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux effets de la salinité et du pH sur la transmission de la maladie induite par OsHV-1 et la mortalité associée d'huîtres creuses *C. gigas* âgées de moins d'un an. L'objectif a été d'apporter des réponses aux questions suivantes :

Q1 : La salinité et le pH affectent-ils la survie à une infection par OsHV-1 ?

Q2 : La salinité et le pH ont-ils un effet sur l'infectiosité d'OsHV-1 ? L'infectiosité est la capacité d'un microorganisme à coloniser ou à se répliquer dans les tissus de son hôte.

Q3 : La salinité et le pH modulent-ils la réponse métabolique de l'huître *Crassostrea gigas* à l'infection par OsHV-1 ?

Pour répondre à ces 3 questions nous avons étudié l'effet de ces 2 paramètres environnementaux sur (i) la survie de l'huître à une infection par OsHV-1, (ii) l'infectiosité du virus, en quantifiant le contenu en ADN d'OsHV-1 et l'expression de certains gènes viraux dans les tissus d'huître, (iii) la réponse métabolique de l'huître, en caractérisant son état énergétique, sa capacité de réponse antioxydante et enfin sa composition en acides gras membranaires.

Les réserves énergétiques de l'hôte ont été analysées car elles peuvent être modifiées lorsque les organismes sont dans des conditions environnementales sous-optimales et/ou exposés à des agents pathogènes (Sokolova 2011, Genard et al. 2013, Tamayo et al. 2014). De plus, dans le cas de la mortalité massive de *C. gigas*, le statut énergétique de l'huître joue un rôle majeur dans la réponse (mortalité ou rémission) à l'infection par OsHV-1 (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014a).

Le mécanisme de défense cellulaire principal des bivalves repose sur la phagocytose par les hémocytes. Ce processus s'achève par la destruction interne des agents pathogènes par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de l'azote (ERN) qui sont toxiques pour les agents pathogènes (Storey 1996, Donaghy et al. 2015). Une accumulation excessive des ERO peut entraîner un stress oxydatif chez l'hôte (Sies 1993, Storey 1996). C'est pour empêcher qu'un tel stress ne se mette en place ou pour le limiter, que les ERO sont prises en charge par les enzymes antioxydantes (Sies 1993, Storey 1996, Abele & Puntarulo 2004).

Lorsque la production d'ERO n'est pas suffisamment limitée par le système de défense antioxydant des cellules, cela peut endommager des macromolécules essentielles au bon fonctionnement cellulaire, comme l'ADN, les protéines ou encore les lipides membranaires (Sies 1993, Storey 1996). C'est pourquoi nous avons aussi analysé la composition en acides gras des lipides polaires (membrane). En effet, la composition en acides gras de la membrane est un indicateur du degré de stress oxydatif et des dommages cellulaires (Hulbert 2003). De plus, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont des précurseurs des eicosanoïdes, un groupe d'hormones biologiquement actives comme les prostaglandines, les leucotriènes et des acides hydroxyeicosatétraénoïque (Smith & Murphy 2002). La production d'eicosanoïdes est associée à des situations stressantes ou énergétiquement coûteuses telle que la stimulation de la fonction immunitaire (Stanley & Howard 1998).

Le manuscrit est organisé en 3 chapitres qui sont brièvement décrits ci-dessous :

- 1) La salinité est un facteur connu pour moduler de nombreuses maladies marines, comme des maladies parasitaires de *Crassostrea virginica* ou le syndrome des taches blanches chez la crevette (Soudant et al. 2008, Ramos-Carreño et al. 2014, Arzul & Carnegie 2015, Van Thuong et al. 2016). Ainsi, **le chapitre 1** a pour objectif d'identifier l'effet de la salinité sur la transmission de la maladie induite par OsHV-1, la mortalité associée de *C. gigas* et l'infectiosité du virus.

- 2) La salinité influence fortement la physiologie et le métabolisme des bivalves (Gosling 2003), ainsi le **chapitre 2** est plus particulièrement consacré à la réponse métabolique de l'huître à la salinité, en vue de comprendre comment ce facteur peut influencer la réponse de l'huître à l'infection par OsHV-1.
- 3) Dans le contexte de changement climatique, il peut être intéressant d'anticiper la réponse des organismes marins aux changements à venir, notamment la diminution du pH de l'eau de mer. De plus, le pH varie naturellement dans les zones côtières. Ainsi, le **chapitre 3** a pour objectif d'identifier l'effet du pH sur la transmission de la maladie et la mortalité associée de *C. gigas*, en déterminant les effets du pH sur le virus OsHV-1 en interaction avec son hôte et sur la réponse métabolique de l'huître.

Etat de l'art

1 Le modèle d'étude : l'huître creuse *Crassostrea gigas*

1.1 Systématique et zone de répartition

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg 1973) est un mollusque bivalve marin initialement originaire du Japon. Cette espèce s'adapte à des conditions environnementales très variées et a vu sa zone de répartition s'étendre. Elle se retrouve maintenant le long des côtes de la quasi-totalité des continents. Son introduction sur les côtes américaines, européennes et australiennes a permis la reconstitution de stocks d'huîtres indigènes épuisés par surexploitation, ou décimés à cause de maladies.

1.2 Cycle de vie et reproduction

Le cycle de vie de l'huître creuse *C. gigas* se compose d'une phase larvaire et d'une phase benthique (Figure 2). L'huître creuse est un animal dont la reproduction est externe, les gamètes mâles et femelles sont émises dans le milieu marin et la fécondation se fait dans l'eau. Les embryons issus de la fécondation évoluent au bout de 6 h en larves trochophores. A ce stade, les larves se nourrissent de leurs propres réserves, il s'agit d'une alimentation endogène. Après 24 - 48 h, les larves D véligères sont dotées d'une bouche, d'un anus, d'une ébauche coquillère et d'un prototroche (double couronne de cils entourant la larve), elles sont en capacité de nager et leur alimentation devient exogène. Par la suite, la croissance de la coquille continue et le prototroche évolue en vélum. La larve atteint alors le stade de larve véligère. La transition entre les modes de vie pélagique et benthique se fait par le stade de larve pédivéligère. A ce stade, les larves ont un système nerveux organisé, ainsi qu'un manteau, un cœur, des ébauches branchiales et un tractus digestif. Les larves pédivéligères explorent le substrat via le pied, se fixent et se métamorphosent.

L'huître creuse est une espèce hermaphrodite à tendance protandre, lors de sa première année la majorité des individus sont mâles. Elle atteint la maturité sexuelle dès sa première année de développement

et se reproduit tous les ans. La gamétogénèse se déroule durant le printemps et la maturité sexuelle est atteinte durant l'été.

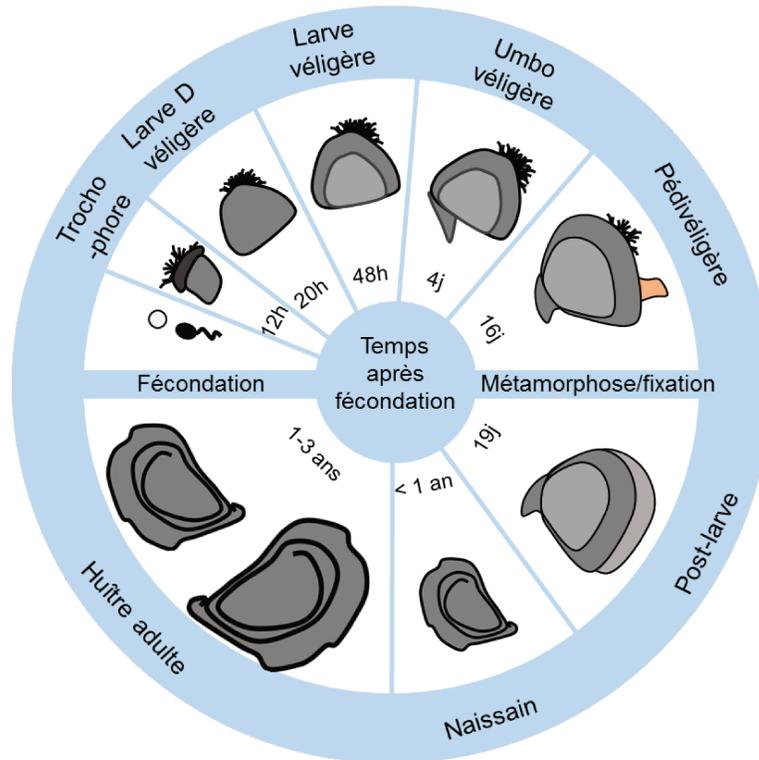


Figure 2: Cycle de vie et de l'huître creuse (modifié de Bagusche (2013))

1.3 Anatomie et éléments de physiologie

L'huître creuse est constituée d'une coquille qui renferme un corps mou. La coquille permet de protéger l'animal contre les prédateurs et joue aussi le rôle de squelette auquel sont attachés les muscles de l'organisme (Gosling 2003).

Chez les bivalves, le manteau se compose de deux lobes et est séparé des organes par la cavité palléale. Le manteau est constitué de tissu conjonctif parcouru par des vaisseaux contenant le fluide circulatoire appelé l'hémolymphe, des nerfs et des muscles. C'est un tissu multifonctionnel où se déroulent

la gamétogénèse, le stockage des réserves énergétiques, comme le glycogène, ainsi que la sécrétion de la coquille.

Les huîtres sont des animaux filtreurs, leurs branchies mettent en mouvement l'eau de mer et ont un rôle à la fois dans la respiration et l'alimentation. Les branchies ont une grande surface d'échange avec le milieu et sont irriguées par l'hémolymphe, elles sont donc particulièrement adaptées pour la fonction de respiration (Gosling 2003). Lorsque l'eau passe au travers des branchies, l'oxygène diffuse de l'eau vers l'hémolymphe.

L'eau de mer contient des particules en suspension dont se nourrissent les huîtres. La source principale de nourriture de l'huître creuse est le phytoplancton. Toutefois, les bactéries, le zooplancton ainsi que du matériel en décomposition font aussi partie du régime alimentaire. Le battement des cils branchiaux permet l'acheminement de ces particules en suspension vers les palpes labiaux, où elles sont triées en fonction de leur taille. Pour l'huître du Pacifique, la taille optimale des particules alimentaires est de 8-9 μm (Héral 1985). Les particules grossières sont dirigées vers le siphon anal et sont rejetées sous forme de pseudo-fèces. Les particules alimentaires sont quant à elles dirigées vers la bouche, elle-même reliée à l'œsophage. La ciliature de ces organes permet l'acheminement des particules alimentaires vers l'estomac. Après un broyage mécanique et une attaque enzymatique, le bol alimentaire est réduit. Un tri des particules est à nouveau effectué dans l'estomac. Les plus grosses particules sont acheminées vers l'intestin, alors que les particules fines sont dirigées vers la glande digestive où la digestion se fait par phagocytose des éléments nutritifs et attaque enzymatique. Le résidu de la digestion passe ensuite dans un long intestin où l'absorption se poursuit. Les matières fécales se forment dans le rectum et sont rejetées par l'orifice anal.

Le cœur est constitué d'un ventricule musculaire et de deux oreillettes. L'hémolymphe passe des oreillettes au ventricule, qui par contraction propulse l'hémolymphe dans l'aorte antérieure. Cette aorte se divise en de nombreuses artères qui se subdivisent en vaisseaux irrigant les tissus. Les vaisseaux se rassemblent et forment des veines.

Le système nerveux est simplement constitué de (i) deux ganglions viscéraux qui sont fusionnés et localisés contre le muscle adducteur postérieur et (ii) de ganglions cérébroïdes qui sont retrouvés au niveau des palpes labiaux (Figure 3).

La fonction d'excrétion est assurée par un rein constitué d'une glande tubulaire.

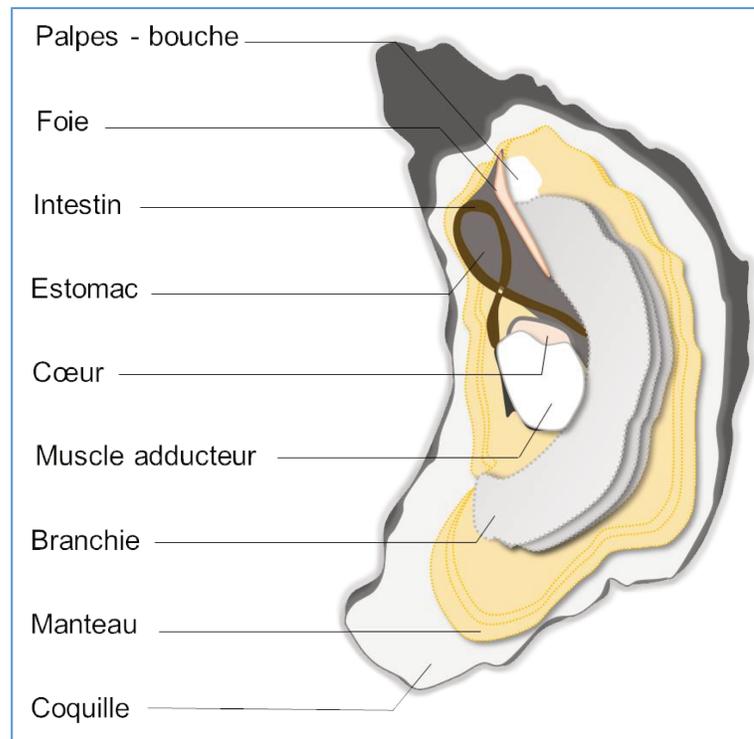


Figure 3: Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

1.4 Energétique

1.4.1 Mise en réserve

Deux familles de composés organiques constituent les réserves énergétiques de l'huître, les glucides et les lipides, qui sont stockées dans des cellules vésiculeuses.

Le glycogène est la forme de réserve des glucides et est principalement stocké dans les tissus des palpes labiaux, les gonades et le manteau (Berthelin et al. 2000). Alors que la quantité de glycogène varie peu dans les palpes labiaux, elle fluctue en fonction de l'activité de reproduction dans la gonade et le manteau. En période de repos sexuel, en automne et début de l'hiver, l'huître reconstitue ses réserves énergétiques. La région gonade-manteau se remplit de glycogène à hauteur de 30% de la masse sèche. Au printemps et en été les glucides sont mobilisés pour assurer la gamétogénèse et la quantité de glycogène peut diminuer jusqu'à 3% de la masse sèche (Berthelin et al. 2000).

La constitution des réserves glucidiques chez l'huître se fait donc lorsque le phytoplancton est présent en faible quantité dans le milieu. Ainsi, la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène ne dépend pas uniquement du glucose se trouvant dans la ressource trophique, mais aussi de voies de régulation endocrines, s'exerçant sur l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses (Hanquet 2009) et sur le métabolisme global du glycogène (Bacca 2007).

Les triglycérides constituent les lipides de réserve, qui après oxydation fournissent de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ou sont incorporés dans les phospholipides (Dalsgaard et al. 2003). Les variations saisonnières du contenu en triglycérides dépendent de la concentration en phytoplancton dans le milieu et du stade reproducteur (Pazos et al. 1996, Soudant et al. 1999, Delaporte et al. 2006).

1.4.2 Production d'énergie

Chez *C. gigas*, la principale voie de production d'ATP est la voie de la respiration aérobie qui comprend les étapes de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

La glycolyse s'effectue dans le cytoplasme des cellules. Elle se déroule en dix étapes catalysées par des enzymes. A l'issue de cette réaction, deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH et deux molécules de pyruvate sont produites pour la dégradation d'une molécule de glucose. La première enzyme

impliquée dans la glycolyse est l'hexokinase (HK), son étude permet d'estimer la mobilisation des glucides par les organismes.

La β -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Les enzymes impliquées dans cette voie catabolique sont localisées dans la matrice mitochondriale des cellules. Ainsi, les acides gras libres doivent être transférés dans la matrice mitochondriale afin d'être oxydés. Le transfert des acides gras de grande taille nécessite leur condensation au coenzyme A et l'utilisation d'un système de navette par la L-carnitine. La β -oxydation permet la synthèse d'acétyl-CoA qui est utilisée par le cycle de Krebs, et de molécules de NADH et de FADH₂ dont les électrons sont ultérieurement utilisés lors de la phosphorylation oxydative (Rawn 1989).

Le pyruvate produit au cours de la glycolyse entre dans le cycle de Krebs qui se réalise dans la mitochondrie. Ce cycle de huit étapes dégrade une molécule de pyruvate en une molécule d'ATP, trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂. La citrate synthase (CS) est la première enzyme impliquée dans ce cycle. Chez les invertébrés son activité est corrélée avec la consommation d'oxygène (Dahlhoff et al. 2002), elle donne donc une idée globale du métabolisme aérobie. Les coenzymes réduites produites lors du cycle de Krebs sont par la suite utilisées par la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet la synthèse d'ATP via le transfert d'électron.

1.5 Système de défense

Chez les invertébrés, le système immunitaire est inné et repose sur des cellules immunocompétentes, les hémocytes qui circulent dans l'hémolymphe. Deux types de réponses sont mises en place, une réponse cellulaire qui repose sur la phagocytose par les hémocytes, et une réponse humorales effectuée par des facteurs humoraux présents dans la partie plasmique de l'hémolymphe. **Nous parlerons dans cet état de l'art uniquement de la réponse à médiation cellulaire.**

1.5.1 Système immunitaire à médiation cellulaire

En réponse à une infection, les hémocytes migrent vers la zone infectée, il s'agit de l'infiltration hémocytaire. Au niveau de l'hémolymphe, cela se traduit par une diminution de la concentration en hémocytes. La phagocytose se déroule ensuite en plusieurs étapes (Figure 4). Elle commence par la reconnaissance et la fixation d'un corps étranger, comme un agent pathogène. Le corps étranger est ensuite internalisé et est finalement dégradé par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et de l'azote (ERA) (Chu 2000 for review, Soudant et al. 2013) ou encore des enzymes lysosomales. Si le corps étranger est de taille trop importante il sera internalisé par encapsulation. La capsule qui entoure le corps étranger est formée par des hémocytes différenciés.

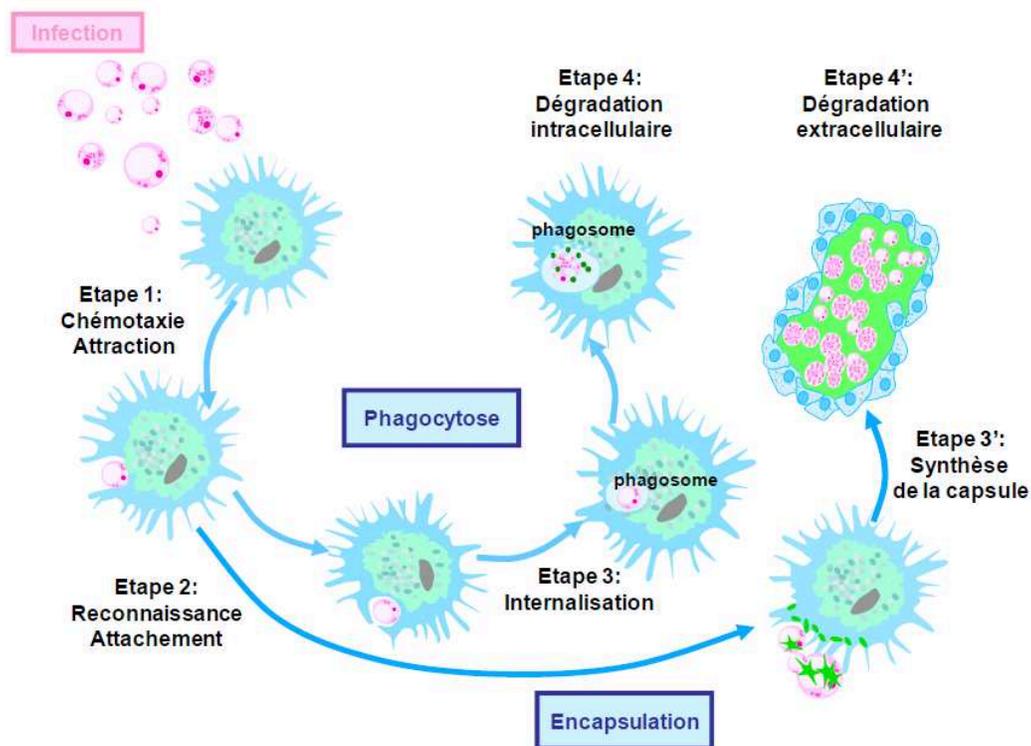


Figure 4 : Représentation schématique des processus de *phagocytose et d'encapsulation* (Le Grand 2010) d'après (Soudant et al. 2008))

1.5.2 Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les organismes qui dépendent d'un métabolisme aérobie doivent faire face à la production continue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme le radical oxygène $\cdot\text{O}_2$, l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ et la molécule de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Sies 1993, Storey 1996). Certaines conditions environnementales peuvent conduire à une augmentation de cette production (Sokolova 2011). La production d'ERO est liée à la consommation en oxygène des organismes et est proportionnelle à la quantité de mitochondries dans les tissus (Storey 1996). Les ERO doivent être rapidement éliminées pour limiter le stress oxydatif qui peut aboutir à des dommages au niveau de macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (ADN, protéines, lipides) (Sies 1993, Storey 1996). Des composés antioxydants permettent aux organismes de se protéger des ERO. Il peut s'agir de composés non-enzymatiques comme les caroténoïdes, flavonoïdes, les vitamines A, C, E (Sies 1993, Storey 1996). Les autres composés antioxydants sont des enzymes (Figure 5). L'anion superoxyde est converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Le peroxyde d'hydrogène est transformé en H_2O et O_2 par la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx) et la thiorédoxine peroxydase TrxP en fonction de la concentration de H_2O_2 (Manduzio et al. 2005). L'activité de la GPx est régulée par la glutathion réductase (GR) et celle de la TrxP par la thioredoxine réductase (TrxR). La glutathion S-transférase (GST) est quant à elle impliquée dans la détoxification des xénobiotiques (Hermes-Lima 2004, Manduzio et al. 2005).

Les ERO et les espèces réactives de l'azote (ERN), comme l'oxyde nitrique $\cdot\text{NO}$ produit à partir de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), sont impliquées dans la défense immunitaire des invertébrés marins. Leur toxicité permet la destruction des agents pathogènes (Storey 1996, Abele & Puntarulo 2004, Soudant et al. 2013, Donaghy et al. 2015).

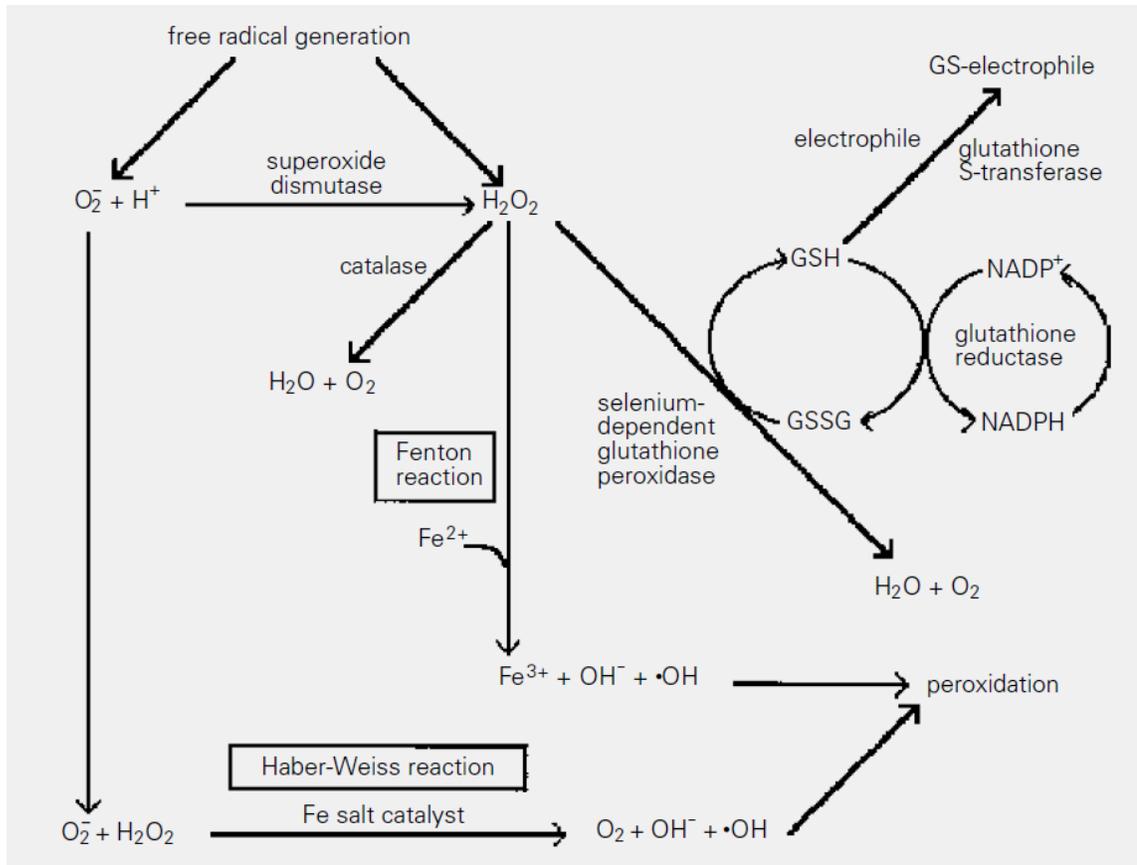


Figure 5: Présentation des différentes voies de synthèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'action de certaines enzymes impliquées dans la défense antioxydante de la cellule (Storey 1996)

1.6 Membranes cellulaires et acides gras

Les membranes plasmiques constituent une barrière essentielle entre la cellule et son environnement, mais aussi entre les différents compartiments cellulaires que sont les organites (Rawn 1989). Elles sont aussi des surfaces d'échange au travers desquelles passent des ions et des molécules. Les membranes mitochondriales ont un rôle bioénergétique, car elles sont le siège de la production d'ATP par transport d'électrons et la réalisation d'un gradient de protons. Le rôle des membranes est alors central pour le bon fonctionnement cellulaire et repose sur leur intégrité.

Les principaux composants de la membrane sont les lipides, principalement des phospholipides, des glycolipides et du cholestérol, qui sont associés à des protéines par des liaisons non-covalentes. Les lipides sont constitués d'une tête polaire hydrophile et de queues non-polaires hydrophobes, ce qui est à l'origine de la configuration en bicouche des membranes cellulaires. Il s'agit de mosaïques fluides dans lesquelles les constituants sont en mouvement. Cette fluidité est nécessaire à l'activité des protéines et à la transduction de signaux.

Les éléments constitutifs des queues non-polaires des lipides sont les acides gras (AG), constitués d'une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxyle. Ils se différencient par la longueur de leur chaîne carbonée, ainsi que par le nombre et la position de double liaisons, aussi appelées insaturations. Une des nomenclatures utilisée pour l'identification des AG est la suivante : C:Xn-Y, où C est le nombre de carbone, X est le nombre d'insaturations et Y indique la position de la première double liaison à partir du groupe méthyle terminal. Lorsque les AG ne possèdent pas d'insaturation il s'agit d'AG saturés, s'ils en possèdent une, ils sont dits monoinsaturés et quand ils ont plus d'une double liaison ils sont polyinsaturés.

Les principaux AG constitutifs des lipides membranaires contiennent des chaînes saturées ou insaturées de 14, 16, 18 à 20 atomes de carbone. Le degré d'insaturation de la membrane détermine sa fluidité (Rawn 1989). Dans les organismes, l'élongation ou la désaturation du 16:0 permet la synthèse des autres AG. La majorité des organismes marins, dont les huîtres, ne sont pas capables de convertir le 18:2n-3 et le 18:3n-3 en AG polyinsaturés (AGPI) à longues chaînes, comme le 20:4n-6 (acide arachidonique), le 20:5n-3 (acide eicosapentanoïque) ou encore le 22:6n-3 (acide docosahexaénoïque) qui doivent donc être apportés par l'alimentation (Figure 6).

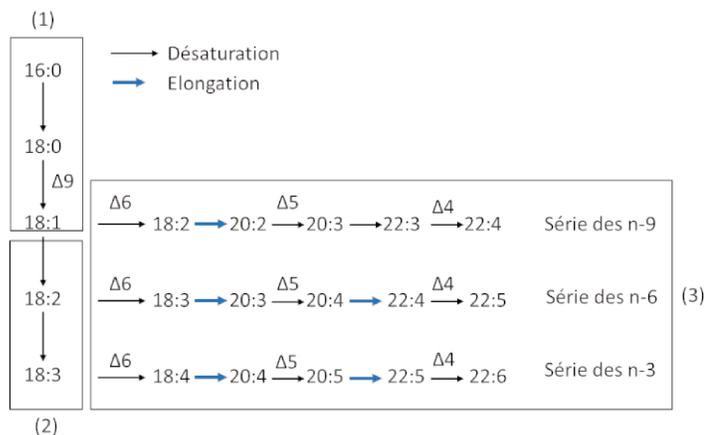


Figure 6: Voies de synthèse des principaux acides gras chez le phytoplancton (1+2+3) et les mollusques marins (1) (Kraffe 2003)

Les AGPI peuvent être oxydés par les ERO si ces dernières ne sont pas neutralisées par le système antioxydant (Sies 1993). Cette réaction est auto-catalytique et conduit à la formation d'hydroperoxydes lipidiques dont la présence peut altérer l'intégrité et le fonctionnement de la membrane en modifiant sa perméabilité, sa fluidité, ou encore le fonctionnement de protéines (Sies 1993, Storey 1996). La sensibilité des membranes au dommage oxydatif peut être estimée par l'indice d'insaturation (Hulbert 2003). Plus cet indice est faible, plus le stress oxydatif est important. Les dommages membranaires causés par le stress oxydatif pourraient être réduits par la présence de plasmalogènes qui sont particulièrement riches chez les invertébrés marins et qui sont susceptibles d'avoir un rôle antioxydant (Kraffe et al. 2004, Hulbert et al. 2014). Les plasmalogènes sont une sous-classe de phospholipides caractérisée par la présence d'une liaison vinyl-éther en position sn-1 à la place de la liaison ester (Hulbert et al. 2014). Cette liaison vinyl-éther contient une insaturation qui est très sensible aux attaques par les ERO et épargne ainsi les autres AGPI (Hulbert et al. 2014). Le produit de la réaction entre les plasmalogènes et les ERO ne propage pas le phénomène de peroxydation lipidique (Hulbert et al. 2014). La présence des plasmalogènes dans la membrane permet donc de neutraliser les ERO et d'arrêter la réaction auto-catalytique de peroxydation lipidique (Hulbert et al. 2014). Les AG non-maloniques (NMI) et le 20:1n-11 sont sélectivement incorporés dans les plasmalogènes (Kraffe et al. 2004).

Chez la palourde *Ruditapes philippinarum* et l'huître *C. gigas*, l'enrichissement des membranes hémocytaires en 20:4n-6 stimule la phagocytose et l'activité oxydante des cellules immuno-compétentes (Delaporte et al. 2003, Segueineau et al. 2011). Cette stimulation de l'activité oxydante pourrait s'expliquer par le rôle du 20:4n-6 en tant que précurseur des eicosanoïdes (Calder 2001). Les eicosanoïdes, que sont les prostaglandines, les thromboxanes, les prostacyclines, et les leucotriènes sont des dérivés d'oxydation d'AG aux multiples fonctions. Ils sont impliqués dans la reproduction, le transport d'eau et de sels ou encore la défense immunitaire (Stanley-Samuels 1994).

2 Mortalité massive de l'huître *Crassostrea gigas* infectée par l'ostreïd herpesvirus OsHV-1

2.1 Historique de la maladie

Rapidement après son introduction en France, *C. gigas* a été touchée par des épisodes de mortalité. Les ostréiculteurs pouvaient perdre jusqu'à 30% de leur stock. Ces événements se déroulaient lorsque la température était supérieure à 19 °C et touchaient les animaux en période de reproduction (Samain & McCombie 2008).

En 2008, l'ampleur des épisodes de mortalité s'est intensifiée et a touché spécifiquement les huîtres âgées de moins d'un an. Depuis, ce phénomène de mortalité massive se manifeste chaque année en France, lorsque la température de l'eau de mer est comprise entre 16 et 24 °C (Pernet et al. 2012, Petton et al. 2013, Renault et al. 2014). D'autres pays sont concernés par cette mortalité en Europe (Peeler et al. 2012, Roque et al. 2012, Clegg et al. 2014), mais aussi en Océanie (Jenkins et al. 2013, Paul-Pont et al. 2013a, b, Burge et al. 2014, Keeling et al. 2014, Paul-Pont et al. 2014). L'origine de cette mortalité s'explique par l'émergence d'un nouveau génotype appelé μ var (Segarra et al. 2010, Schikorski et al. 2011a, Schikorski et al. 2011b). Il diffère du génotype référent au niveau des cadres de lecture ouverte (ORFs) 4 et 43 (Segarra et al. 2010). En France, bien que les deux génotypes (référent et μ var) aient été détectés de manière équivalente en 2008, le variant μ Var s'est imposé depuis 2009-2010 (EFSA 2015 pour revue).

2.2 L'agent pathogène : l'ostreïd herpesvirus OsHV-1

2.2.1 Distribution

Le virus OsHV-1 et ses variants ont été observés dans de nombreuses régions du monde (Martenot 2013) (Figure 7). La souche μ var est maintenant distribuée tout le long de la côte européenne, au Portugal (Batista et al. 2015), Espagne (Roque et al. 2012), Italie (Dundon et al. 2011, Domeneghetti et al. 2014),

mais aussi en Irlande (Lynch et al. 2012, Peeler et al. 2012, Clegg et al. 2014, Morrissey et al. 2015) et en Scandinavie (Gittenberger et al. 2016, Mortensen et al. 2016). Des variants du virus sont aussi présents en Australie (Jenkins et al. 2013, Paul-Pont et al. 2013b, Paul-Pont et al. 2014) et Nouvelle-Zélande (Keeling et al. 2014). Ainsi, OsHV-1 μ var pose un problème pour la production d’huître du Pacifique dans le monde.

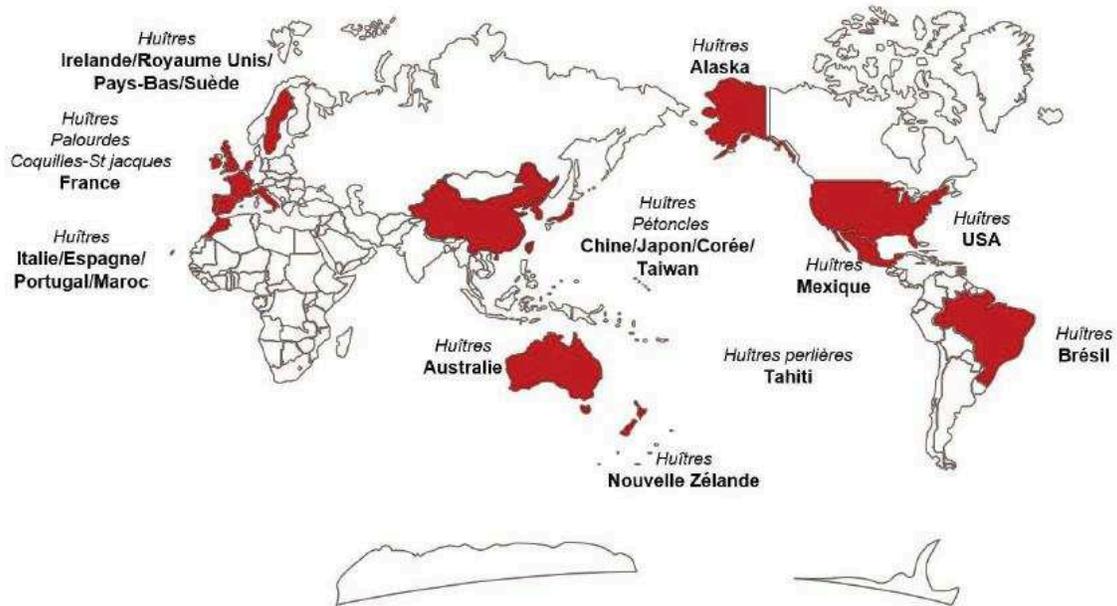


Figure 7: Distribution d’OsHV-1 et de ses variants (Ségarra 2014)

2.2.2 Morphologie et organisation du génome

Le virus OsHV-1 est un herpèsvirus de 116 nm de diamètre, constitué d’un nucléoïde (ADN à double brin), d’une capsidie icosaédrique, d’un tégment et d’une enveloppe (Davison et al. 2005) (Figure 8). L’enveloppe consiste en une membrane lipidique qui contient des protéines dont certaines sont glycosylées et participent à l’attachement et à la pénétration du virus dans les cellules de l’hôte (Ségarra 2014).

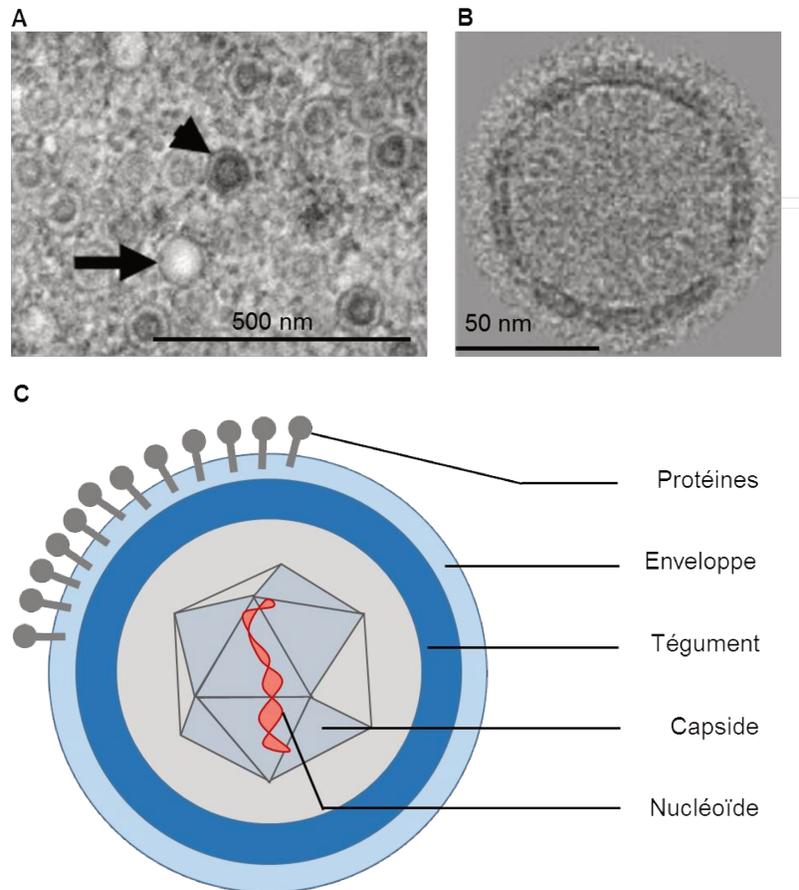


Figure 8: (A) Microscopie du virus OsHV-1 dans le noyau d'une cellule du manteau d'huître *C.gigas* (Schikorski et al. 2011a), (B) cryo-microscopie électronique d'une capsid d'OsHV-1 (Davison et al. 2005), (C) structure d'un herpesvirus

Le génome viral a été séquencé (GenBankAY509253) et est constitué de 207 kpb et de 124 ORFs (Davison et al. 2005). L'organisation globale du génome d'OsHV-1 est proche de celle des herpesvirus qui infectent les mammifères (Davison et al. 2005). Il comprend deux régions uniques, un fragment long U_L de 167.8 kpb et un fragment court U_S de 3.4 kpb. Des séquences répétées inversées encadrent ses fragments. Les séquences identiques qui encadrent le fragment long font 7.6 kpb et se trouvent aux extrémités terminale (TR_L) et interne (IR_L). De la même façon, les séquences TR_S et IR_S de 9.8 kpb encadrent le fragment court. Enfin, une séquence de 1.5 kpb se trouve entre les séquences IR_L et IR_S , il s'agit de la séquence X (Figure 9).

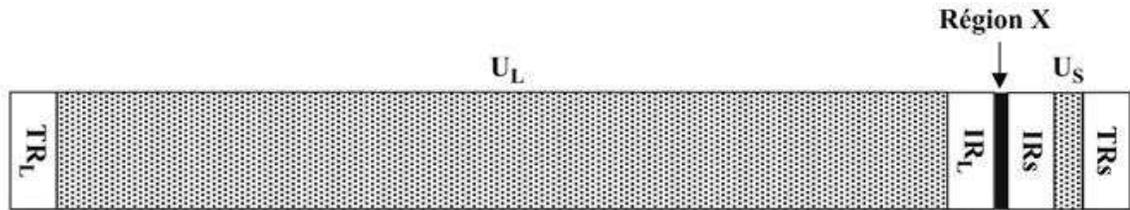


Figure 9: Organisation du génome viral d'OsHV-1 (modifié de Martenot (2013))

Les données de séquençage ont permis d'identifier que (i) 12 gènes codent pour des enzymes telles que des ATPase, des hélicases, des primases, des ADN polymérase ou des ribonucléotide réductases, (ii) 18 gènes codent pour des protéines membranaires, (iii) 9 gènes codent pour des protéines à motif en doigt de zinc, impliquées dans la transcription, (iv) 4 gènes codent pour des inhibiteurs d'apoptose et (v) 81 gènes codent pour des protéines de fonctions inconnues (Davison et al. 2005, Ségarra 2014).

2.2.3 Réplication virale

Le cycle hypothétique de réplication d'OsHV-1 est proposé à partir des résultats de Jouaux et al. (2013) et de Ségarra et al. (2014c) (Figure 10).

L'étape initiale d'une infection virale est la reconnaissance qui consiste à l'attachement du virus à des récepteurs des cellules hôtes. A ce jour, le mécanisme d'entrée d'OsHV-1 dans les cellules n'est pas connu, mais des travaux suggèrent l'implication de protéines de type intégrine (Jouaux et al. 2013) ou glypican (Segarra et al. 2014c). Le mécanisme d'entrée de la capside du virus OsHV-1 nécessite l'intervention de composants du cytosquelette comme l'actine (Jouaux et al. 2013). La réplication virale est nucléaire, la capside doit donc être transloquée vers le noyau. La capside d'OsHV-1 est transportée vers le pore nucléaire par des microtubules (Jouaux et al. 2013). L'ADN viral est ensuite libéré dans le noyau afin d'être transcrit et répliqué. Une fois la nouvelle capside assemblée, l'ADN viral conditionné y prend sa place pour former la nucléocapside. Cette dernière fusionne avec les membranes nucléaires interne et externe avant de rejoindre le cytoplasme. L'acquisition de l'enveloppe se fait au niveau du réseau trans-

golgien qui forme une vésicule. Les virions matures entrent dans cette vésicule pour être transportés vers la membrane cellulaire et être finalement libérés en dehors de la cellule par exocytose.

Les herpesvirus peuvent rester à l'état de latence, c'est-à-dire qu'ils persistent dans l'hôte sans entrer dans un cycle lytique. Le génome viral est alors intégré dans l'ADN de l'hôte ou sous forme circulaire dans le noyau. La sortie de l'état de latence peut se faire en réponse à des conditions stressantes. Ce phénomène n'a pas encore été mis en évidence chez OsHV-1.

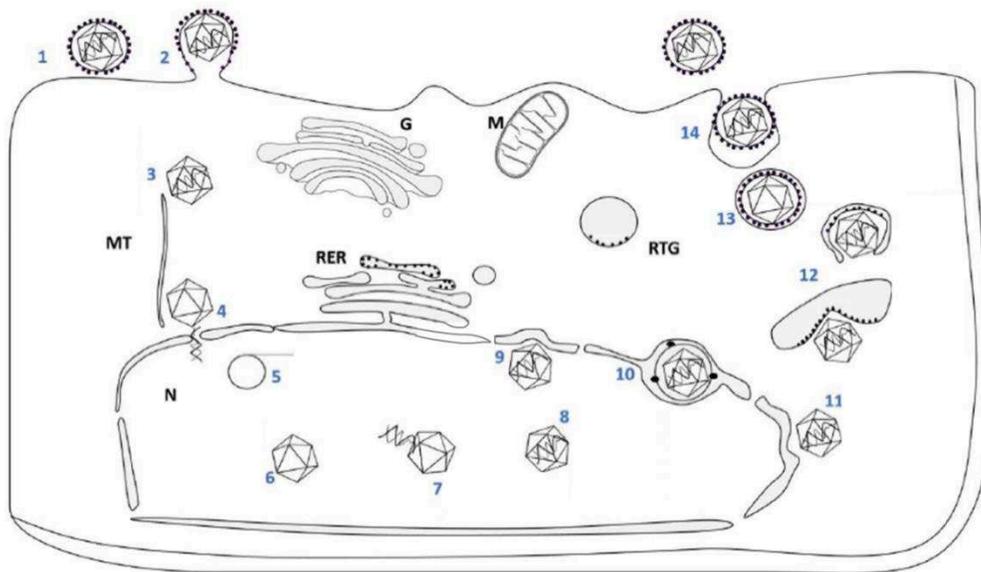


Figure 10: Cycle de réplication hypothétique (Ségarra 2014).

(1) Adsorption du virus au niveau de la cellule hôte, (2) fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de la cellule hôte, (3) transport de la capsidie virale vers le pore nucléaire, (4) libération de l'ADN viral dans le noyau (N), (5) transcription, (6) assemblage de la capsidie, (7 et 8) conditionnement et entrée de l'ADN viral dans la capsidie pour former la nucléocapsidie, (9 et 10) fusion de la nucléocapsidie avec les membranes nucléaires interne et externe, (11) libération cytoplasmique de la nucléocapsidie, (12) acquisition de l'enveloppe au niveau du réseau transgolgien (RTG), (13) transport vers la membrane cellulaire et (14) libération de la nouvelle particule virale par exocytose.

2.3 Facteurs de risque de l'infection par OsHV-1

Les épisodes de mortalité massive d'huîtres âgées de moins d'un an se manifestent en Europe lorsque la température de l'eau de mer est comprise entre 16 et 24 °C (Oden et al. 2011, Pernet et al. 2012, Petton et al. 2013, Renault et al. 2014) et en Australie entre 22 et 26°C (Jenkins et al. 2013, Paul-Pont et al. 2013a, de Kantzow et al. 2016a).

Lorsque la température de l'eau de mer est inférieure à 14°C, la mortalité induite par OsHV-1 est réduite (Petton et al. 2013, Pernet et al. 2015, de Kantzow et al. 2016a). Il semble qu'à basse température, le virus persiste de manière silencieuse dans les huîtres, mais il se réactive lors d'une augmentation de ce paramètre et provoque la mortalité (Pernet et al. 2015). Ainsi, l'application de températures basses n'est pas une solution pour limiter la mortalité des huîtres par OsHV-1. La piste maintenant explorée est l'application de températures supérieures à 24 °C, qui semblent être permissives pour la maladie. Une étude en laboratoire a d'ailleurs montré que la virulence d'OsHV-1 est réduite à 25°C en comparaison à 16°C (Martenot et al. 2015).

L'eau est la voie de transmission d'OsHV-1 entre individus (Schikorski et al. 2011a, Paul-Pont et al. 2013b). Dans l'environnement, la distance sur laquelle une infection virale est transmise dépend de l'interaction de l'hydrodynamique avec l'excrétion virale par des organismes infectés et le temps de persistance du virus en dehors de son hôte (Murray 2013).

La nature lipidique des enveloppes d'herpèsvirus en fait des virus fragiles (Mojica & Brussaard 2014) et la persistance d'OsHV-1 en dehors de son hôte devrait être relativement courte, de 2 à 7 jours (Hick et al. 2016). Dans la colonne d'eau, les virus sont exposés aux radiations solaires, à des communautés microbiennes et peuvent être adsorbés à des particules en suspension, tout cela peut influencer leur persistance dans le milieu (Suttle & Chen 1992, Munro et al. 2003, Mojica & Brussaard 2014).

Des virus de type herpès ont été détecté chez plusieurs espèces de bivalves comme les huîtres plates *Ostrea edulis* (Comps & Cochenec 1993), et *Ostrea angasi* (Hine & Thorne 1997), *Tiostrea chilensis* (Hine et al. 1998), mais aussi la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Renault et al. 2001) et la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Arzul et al. 2001). En ce qui concerne les variants d'OsHV-1, il ont été retrouvés dans la telline *Donax trunculus*, les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Martenot 2013, pour revue).

Les huîtres font partie d'écosystèmes et sont donc en interaction avec d'autres organismes dont le rôle dans la transmission d'OsHV-1 reste peu connu. Le risque de mortalité a été réduit lorsque des huîtres *C. gigas* ont été déployées dans des élevages de moules, en comparaison à celles situées dans des élevages d'huîtres (Pernet et al. 2012). De même, en Australie, le départ d'un événement de mortalité lié à OsHV-1 a été retardé lorsque des huîtres *C. gigas* ont été élevées auprès d'huîtres *Saccostrea glomerata* (Paul-Pont et al. 2013a). Les organismes filtreurs pourraient ainsi limiter le risque d'infection en réduisant la quantité d'agents pathogènes dans le milieu (Ben-Horin et al. 2015, Burge et al. 2016). A l'inverse, ils pourraient agir comme réservoir et faciliter la transmission de la maladie (Pernet et al. 2016, pour revue).

Une étude spatialisée dans la lagune de Thau a mis en évidence que le risque de mortalité est supérieur au sein des concessions conchylicoles qu'en dehors (Pernet et al. 2014b). Cela confirme que l'aquaculture favorise le développement de maladies.

De plus, certaines pratiques culturales sont plus à risque que d'autres (Paul-Pont et al. 2013a, Normand et al. 2014a, Pernet et al. 2014b, de Kantzow et al. 2016b). Par exemple, une amélioration de la survie par une augmentation de la hauteur d'élevage en zone intertidale s'expliquerait par un temps d'immersion réduit et donc une exposition plus faible des huîtres aux particules virales (Paul-Pont et al. 2013a, Whittington et al. 2015a). La biomasse exploitée est un facteur à prendre en compte dans la transmission des maladies en aquaculture. En milieu contrôlé, la mortalité d'huîtres infectées par OsHV-1

est positivement corrélée à la biomasse d'animaux infectieux et négativement corrélée au renouvellement de l'eau de mer. Ces deux paramètres influencent la concentration des particules virales (Petton et al. 2015a).

La dynamique spatiale et temporelle de la mortalité induite par OsHV-1 est influencée par la qualité de l'environnement trophique et donc le statut énergétique des huîtres. Le risque de mortalité diminue en effet lorsque les huîtres ont une alimentation de qualité et un contenu énergétique plus important (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014a).

Des facteurs intrinsèques à l'huître modulent l'expression de la maladie comme l'âge, la génétique, et l'état physiologique (EFSA 2015, pour revue). En effet les huîtres âgées de moins d'un an sont plus sensibles à la maladie induite par OsHV-1 μvar que les adultes (Pernet et al. 2016, pour revue). Plusieurs études supportent l'hypothèse d'une base génétique de la résistance à la maladie (Barbosa Solomieu et al. 2015, pour revue). Des familles d'huîtres résistantes à OsHV-1 ont été sélectionnées (Degremont et al. 2010, Degremont 2011, 2013, Dégremont et al. 2015a, Dégremont et al. 2015b). Au stade naissain des huîtres résistantes à OsHV-1 sont aussi plus résistantes à la bactérie *V. aesturianus* (Azéma et al. 2015). En revanche, ce n'est plus le cas au stade adulte où les huîtres résistantes au virus meurent davantage lors d'une infection par *V. aesturianus* que des huîtres non résistantes (Azéma et al. 2015).

Des études ont montré l'implication des bactéries dans la dynamique de la maladie. Des huîtres préalablement infectées sur le terrain lors d'un événement de mortalité et ramenées en laboratoire ont été colonisées par des bactéries du genre *Vibrios* avant le déclenchement de la réplication virale et l'apparition de la mortalité (Petton et al. 2015b). Le début de la maladie est aussi marqué par un remplacement progressif de microorganismes bénins par une population virulente de *Vibrio* (Lemire et al. 2015). Aussi, l'application d'antibiotique sur des huîtres infectées sur le terrain a réduit la mortalité (10 % vs 36%) malgré la détection d'ADN d'OsHV-1 (Petton et al. 2015b).

2.4 Changements physiologiques de *C. gigas* associés à l'infection par OsHV-1

Les huîtres infectées par OsHV-1 consomment leurs réserves en glucides et lipides mais aussi des protéines reflétant ainsi le coût énergétique de la réponse immunitaire et de la synthèse de molécules nécessaires à l'assemblage du virus (Tamayo et al. 2014). Cela est d'ailleurs confirmé par une étude protéomique qui a montré que des huîtres infectées par OsHV-1 accumulent des protéines impliquées dans la glycolyse et la lipolyse (Corporeau et al. 2014). La diminution de la prise alimentaire durant l'infection par OsHV-1 pourrait expliquer la moindre quantité de stérols chez des huîtres infectées en comparaison à des huîtres non infectées (Tamayo et al. 2014).

Le virus OsHV-1 provoque le remodelage du cytosquelette de *C. gigas* et module l'accumulation de protéines ou l'expression de gènes impliqués dans la synthèse virale (Jouaux et al. 2013, Corporeau et al. 2014, Rosani et al. 2015). Lors d'une infection par OsHV-1, l'huître module l'expression de gènes de l'immunité, impliqués dans la réponse antivirale ou antibactérienne comme par exemple le gène *interferon induced protein 44 (IFI44)* qui est souvent surexprimé lors d'une infection virale, mais aussi des gènes codant pour des protéines inhibitrices de l'apoptose (Renault et al. 2011, Jouaux et al. 2013, Corporeau et al. 2014, Normand et al. 2014b, Segarra et al. 2014a, Rosani et al. 2015).

Le système antioxydant est aussi affecté par la présence du virus OsHV-1 qui modifie l'abondance de certaines enzymes ou l'expression de gènes codants pour celles-ci, comme la superoxyde dismutase, la catalase ou encore la glutathion S-transférase (Corporeau et al. 2014, Normand et al. 2014b).

3 La salinité

3.1 Notions d'osmolarité et de salinité

L'osmolarité est la concentration en solutés osmotiquement actifs (osmolytes) d'une solution, elle se mesure en mOsm l^{-1} . Les osmolytes peuvent être des solutés inorganiques tels que les ions sodium (Na^+), le potassium (K^+), le magnésium (Mg^{2+}) ou des solutés organiques comme les acides aminés libres.

La salinité est la concentration en sels d'une solution et se mesure en g l^{-1} ou en ‰. Par exemple, la salinité de l'eau de mer est en moyenne de 35‰. Les principaux sels retrouvés dans l'eau de mer sont le Na^+ , le Cl^- , le Mg^{2+} , le sulfate, le calcium (Ca^{2+}). Ces ions inorganiques sont osmotiquement actifs et l'osmolarité de l'eau de mer est en moyenne de 1 000 mOsm l^{-1} . Ainsi, une modification de la salinité du milieu est accompagnée d'un changement de l'osmolarité.

3.2 Les bivalves estuariens : des organismes euryhalins et osmoconformes

De nombreuses espèces de bivalves vivent dans des zones estuariennes et côtières, caractérisées par de grandes fluctuations de salinité. Ces espèces sont dites euryhalines, c'est à dire qu'elles sont capables de survivre à de grandes variations de salinité souvent comprises entre 5 et 40‰ (Gosling 2003). Chaque espèce est caractérisée par une salinité optimale, celle de l'huître américaine *C. virginica* est comprise entre 14 et 28‰ (Gosling 2003) alors que pour l'huître du Pacifique l'optimum est entre 20 et 25‰ (FAO). Des espèces appartenant au même genre peuvent présenter une tolérance à la salinité contrastée. Par exemple, chez les palourdes du genre *Ruditapes*, l'espèce *R. corrugata* est moins tolérante aux salinités extrêmes que *R. philippinarum* et *R. decussatus*. (Carregosa et al. 2014b). La tolérance à la salinité varie au cours du développement. Les premiers stades larvaires de l'huître américaine sont par exemple plus sensibles aux faibles salinités que les stades juvéniles (Volety et al. 2013) et adultes (Calvo et al. 1999).

La première réponse des bivalves marins à des changements importants de salinité est l'isolement par fermeture de leurs valves ou par enfouissement (Davenport et al. 1975, Shumway 1977a). Cette solution permet de protéger l'animal des modifications ioniques du milieu extérieur, mais provoque un arrêt ou une diminution de la filtration et peut conduire à une réduction de la croissance (Gosling 2003). L'acclimatation à la salinité se fait graduellement et prend plus ou moins de temps en fonction de l'amplitude du changement de salinité et de l'animal (Gosling 2003).

Les bivalves sont des animaux osmoconformes, c'est à dire que leurs fluides corporels ont la même osmolarité que le milieu extérieur. La tolérance à la salinité d'une espèce reflète sa plus ou moins grande capacité à réguler sa concentration interne en solutés. Le milieu extracellulaire de ces organismes, se met en équilibre osmotique avec le milieu extérieur par la régulation des concentrations en solutés inorganiques comme le Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ (Shumway 1977b, Yancey et al. 1982, Schmidt-Nielsen 1997, Carregosa et al. 2014a, Knowles et al. 2014) (Figure 11). Lorsque la salinité du milieu extracellulaire diminue, les cellules sont hypertoniques par rapport au milieu externe, ce qui provoque un influx d'eau vers la cellule. En conséquence, le volume cellulaire augmente. Les principaux effecteurs de la régulation du volume cellulaire chez les osmoconformes sont les acides aminés libres (Shumway et al. 1977, Yancey et al. 1982) et non les solutés inorganiques, qui peuvent perturber l'activité des enzymes et ainsi le métabolisme cellulaire des invertébrés marins (Bowlus & Somero 1979). Lorsque la salinité du milieu extracellulaire diminue, la concentration intracellulaire en acides aminés libres est réduite par synthèse protéique ou migration de ces solutés à l'extérieur de la cellule (la réciproque est vraie) (Schmidt-Nielsen 1997).

Les eicosanoïdes pourraient aussi être impliqués dans la régulation du transport de sels et d'eau chez les invertébrés (Stanley-Samuelson 1994). Dans les branchies de la moule *Modiolus demissus*, la production de prostaglandines augmente lors d'un choc hyposalin (Stanley-Samuelson 1994)

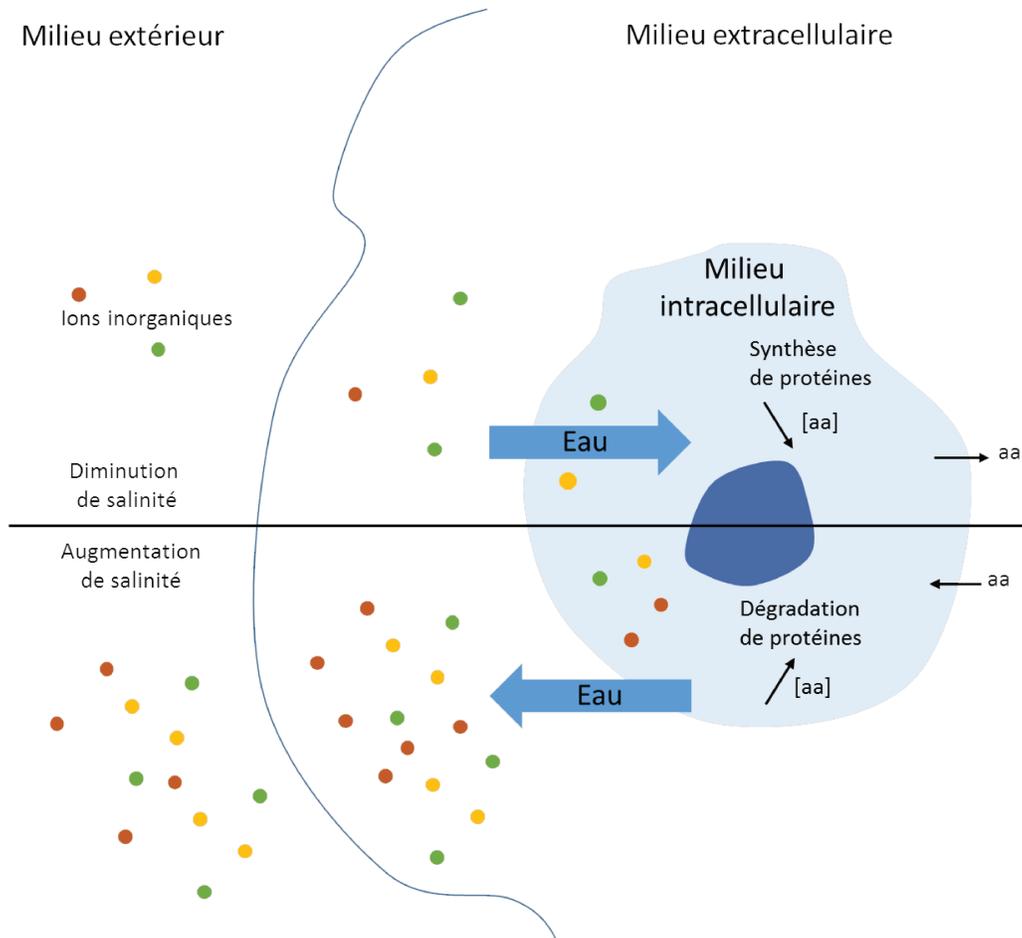


Figure 11: Gestion d'un changement de salinité et régulation du volume cellulaire chez un organisme osmoconforme

[aa] : concentration en acides aminés

3.3 Salinité et métabolisme énergétique

La réponse du métabolisme énergétique à un changement de salinité chez les bivalves marins dépend de l'amplitude et de la durée du phénomène.

Par exemple, des palourdes du genre *Ruditapes* exposées pendant 144 h aux salinités 0, 7, 14, 21, 28, 35 et 42‰, ont globalement maintenu leur contenu en glycogène (tous tissus) quelle que soit la salinité (Carregosa et al. 2014b). La conservation d'énergie s'expliquerait par une réduction de la consommation en oxygène lors de la fermeture des valves des animaux en réponse aux salinités extrêmes (Kim et al. 2001).

Une exposition de 4 à 6 semaines d'huître *C. virginica* à une eau de mer diluée (1/3) provoque une diminution de l'activité de (i) l'hexokinase dans les branchies, l'hépatopancréas et le manteau, (ii) de la fructose-1,6-biphosphatase, une enzyme de la néoglucogénèse, dans les branchies, l'hépatopancréas et le manteau (iii) de la 3-hydroxyacyl CoA déshydrogénase, une enzyme de la β -oxydation, dans les branchies, l'hépatopancréas et le muscle adducteur (Ballantyne & Berges 1991). Ainsi, à faible salinité, les besoins en glucides et lipides de l'huître américaine sont réduits (Ballantyne & Berges 1991). Les auteurs suggèrent que l'exposition des mollusques euryhalins à une salinité faible nécessite la réduction de l'activité de certaines enzymes en vue de maintenir les fonctions métaboliques. D'ailleurs dans cette même étude, l'activité de la citrate synthase, qui est un indicateur du métabolisme aérobie (Dahlhoff et al. 2002), est stable dans tous les organes à l'exception du manteau (Ballantyne & Berges 1991). Ainsi, après 4 à 6 semaines d'exposition à une eau de mer diluée, les huîtres ont maintenu ou rétabli un métabolisme aérobie.

Chez des juvéniles d'huître américaine une exposition de 11 semaines à 15‰ provoque une diminution du contenu lipidique par rapport à ce qui est observé dans les tissus d'huîtres à 30‰ (Dickinson et al. 2012). Cette consommation des réserves énergétiques est associée au maintien du contenu en ATP et donc du statut énergétique des animaux (Dickinson et al. 2012).

3.4 Salinité et système de défense

3.4.1 Système immunitaire

Les faibles salinités peuvent affecter l'intégrité des hémocytes de bivalves marins, par altération de la membrane (Hauton et al. 1998, Munari et al. 2010), modification du volume cellulaire (Matozzo et al. 2007) et provoquer la mort des cellules (Gagnaire et al. 2006). Chez les bivalves, la salinité modifie aussi la nature et la concentration des hémocytes circulants, avec une réponse spécifique à l'espèce (Reid et al.

2003, Matozzo et al. 2007, Bussell et al. 2008, Kuchel et al. 2010). Une infiltration d'hémocytes dans les tissus du tractus digestif a été observée chez l'huître *C. gigas* exposée à 9‰ (Knowles et al. 2014).

Les fonctions des hémocytes sont aussi affectées par les faibles salinités. Par exemple, chez l'huître *C. gigas*, une exposition de 7 jours à 15‰ et 45‰ provoque une augmentation de l'activité de la phagocytose en comparaison à 35‰ (Gagnaire et al. 2006). Une réduction de cette activité est observée chez la moule *M. edulis* après 2 jours à 16‰ par rapport à 32‰ (Bussell et al. 2008). L'apoptose est aussi diminuée chez l'huître américaine à 19‰ par rapport à 32‰ (Goedken et al. 2005). Aussi, une augmentation de l'activité lysosomale des hémocytes a été observée chez la palourde *Chamelea gallina* après 7 jours d'exposition aux salinités 28, 34‰ en comparaison à 40‰ (Matozzo et al. 2007). La cytotoxicité de l'hémolymphe est moindre à 25‰ par rapport à 38‰ chez la moule *M. galloprovincialis* (Malagoli & Ottaviani 2005). Une réduction de la phénoloxydase est observée chez *P. imbricata* et chez *S. glomerata* exposées à une faible salinité (Butt et al. 2006, Kuchel et al. 2010). Les résultats de ces études suggèrent une diminution des capacités de défense lorsque les bivalves marins sont exposés à des salinités en dehors de leur optimum.

3.4.2 Système antioxydant

Après une exposition de 4 h à 24.5‰ et une phase de 24 h de récupération à 35‰, une diminution de l'abondance d'enzymes antioxydantes est observée dans les branchies de moules *Mytilus* spp. (Tomanek et al. 2012).

Chez des palourdes du genre *Ruditapes* l'exposition aux salinités 0, 7 et 14‰ pendant 144 h provoque une augmentation des activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) (Carregosa et al. 2014b). Malgré la mise en place de la réponse antioxydante à ces salinités, la peroxydation lipidique a tendance à être plus élevée (Carregosa et al. 2014b). De la même manière, chez le bivalve, *Scapharca broughtonii*, une exposition de 120 h à des salinités de 25 et 45‰ provoque l'augmentation des

activités de la SOD et de la CAT, mais aussi de la peroxydation lipidique dans la glande digestive et les branchies (An & Choi 2010). Chez ces deux espèces, l'exposition à des salinités s'éloignant de l'optimum aboutit à court terme à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Chez la palourde *C. gallina*, une exposition de 7 jours à une salinité de 40‰ provoque une diminution de l'activité de la Mn-SOD et de la Cu/Zn-SOD dans les hémocytes, suggérant une moindre production d'anions superoxyde en milieu hypersalin, alors qu'une augmentation de la SOD extracellulaire est observée dans l'hémolymphe (Monari et al. 2007).

L'exposition de bivalves marins à une salinité en dehors de leur optimum peut augmenter la demande énergétique pour la régulation des concentrations en solutés pour le maintien de la pression osmotique des fluides corporels et le volume cellulaire. De plus, les salinités extrêmes altèrent directement les réponses immunitaire et antioxydante des bivalves, ce qui pourrait les rendre plus sensibles à des agents pathogènes.

3.5 Salinité et maladies de bivalves

La prévalence de maladies impliquant des protistes du genre *Perkinsus* et *Haplosporidium* est réduite lorsque la salinité est inférieure à 15‰ (Andrews 1983, Ford 1985, Calvo et al. 1999, La Peyre et al. 2003, Burrenson & Ford 2004, Hofmann et al. 2009, Ford et al. 2012, Binias et al. 2013, Soudant et al. 2013, Arzul & Carnegie 2015). De même, la prévalence du parasite *Bonamia ostreae* de l'huître plate *Ostrea edulis* est supérieure lorsque les étés sont caractérisés par une salinité élevée (Arzul et al. 2006).

Les protistes responsables de ces maladies sont perméables aux ions et sont sensibles à la salinité car ils sont incapables de réguler leur volume cellulaire. Ils sont alors endommagés en quelques minutes par de faibles salinités (Ford & Haskin 1988, Burrenson et al. 1994).

Lorsqu'ils sont libres dans la colonne d'eau les virus marins sont exposés aux variations de salinité. De manière globale, la salinité peut altérer la structure du virus, son adhésion à l'hôte ou encore l'injection

du matériel génétique (Cordova et al. 2003, Mojica & Brussaard 2014). Les capsides virales ont une perméabilité variable à l'eau et aux sels. Lors d'un changement brutal de la salinité, les capsides peuvent être altérées conduisant à la destruction et/ou l'inactivation du virus. Les virus enveloppés semblent particulièrement sensibles aux variations osmotiques (Kukkaro & Bamford 2009).

A notre connaissance, aucune étude ne porte sur l'effet de la salinité sur une infection de bivalve par un virus. En revanche l'effet de la salinité a été étudié pour l'interaction entre la crevette et le virus du syndrome de la tâche blanche (WSSV). Dans les fermes de production, les précipitations sont souvent associées à une mortalité de crevettes infectées par le WSSV (Ramos-Carreño et al. 2014, Van Thuong et al. 2016). La prolifération de ce virus est favorisée lors d'un choc salin qui réduit les capacités de défense de l'hôte (Liu et al. 2006).

4 Le pH

4.1 Les notions de pH et de PCO₂

L'échelle de pH la plus appropriée est la mesure de la concentration totale en ions hydrogène (Riebesell et al. 2011). Le pH est défini comme : $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$, où $[\text{H}^+]$ représente la concentration totale en ions H^+ du milieu, c'est à dire la somme de la concentration de la forme libre et des concentrations de tous les complexes que l'ion H^+ forme avec d'autres espèces (H_2O , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- et SO_4^{2-}). Le pH n'a pas d'unité.

La PCO₂ atmosphérique est la pression partielle en CO₂ dans l'atmosphère. Elle est aujourd'hui d'environ de 400 ppm (parties par million) (NOAA 2017).

4.2 Rappels sur l'acidification des océans

L'atmosphère est majoritairement composée d'azote (78 %), de dioxygène (21 %) et de gaz plus rares (1 %), parmi lesquels le dioxyde de carbone (CO_2). Depuis le début de l'ère industrielle, la combustion de matière fossile, l'utilisation des terres agricoles et la déforestation, ont contribué à l'enrichissement de l'atmosphère en CO_2 (Sabine et al. 2004). Depuis la fin des années 1800, la quantité de CO_2 atmosphérique a en effet augmenté de 40% et est passée de 280 à 380 ppm en 2005 (Raven et al. 2005) et est aujourd'hui de 400 ppm (NOAA 2017). Le CO_2 étant un gaz à effet de serre, l'une des conséquences de sa plus riche teneur dans l'atmosphère est l'augmentation de la température à la surface du globe. Celle-ci a augmenté de 0.7 °C à l'échelle du dernier (IPCC 2007) et sur la base de 6 modèles le GIEC prévoit une augmentation de 1.8 à 4 °C d'ici la fin du 21^{ème} siècle (IPCC 2007).

Environ 30 % du CO_2 émis dans l'atmosphère se dissout dans les eaux de surface (< 200 m de profondeur). L'océan agit donc comme un puit de carbone et limite le réchauffement climatique. En passant dans l'océan, le CO_2 se dissout et forme de l'acide carbonique (H_2CO_3) (Figure 12). Cela a pour conséquence la diminution du pH de l'océan (Sabine et al. 2004). On parle d'acidification des océans (AO), « l'autre problème du CO_2 » (Doney et al. 2009). Depuis la fin des années 1800, le pH de l'eau de mer a diminué de 0.1 unité pH (Caldeira & Wickett 2003) ce qui correspond à une augmentation de la concentration en ions H^+ de 30% (Raven et al. 2005). Selon les modèles pour lesquels les émissions de gaz à effets de serre sont les plus importantes (A2, A1F1) il est prédit que le CO_2 atmosphérique atteindrait plus de 800 ppm, ce qui engendrerait une baisse du pH de 0.3-0.4 unités (Orr et al. 2005).

Dans l'océan, le CO_2 dissout est un constituant de trois espèces inorganiques : le CO_2 aqueux (1%), le bicarbonate (HCO_3^- , 91%) et le carbonate (CO_3^{2-} , 8 %) (Raven et al. 2005). Ces 3 molécules confèrent un pouvoir tampon à l'océan. En effet, le CO_2 aqueux réagit avec le CO_3^{2-} pour former du HCO_3^- . Cette réaction abaisse la concentration en H^+ et limite la réduction du pH. Toutefois, cette réaction réduit la

concentration en ions CO_3^{2-} utilisés par les organismes calcifiants dans la synthèse de leur coquille (Raven et al. 2005, Doney et al. 2009) (Figure 13).

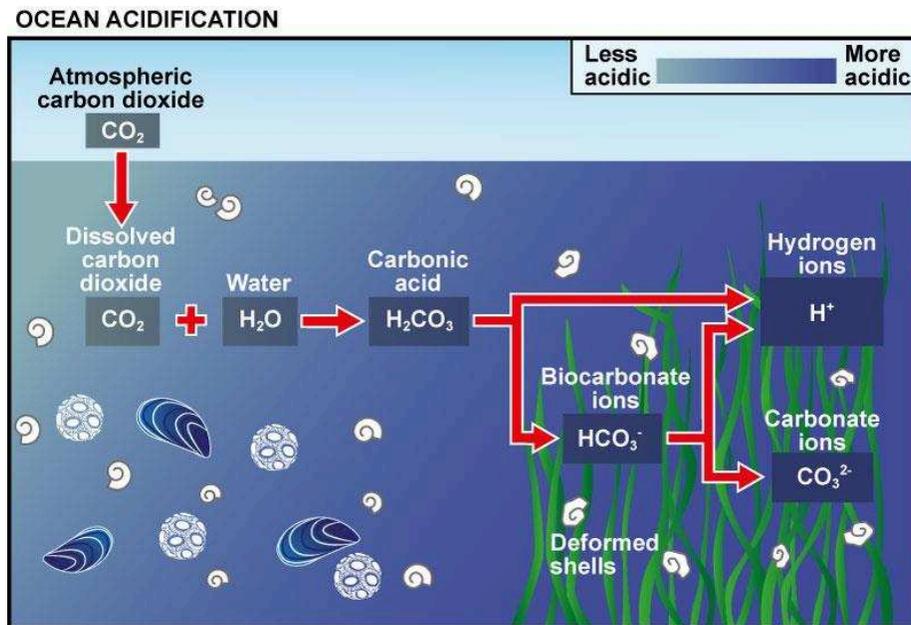


Figure 12: Schéma explicatif de l'acidification des océans

http://www.oceanacidification.org.uk/Oarp/media/images/oa_800.jpg

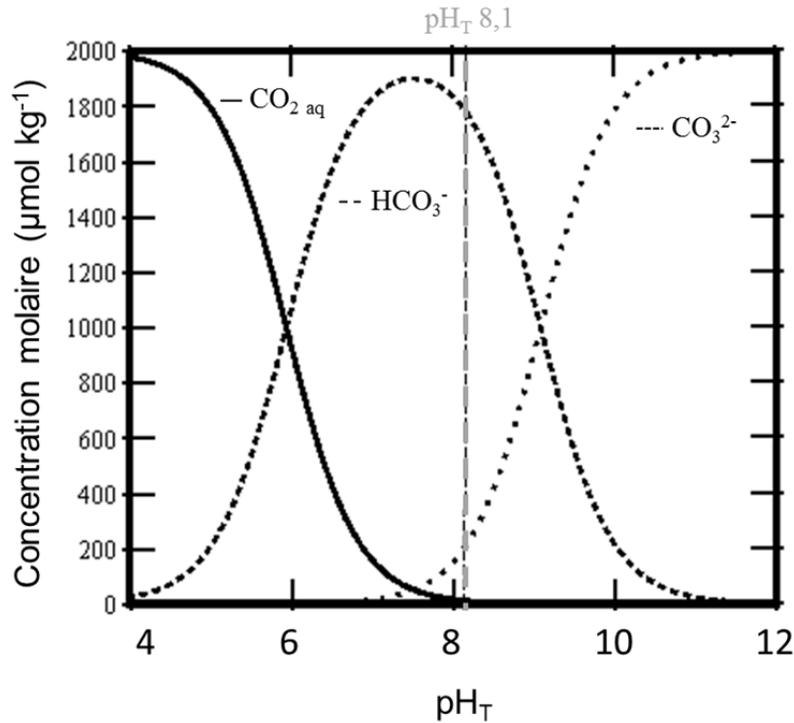


Figure 13: Répartition des différentes espèces de carbone inorganique dissous en fonction du pH (mesuré sur l'échelle totale) (Solomon et al. 20017)

4.3 Effet du pH sur les organismes marins

De manière générale, l'AO réduit la survie, la calcification, la croissance, ainsi que le développement des organismes marins, et ce à des amplitudes variables selon les espèces et le stade de développement (Gazeau et al. 2013, Kroeker et al. 2013, Parker et al. 2013). Les espèces calcifiantes telles que les coraux, les larves d'échinodermes et surtout les mollusques sont les organismes les plus sensibles à l'AO (Kroeker et al. 2013) (Figure 14). Par exemple, le taux de calcification des moules et des huîtres diminue respectivement de 25 et 10% quand elles sont exposées à une PCO₂ élevée de 780 ppm (Gazeau et al. 2007). Les gamètes ou les stades précoces de développement, comme le stade larvaire, ont une sensibilité accrue en comparaison au stade adulte, ce qui pourrait avoir des conséquences sur le renouvellement et la pérennité des espèces (Dupont et al. 2010).

X	Réduction > 25%	Réduction < 25%	Pas d'effet	Augmentation < 25%
---	-----------------	-----------------	-------------	--------------------

Non testé
nombre d'études insuffisant

Taxon	Réponse	Effet moyen	Taxon	Réponse	Effet moyen
 Algues calcifiantes	Survie	X	 Crustacées	Survie	
	Calcification			Calcification	
	Croissance	X		Croissance	
	Photosynthèse			Développement	
	Abondance			Abondance	
 Corail	Survie		 Poissons	Survie	X
	Calcification			Calcification	X
	Croissance			Croissance	
	Photosynthèse			Développement	X
	Abondance			Abondance	X
 Coccolithophoridé	Survie	X	 Macroalgues	Survie	X
	Calcification			Calcification	X
	Croissance			Croissance	
	Développement			Photosynthèse	
	Abondance			Abondance	
 Mollusques	Survie		 Phanérogammes	Survie	X
	Calcification			Calcification	X
	Croissance			Croissance	X
	Développement			Photosynthèse	
	Abondance			Abondance	X
 Echinodermes	Survie		 Diatomées	Survie	X
	Calcification			Calcification	X
	Croissance			Croissance	
	Développement			Photosynthèse	
	Abondance	X		Abondance	

Figure 14: Effet de l'AO sur les organismes marins (Modifié de Kroeker et al. (2013))

Le CO₂ dissout diffuse dans les fluides internes comme l'hémolymphe et dans les tissus des organismes marins. Cela perturbe les équilibres acido-basiques et peut conduire à une acidose (Pörtner et al. 2004). La liaison de protons à des molécules tampons non-bicarbonatées réduit ponctuellement la concentration de protons et limite la diminution du pH dans les fluides corporels (Melzner et al. 2009, Gazeau et al. 2013). Les organismes éliminent aussi les ions H⁺ par des échanges actifs, au niveau des branchies, des reins ou encore de la glande digestive (Melzner et al. 2009). La dissolution de la coquille participe aussi à la compensation des variations de pH (Michaelidis et al. 2005).

L'AO affecte directement le métabolisme énergétique en modifiant le pH intracellulaire ou en augmentant la demande énergétique pour le maintien d'un équilibre acide-base.

L'acclimatation à un pH réduit est coûteuse en énergie et entraîne parfois une diminution des réserves glucidiques (Lannig et al. 2010, Dickinson et al. 2012). Chez l'huître en condition acidifiante, la régulation des voies de synthèse et de consommation des réserves énergétiques peut permettre de maintenir une homéostasie énergétique (Tomanek et al. 2011, Timmins-Schiffman et al. 2014).

L'énergie d'un animal étant limitée, si elle est allouée au maintien de l'équilibre acido-basique et/ou de la croissance, elle ne sera pas disponible pour d'autres fonctions physiologiques comme la reproduction ou encore la défense (Gazeau et al. 2013). L'acclimatation des mollusques à une réduction de pH peut en effet entraîner des modifications de la consommation d'oxygène, de la filtration et ainsi du métabolisme de base (Michaelidis et al. 2005, Bibby et al. 2007, Beniash et al. 2010, Range et al. 2014) pouvant aller jusqu'à la dépression métabolique.

4.4 pH et système de défense

4.4.1 Système immunitaire

L'étude des effets du pH sur l'état de santé des invertébrés marins est récente. Une diminution du pH de l'eau de mer semble réduire la réponse immunitaire des bivalves marins en altérant les propriétés de l'hémolymphe, l'intégrité et la capacité fonctionnelle des hémocytes. La cytotoxicité de l'hémolymphe de la moule *Mytilus galloprovincialis* est réduite après une exposition de 96 h à pH 7.3 (Malagoli & Ottaviani 2005). L'activité antimicrobienne de l'hémolymphe est seulement diminuée chez la moule *M. edulis* après 90 jours d'exposition à pH 6.5 en comparaison aux pH 7.35, 7.6, 7.8 et 8.05 (Ellis et al. 2015). Une exposition à un pH réduit cause des dommages au niveau des membranes de lysosomes de la moule *M. edulis* après 60 jours (Beesley et al. 2008) ou d'hémocytes d'huître perlière *Pinctada fucata* à pH 7.5 après 72 h (Li et al. 2015). Une réduction de la défense de *M. galloprovincialis* exposée à pH 7.7 et 7.4 pendant 7 jours s'explique par une diminution de l'activité du lysozyme de l'hémolymphe (Matozzo et al. 2012). Chez la moule *M. edulis*, la phagocytose est diminuée à pH réduit (Bibby et al. 2008).

4.4.2 Système antioxydant

L'exposition de bivalves marins à une réduction de pH module l'activité des enzymes antioxydantes. En effet, chez *C. gigas* une exposition de 28 jours à pH 7.3 provoque une augmentation de l'activité de la catalase (CAT), alors que la superoxyde dismutase (SOD) reste au même niveau que dans les huîtres à pH 7.8 (Moreira et al. 2016). Chez la palourde *Scrobicularia plana* une exposition de 96 h à pH 7.1 réduit l'activité de la SOD (Freitas et al. 2015). L'activation de ces enzymes permet la prise en charge des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il se peut toutefois que des conditions acidifiantes induisent une surproduction d'ERO (Tomanek et al. 2011), ce qui peut conduire à l'inhibition des enzymes antioxydantes, comme cela a pu être observé chez l'huître *C. gigas* (Wang et al. 2016). Une mauvaise prise en charge des ERO à pH réduit peut conduire à des dommages cellulaires, par peroxydation lipidique (Freitas et al. 2015).

Toutes ces études s'intéressent aux effets du pH sur les fonctions de défense des bivalves marins sans condition d'infection. Ainsi, les auteurs ne peuvent qu'émettre des hypothèses sur les conséquences induites sur la capacité de défense des individus, d'où la nécessité de regarder la réponse des organismes au pH en condition d'infection, comme mentionné par Ellis et al. (2015).

4.5 pH et maladies de bivalves

La virulence, l'abondance et la diversité des agents pathogènes peut varier en fonction du pH (Burge et al. 2014) dans l'environnement, mais aussi au sein des organismes, comme il a été observé dans la moule *M. edulis* (Mackenzie et al. 2014). Comme le rappelle Asplund et al. (2014), les microbes marins ont un faible temps de génération et un fort potentiel évolutif. Il est alors possible que ces derniers s'adaptent plus rapidement à des changements environnementaux comme l'AO, en comparaison à leurs hôtes potentiels. Globalement les études s'intéressant aux effets du pH sur les microorganismes portent sur le phytoplancton et plus rarement sur les virus, les archées ou encore les bactéries. Bien que les virus marins puissent être

inactivés à un pH inférieur à 7 (Børsheim 1993, Chang et al. 1998, Traving et al. 2014), très peu de choses sont connues sur leur sensibilité au pH. Il semble que les changements les plus importants soient dus aux effets de l'AO sur les organismes hôtes dont les virus dépendent, comme les bactéries, archées, protistes et métazoaires (Danovaro et al. 2011).

De plus, il semble que le système de défense des hôtes soit plus adapté aux agents pathogènes couramment rencontrés dans le milieu qu'aux agents pathogènes moins fréquents (Roth et al. 2012). Ainsi, l'émergence de nouveaux agents pathogènes ou la mutation de certains d'entre eux dans le contexte de l'AO pourrait causer de nouvelles maladies.

L'AO et donc le pH peuvent perturber les équilibres écologiques entre les interactions d'organismes et donc les interactions hôte-pathogène. Les études qui s'intéressent aux effets du pH sur l'interaction hôte-pathogène sont peu nombreuses. Elles portent sur les mollusques marins, des bivalves mais aussi des gastéropodes, infectés par des bactéries ou encore des parasites (Ellis 2012, Asplund et al. 2014, Mackenzie et al. 2014, Ellis et al. 2015, Harland et al. 2015, Keppel et al. 2015, MacLeod & Poulin 2015, MacLeod & Poulin 2016). **A ce jour aucune étude ne porte sur l'effet du pH sur une maladie de bivalve impliquant un virus.**

L'étude de l'effet du pH indépendamment sur l'agent pathogène *V. tubiashii* et son hôte *M. edulis*, n'a révélé aucun changement (Asplund et al. 2014). En revanche, en considérant l'interaction hôte-pathogène, il s'avère que les bactéries infectent plus facilement les hémocytes de moules acclimatées à long terme à une condition acidifiante (Asplund et al. 2014). Lorsque la moule bleue est exposée à un pH réduit, la défense antimicrobienne est diminuée, mais elle est rétablie en présence de la bactérie *V. tubiashii* (Ellis et al. 2015). Lorsque *C. virginica* est exposée à des fluctuations de pH (entre pH 7 et pH 7.8) il s'en suit des changements dans les paramètres de l'immunité. Toutefois, il n'y a pas d'effet significatif sur l'infection par *Perkinsus*, si ce n'est une tendance à la diminution de la prévalence et l'intensité de l'infection (Keppel

et al. 2015). Ces études mettent en évidence la nécessité d'étudier la triple interaction pH-hôte-pathogène pour comprendre l'effet du pH sur la réceptivité des bivalves à de potentiels agents pathogènes.

Matériel et méthode

1 Matériel biologique

Pour étudier l'infection de *C. gigas* par OsHV-1, il est nécessaire de disposer d'huîtres n'ayant jamais été en contact avec le virus avant l'expérience. En effet, il s'avère que lorsque des huîtres survivent à une infection par OsHV-1, elles sont plus résistantes à une deuxième infection (Degremont 2011). De plus, afin de comparer les résultats d'expériences réalisées à différents moments, il est important de travailler sur des animaux « standardisés ». Cela implique de produire un matériel biologique ayant une variance inter-lot réduite, par l'utilisation d'un nombre important de géniteurs d'origine sauvage et en suivant un protocole précis. Ainsi, les animaux utilisés pour les expériences réalisées au cours de cette thèse étaient des huîtres âgées de 4 mois (naissain standardisé Ifremer, NSI), produites à la station Ifremer d'Argenton selon la procédure premièrement décrite dans (Petton et al. 2013).

Les géniteurs utilisés pour la production de NSI en 2014 et 2015 étaient âgés de 2 à 4 ans. Ils ont été collectés en début 2014 et 2015 à Fouras (Marennes-Oléron, France, 46°00'43.2''N, 1°07'02.9''W). Ils ont ensuite été transférés à la station Ifremer d'Argenton pour y être conditionnés durant environ 2 mois où ils ont été maintenus à 17°C. A leur arrivée dans le laboratoire, les huîtres ont subi un traitement antibiotique et n'ont pas été nourries pendant une semaine. Par la suite, elles ont été alimentées avec *Tisochysis lutea* et *Chaetoceros muerelli*.

Les gamètes de 45 à 60 individus ont été récupérés par lacération des gonades. Le nombre important de géniteurs permet de réduire la variance inter-lot de la descendance tout en assurant l'obtention d'une descendance avec une sensibilité aux maladies représentative des huîtres dans le milieu naturel. Les gamètes ont ensuite été transférés dans 5 l d'eau de mer (EDM) à raison de 50 spermatozoïdes ovule⁻¹. Les taux de fécondation étaient supérieurs à 90%. L'embryogénèse s'est déroulée pendant 48 h dans des bassins cylindro-coniques de 150 l maintenus à 21°C sans renouvellement d'eau. La densité était de 100 oeufs ml⁻¹. L'homogénéité du milieu d'élevage était assurée par l'apport d'air continu. Les larves véligères étaient ensuite collectées sur une toile de 40 µm avant d'être transférées à raison de 50 larves ml⁻¹ dans des tubes

en méthacrylate transparent de 5 l. L'alimentation continue en EDM de ces tubes (100% de renouvellement h⁻¹) se faisait par le fond pour générer un courant ascendant. L'EDM était maintenue à 25°C et enrichie en phytoplancton. Un bullage d'air en continu permettait son homogénéisation. La fin du cycle pélagique se faisait lorsque 50% des larves étaient compétentes (présence de la tâche occélaire) ou dès l'observation des larves pédivéligères.

Les larves pédivéligères ont été placées en contact avec de la micro brisure dans des paniers dont le fond était constitué d'une toile d'un maillage de 125 µm. Les paniers étaient positionnés dans des auges alimentées en continu (100% de renouvellement h⁻¹) avec de l'EDM enrichie en phytoplancton.

Au bout de 30 jours un tri sur tamis de 300 µm a été fait afin de séparer les huîtres métamorphosées de la micro brisure. La phase post-larvaire a duré environ 75 jours et se faisait à 25°C.

Pour la suite de leur développement, les huîtres étaient transférées à la station Ifremer de Bouin, jusqu'à deux semaines avant le début des expérimentations (expérience 1), ou restaient sur site à Argenton (expériences 2 et 3). Au début des expérimentations les huîtres avaient environ 4 mois, mesuraient en moyenne 19 mm et pesaient en moyenne 0.7 g.

2 Protocole d'infection en milieu contrôlé

Les techniques utilisées pour reproduire l'infection par OsHV-1 en laboratoire sont (i) l'injection d'une solution virale dans le muscle adducteur des huîtres (Schikorski et al. 2011b), (ii) la cohabitation entre des animaux infectés dits « donneurs » et des animaux sains dits « receveurs », la maladie se transmettant horizontalement (Schikorski et al. 2011a, Petton et al. 2013). Les donneurs peuvent être obtenus par injection de solution virale (Schikorski et al. 2011a) ou par infection sur le terrain (Petton et al. 2013).

Ici, les méthodes d'infection utilisées sont une variante de la technique d'infection par cohabitation, utilisée depuis plusieurs années au laboratoire de physiologie des invertébrés (LPI) à l'Ifremer et décrite par Petton et al. (2013). La première étape a consisté en la production d'animaux donneurs d'agents pathogènes. Un sous-échantillon de la cohorte produite pour chaque expérience était transféré sur le terrain, à la pointe des châteaux (Bretagne, France, 48° 20' 06.19" N, 4° 19' 06.37" W), pendant un épisode de mortalité (suivi par le réseau RESCO¹ de l'Ifremer). Les huîtres étant des animaux filtreurs, elles sont en contact avec des agents pathogènes en suspension dans la colonne d'eau (Ben-Horin et al. 2015), et donc dans notre cas avec les agents pathogènes présents dans le milieu au moment de la mortalité dont OsHV-1. Lorsque les premières huîtres ont commencé à mourir, les survivantes, testées positives à OsHV-1 (10⁹ copies d'ADN mg⁻¹ de tissus frais) et plus précisément à la souche μ var, ont été ramenées au laboratoire. Les donneurs ont été utilisés par la suite pour infecter des animaux sains receveurs. Pour réaliser l'infection, des biomasses identiques de donneurs et de receveurs ont été mis en cohabitation.

Contrairement au mode de cohabitation directe, qui consiste à mettre dans le même bac des donneurs et des receveurs, la méthode utilisée dans cette thèse a été de la « cohabitation indirecte ». En effet, les donneurs ont été placés dans un bac en flux ouvert et alimenté par de l'EDM à 35‰ et 21°C et à pH 8.1. L'eau de ces bassins a été utilisée comme source infectieuse (SI). La SI a ensuite été pompée vers (i) des bacs où se trouvaient les receveurs (mode d'infection 1) ou (ii) vers des bacs pour être traitée avant d'être pompée vers des bacs contenant les receveurs (mode d'infection 2) (Figure 15). Les bacs des receveurs étaient eux aussi en flux ouvert. Le maintien des animaux en système ouvert permet un renouvellement continu de l'eau afin d'assurer une bonne qualité de l'eau. Les donneurs ont été retirés du système expérimental lorsque les premiers receveurs ont commencé à mourir. Tous les animaux ont été maintenus à 21°C, température optimale pour l'infection par OsHV-1 en France (Petton et al. 2013).

¹ http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole

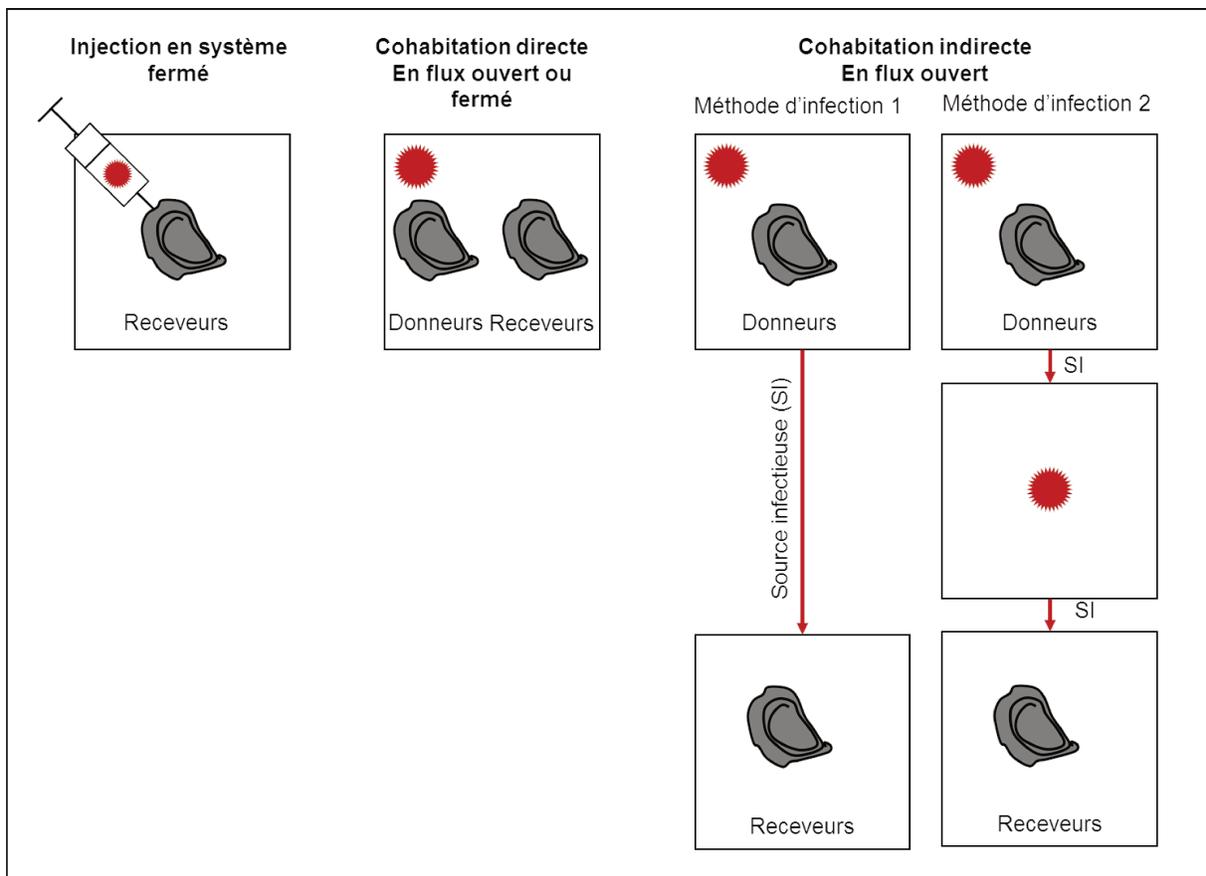


Figure 15: Présentation des différents protocoles *d'infection par OsHV-1* dans la littérature scientifique et dans les travaux présentés dans cette thèse

Les études présentées dans cette thèse s'intéressent plus particulièrement à l'implication d'OsHV-1 dans la maladie de *C. gigas*. Toutefois, la technique d'infection des donneurs sur le terrain permet de prendre en compte l'intégralité des microorganismes présents dans le milieu, dans le but de reproduire en laboratoire une maladie la plus proche possible de ce qui se déroule dans le milieu. Cette technique est maintenant largement utilisée (Petton et al. 2013, Tamayo et al. 2014, Lassudrie et al. 2015, Lemire et al. 2015, Pernet et al. 2015, Petton et al. 2015a, Petton et al. 2015b, Fuhrmann et al. 2016). D'ailleurs la mortalité des huîtres obtenue en laboratoire était similaire à celle observée sur le terrain (données non présentées dans le manuscrit).

Avec la cohabitation, directe ou indirecte il est possible d'étudier la transmission de la maladie, ce qui est impossible par injection seule. De plus, lors d'une injection il y a franchissement de l'épithélium qui est l'une des premières barrières de défense des animaux. Ainsi, le mode d'infection par injection ne permet pas d'étudier dans son intégralité la réponse de l'animal à l'infection. En revanche par comparaison à l'injection, la cohabitation offre une moins bonne maîtrise de la quantité de particules virales auxquelles les receveurs sont soumis. C'est pourquoi les débits d'eau étaient réglés de manière à ce que le débit de la SI soit le même dans tous les traitements d'une expérimentation. De plus, le choix du débit de renouvellement des bacs devait répondre à 2 critères importants : être suffisant pour initier la maladie et assurer une bonne qualité de l'eau.

Les receveurs n'étaient jamais en contact avec les traitements que nous avons testés. Nous ne souhaitons pas que les traitements (salinité et pH) affectent la physiologie des donneurs et donc le relargage de particules virales. L'avantage du mode d'infection 1 par rapport à la cohabitation était de s'affranchir de l'effet de la salinité sur les receveurs. L'effet des traitements étaient alors testé simultanément sur la SI et les receveurs dans les bacs. Le mode d'infection 2 donnait la possibilité de tester les effets des traitements uniquement sur la SI.

3 Analyses des échantillons

Lors de l'échantillonnage, les animaux ont été décoquillés et les tissus de 10-15 individus ont été rassemblés puis immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Par la suite, les échantillons ont été réduits à l'état d'une fine poudre par broyage à froid, en utilisant un broyeur MM400 (Retsch, Eragny, France). La poudre a été ensuite stockée à -80°C avant d'être aliquotée pour les différentes analyses.

3.1 Quantification de l'ADN d'OsHV-1

La quantification de l'ADN d'OsHV-1 a été faite à partir de 30 mg de poudre homogénéisée dans de l'eau de mer artificielle stérile selon la méthode décrite par Pepin et al. (2008). L'ADN total a ensuite été extrait avec un mini-kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le protocole fourni par le fabricant. L'extrait a été conservé à -20°C avant analyse. La détection et la quantification de l'ADN viral se sont faites en duplicata à partir des échantillons dilués au 1/100. La technique qui a été utilisée est la PCR en temps réel avec l'utilisation de l'agent SYBR Green, qui se lie à l'ADN viral double brin (Pepin et al. 2008). Les PCR ont été faites avec un Thermocycleur Stratagène Mx3005P (Agilent, Les Ulis, France). Les conditions de cycles étaient les suivantes : 1 cycle de 3 min à 95°C, 40 cycles de 5 sec à 95°C, 20 sec à 60°C.

L'ADN viral des échantillons est quantifié grâce à une gamme étalon, faite à partir d'une solution d'ADN plasmique, fournie par le laboratoire Ifremer/La Tremblade, à une concentration connue (en copies d'ADN μl^{-1}). Cinq points de gamme en duplicata de 10 à 10^5 copies μl^{-1} ont été testés. La droite de régression est établie à partir de 4 points minimum. Des contrôles négatifs (avec de l'eau stérile) ont été également inclus pour rechercher d'éventuelles contaminations.

Une analyse était valide si elle vérifiait les critères définis par le laboratoire de l'Ifremer/La Tremblade, à savoir : deltas Ct des duplica <1 , T_m $80.9 \pm 0.4^\circ\text{C}$, efficacité de 90 à 110%, pente de -3.3 et $R^2 > 0.98$. Si ce n'était pas le cas les échantillons étaient retestés.

La détection spécifique de la souche μ var d'OsHV-1, a été faite en utilisant des amorces spécifiques DPFor/DPRev qui ciblent la région du génome viral codant une sous-unité catalytique de l'ADN polymérase (Webb et al. 2007).

3.2 Expression de 4 gènes d'OsHV-1

L'ARN total a été extrait avec de l'EXTRACT-ALL® (Eurobio, Les Ulis, France) suivant les recommandations du fabricant, et l'extrait a ensuite été débarrassé de l'ADN en utilisant le kit DNase Max

TM (MO Bio, Carlsbad, CA, Etats-Unis). La quantité et la qualité de l'ARN ont été contrôlées avec un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Ambion®, Waltham, MA, Etats-Unis). La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant le système SuperScript III ® First-Strand Synthesis (Invitrogen) sur 500 ng d'ARN traité. Chaque traitement à la DNase a été contrôlé par PCR en temps réel.

La RT PCR a été utilisée pour étudier l'expression de gènes viraux en utilisant le protocole décrit par (Segarra et al. 2014b) avec 5 µL d'ADNc. L'analyse s'est faite en utilisant un thermocycleur Mx3005P (Agilent, Les Ulis, France). Pour chaque échantillon, la solution d'ADNc diluée au 1/30 (5µl) a été mélangée avec le mélange Brilliant® SYBR Green PCR III (10 µl, Agilent), les amorces directe (2 µl) et inverse (2 µl) et de l'eau distillée (1 µl) (Untergasser et al. 2012). Les cycles thermiques utilisés ont été ceux présentés dans le paragraphe précédent. Afin d'assurer la spécificité des amorces utilisées, les courbes de fusion ont été tracées (55-95°C). Dans cette étude, les ORF72, ORF75, ORF87 et ORF117 du virus OsHV-1 ont été choisis à partir de l'étude antérieure réalisée par Segarra et al. (2014b). Ces gènes codent respectivement pour une protéine de membrane, une enzyme dUTPase, un inhibiteur de l'apoptose et une protéine à motif en doigts de zinc (Davison et al. 2005, Segarra et al. 2014b). L'expression des gènes a été exprimée en delta Ct et calculée selon la formule suivante : Ct gène viral-Ct gène de l'hôte (facteur d'élongation).

3.3 Glucides

Pour extraire les glucides, de la poudre d'huître a été ajoutée à de l'eau milliQ à raison de 100 mg ml⁻¹. Le mélange a été homogénéisé avec un homogénéiseur Polytron 2500 E kinematica (Grosseron). La solution a été ensuite conservée à -20°C, avant d'être utilisée pour le dosage des sucres totaux selon la méthode de Dubois et al. (1956).

Avant d'être dosés, les échantillons ont été décongelés à température ambiante et de nouveau homogénéisés avant d'être dilués dans de l'eau MilliQ au 1/10 ou 1/20 selon les cas. Un volume de 250 µl de l'échantillon mélangé à 500 µl de phénol à 5% avant d'être homogénéisé avec un vortex. Le mélange a été mis en incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 40 minutes. Par la suite 2.5 ml d'acide

sulfurique à 98% a été ajouté au mélange échantillon-phénol. Le mélange a été à nouveau homogénéisé au vortex et mis en incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 40 minutes. L'absorbance a été mesurée à 490 nm avec un spectrophotomètre UV 941 (instruments Kontron, San Diego, Californie, Etats-Unis). La concentration des échantillons en sucres a été déterminée en utilisant un courbe étalon de glucose (0,01 à 0,4 mg ml⁻¹). Les résultats sont exprimés en mg g⁻¹ de poids sec.

3.4 Lipides et acides gras

3.4.1 Préparation de l'échantillon

Pour extraire les lipides, les aliquots de poudre d'huître ont été placés dans des flacons en verre remplis d'un mélange chloroforme-méthanol (2:1 v/v) à raison de 50 mg ml⁻¹ et conservés au -20°C avant d'être analysés. Un aliquot de l'échantillon (mélange poudre-CHCl₃-MeOH) a été utilisé pour analyser les classes de lipides neutres, alors qu'un autre aliquot a servi à l'analyse des acides gras des lipides neutres et des lipides polaires.

3.4.2 Analyse des classes de lipides neutres par chromatographie sur couche mince

Les classes de lipides neutres ont été déterminées par chromatographie sur couche mince (HPTLC ; high performance thin layer chromatography). La technique repose sur l'affinité différentielle des diverses classes de lipides pour une phase stationnaire, ici de la silice et une phase mobile ou éluant, ici un mélange d'hexane et de diéthyl-éther. Il en résulte pour chaque classe de lipide une migration plus ou moins importante qui est caractérisée par le front de migration. Les classes de lipides des échantillons sont déterminées en comparaison à des standards dont le front de migration est connu.

Avant de commencer l'analyse, la plaque de silice a été lavée avec 20 ml d'un mélange d'hexane et de diéthyl éther (1 :1 v/v). Après séchage, la plaque a été activée à 120°C pendant 30 min. Par la suite, les échantillons ont été déposés sur la plaque de silice (4-10 µl en fonction de la concentration des

échantillons) avec un déposeur automatique ATS4 CAMAG. La plaque a ensuite été mise successivement dans deux cuves saturées avec respectivement un mélange hexane-diéthyl-éther-acide acétique (20: 5: 0.5 v/v/v) et un mélange hexane-diéthyl-éther (97: 3 v/v). La révélation de la plaque a été faite avec un bain de sulfate de cuivre (3%) -acide phosphorique (8%). La plaque de silice a ensuite été chauffée à 160°C pendant 20 min. La lecture de la plaque a été faite grâce au scanner CAMAG 3 et l'analyse des spectres par le logiciel WinCat. La concentration de chaque classe de lipides a été obtenue en déterminant l'aire sous la courbe et en la comparant avec une courbe d'étalonnage faite à partir de standards.

3.4.3 Analyses des profils d'acides gras

L'échantillon (poudre d'huître dans le mélange chloroforme-méthanol 2 :1 v/v) a été évaporé à sec et a été récupéré après trois lavages de 500 µl de mélange méthanol-chloroforme (98:2 v/v). Les échantillons ont ensuite été placés en haut d'une microcolonne de gel de silice préalablement chauffée à 450°C et désactivée avec 5% eau. Les lipides neutres ont été élués avec 10 ml du mélange méthanol-chloroforme (98:2 v/v). Les lipides polaires ont été récupérés avec 15 ml de méthanol. Une quantité connue de l'acide gras 23:0 a été ajoutée dans les fractions neutre et polaire afin de servir d'étalon interne (utile si les résultats sont exprimés en concentrations massiques). Les lipides ont été transestérifiés avec 10% en masse de trifluorure de bore-méthanol (Metcalf & Schmitz 1961) et analysés selon la méthode décrite par Marty et al. (1992). Les acides gras ont été analysés avec un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur sur colonne, d'une DB-Wax (30 m × 0,25 mm; 0,25 épaisseur µm pellicule), d'une colonne capillaire et d'un détecteur à ionisation de flamme. L'hydrogène est utilisé comme gaz transporteur. Les acides gras sont finalement identifiés en comparant leur temps de rétention à ceux de standards.

3.5 Protéines et enzymes

3.5.1 Matériel utilisé

Pour l'expérimentation salinité (chapitre 2): les dosages de protéines et d'activités enzymatiques ont été faits dans des microplaques de 96 puits Nunc™ avec un lecteur de microplaques (Synergy-HT) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Gen5 v2.03 (BioTek, Winooski, Vermont, Etats-Unis). Le dosage de l'activité catalase a été mesuré à l'aide de cuves en quartz Hellma 110 (Dominique Dutscher, Brumath, France) et d'un spectrophotomètre UV 941 (Kontron instruments, San Diego, Californie, Etats-Unis).

Pour l'expérimentation pH (chapitre 3) : les dosages de protéines et d'activités enzymatiques ont été faits dans des microplaques de 96 puits Greiner Bio One (Les Ullis, France) avec un lecteur de microplaques POLARstar Omega et les résultats ont été analysés avec le logiciel MARS BMG (Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Le dosage de l'activité catalase a été fait à l'aide de cuves en quartz Hellma 110 (Dominique Dutscher, Brumath, France) et d'un spectrophotomètre Libra S12 (Biochrom, Cambourn, Royaume-Uni).

3.5.2 Protéines

3.5.2.1 Extraction

Pour exclure le risque d'interférence entre les produits utilisés pour le dosage de certaines enzymes et les tampons, les protéines des tissus d'huître ont été spécifiquement extraites dans deux tampons de lyse différents, comme décrit dans Richard et al. (2016). Tous les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich à l'exception du cocktail d'inhibiteurs de la phosphatase III fournit par Roche.

Le tampon d'extraction « BLOT » consistait en un mélange de NaCl à 150 mM, Tris HCl à 10 mM, EDTA à 1 mM, EGTA à 1 mM, Triton X-100 à 1%, CA-630 Igepal à 0.5%, 1 comprimé d'EDTA (inhibiteur

de protéase) et un cocktail d'inhibiteurs de la phosphatase III, pour un volume total de 25 ml de tampon à un pH de 7,4 (Corporeau et al. 2012). Ce tampon a été utilisé pour l'extraction des protéines avant dosage de l'activité des enzymes CS, HK, SOD et GST.

Le tampon d'extraction « PBS » est composé de PBS à 10 mM (Sigma-Aldrich), d'EDTA à 1 mM et de Triton X-100 à 0,1% (Sigma-Aldrich) (Richard et al. 2016). Ce tampon a été utilisé pour l'extraction des protéines avant dosage de l'activité des enzymes GST, GR, GPx et iNOS.

Un rapport de 0,2 mg μl^{-1} de poudre d'huître a été homogénéisé dans les tampons de lyse avec un homogénéiseur Polytron PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Suisse). Les échantillons ont été centrifugés deux fois à 4000 rpm pendant 1 h à 4°C et à 11700 rpm pendant 45 min à 4°C pour éliminer la fraction lipidique des échantillons, respectivement à l'aide des centrifugeuses Thermo JOUAN GR412 et MR22 (Corporeau et al. 2014). Après extraction, les surnageants ont été aliquotés et conservés à -80°C avant d'être analysés.

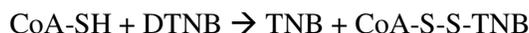
3.5.2.2 Dosage

Les protéines ont été quantifiées sur des échantillons dilués au 1/20 selon la méthode de Lowry (1951) (pour expérience salinité ; chapitre 2) ou la méthode de Bradford (1976) (pour l'expérimentation pH ; chapitre 3) avec les réactifs des kits Protein Assay (Biorad, France) et en suivant le protocole fourni. L'absorbance a été lue à 540 nm (méthode de Lowry) ou 620 nm (méthode de Bradford). Les concentrations en protéines ont été déterminées par comparaison avec une courbe d'étalonnage de sérum-albumine bovine. Les résultats sont exprimés en mg ml^{-1} pour le calcul des activités enzymatiques et en mg g^{-1} de poids sec pour évaluer le contenu biochimique en protéines des huîtres.

3.5.3 Citrate synthase

L'activité de la citrate synthase (CS ; EC 4.1.3.7), a été quantifiée en triplicata par dosage colorimétrique selon la méthode développée par Childress & Somero (1979). La CoA formée par la réaction

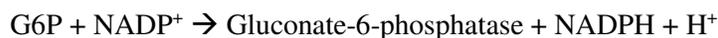
catalysée par la CS comporte un groupement thiol. Le principe du dosage de la CS repose sur la réaction entre le groupement thiol de la CoA et le DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)), qui forme un composé de couleur jaune, le TNB (acide 5-thio (2 nitrobenzoïque)) et du CoA-TNB. C'est la formation de ce produit qui est suivie par spectrophotométrie à 412 nm.



Dans chaque puits de microplaque, ont été déposés 20 μl d'échantillon dilué au quart et 160 μl du mélange réactionnel qui contenait de l'acétyl-CoA réductase (0.25 mM), du DTNB (0.125 mM) et du tampon Tris-HCl (100 mM) à un pH de 8.1. La réaction a été ensuite initiée par l'addition de 20 μl d'oxaloacétate (0.5 mM). L'absorbance a été suivie pendant 10 minutes à 412 nm. Le calcul de l'activité de la CS se fait sur la partie linéaire du suivi de l'absorbance dans le temps. Les résultats sont exprimés en mU mg^{-1} de protéine, où 1 U est la quantité d'enzyme pour catalyser 1 μmol de TNB par minute ($\epsilon_{\text{TNB}}=16.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.4 Hexokinase

L'activité de l'hexokinase (HK ; EC 2.7.1.1) a été déterminée par un dosage colorimétrique comme décrit par Greenway & Storey (1999). Le dosage repose sur la réaction entre le NADP^+ apporté par le milieu réactionnel et le gluconate-6-phosphatase (G6P) produit par la réaction catalysée par l'HK de l'échantillon. Cette réaction est catalysée par la G6P déshydrogénase (G6PDH) et produit du G6P et du NADPH dont la formation est suivie par spectrométrie.



Le milieu réactionnel est composé d'un tampon à pH 8 constitué de solution Tris (100 mM), d'EDTA (1 mM), de MgCl_2 (2 mM), auquel sont ajoutés en concentrations molaires finales, 5 mM de glucose, 1 mM d'ATP, 0.2 mM de NADP^+ et 1 U ml^{-1} de G6PDH. Dans chaque puits de microplaque ont été déposés 20 μl d'échantillon et 180 μl du mélange réactionnel.

L'absorbance a été enregistrée pendant 15 minutes à 340 nm. Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel Gen5. Le calcul de l'activité de l'HK se fait sur la partie linéaire du suivi de l'absorbance dans le temps, soit entre 4 et 8 min. Les résultats sont exprimés en mU mg⁻¹ protéine, où 1 U est la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 μmol de NADP⁺ par minute ($\epsilon_{\text{NADP}^+}=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.5 Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et dioxygène. Son dosage est un dosage indirect, qui repose sur l'inhibition du complexe xanthine-xanthine oxydase (XO) par la SOD (Figure 16).

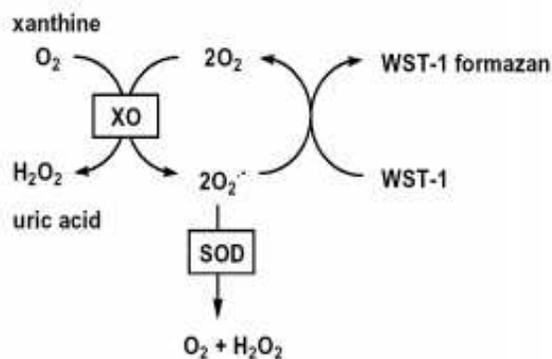


Figure 16: Principe du dosage de la superoxyde dismutase (SOD assay kit, Sigma-Aldrich, France)

Pour chaque échantillon, l'activité totale de la SOD (SOD ; EC 1.15.1.1) a été dosée en triplicata en utilisant le kit « SOD assay kit » (Sigma –Aldrich, France) selon les instructions fournies par le fabricant. Les surnageants de protéines dilués au 20^{ème} (20 μl) ont été mélangés avec un sel de tétrazolium soluble dans l'eau (200 μl ; WST-1) et de la xanthine oxydase (20 μl ; XO) ainsi qu'un mix de xanthine pour amorcer la réaction. L'absorbance a été lue à 450 nm après une incubation de 20 min à 25 °C. L'activité de la SOD a été déterminée par comparaison avec une courbe étalon, réalisée en utilisant de la SOD

d'érythrocytes bovins. Les résultats sont exprimés en $U\text{ mg}^{-1}$ de protéine, où une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% du complexe xanthine/XO.

3.5.6 Catalase

L'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) a été dosée en duplicata selon la méthode décrite par Aebi (1984). La catalase permet la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Le dosage est alors basé sur le suivi par spectrophotométrie de la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les surnageants de protéines (8 μl) ont été mélangés avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 mM (792 μl). L'activité de la CAT se fait en suivant la cinétique de la diminution de la concentration en H_2O_2 toutes les 9 s pendant 90 s à 240 nm. Les résultats sont exprimés en $U\text{ mg}^{-1}$ de protéine, où une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser une μmole de H_2O_2 par minute ($\epsilon_{H_2O_2}=39.4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

3.5.7 Glutathion S-transférase

L'activité de la glutathion S-transférase (GST, EC 2.5.1.18) a été quantifiée en suivant la méthode décrite par McFarland et al.(1999). Les surnageants de protéines ou le tampon d'extraction (15 μl) ont été mélangés avec du tampon d'essai (200 μl , tampon phosphate à 200 mM, CDNB à 1 mM, GSH à 1 mM) pour déclencher la réaction. L'activité de la GST a été déterminée en suivant la cinétique de la production du conjugué entre le GSH et CDNB pendant 3 min à 340 nm. L'absorbance du blanc a été soustraite de celle des échantillons. Les résultats sont rapportés dans le $\text{mU}\text{ mg}^{-1}$ de protéine, où une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse une μmole de CDNB par minute ($\epsilon_{\text{CDNB}}=9.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

3.5.8 Glutathion réductase

L'activité de la glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7) a été déterminée en suivant le protocole décrit par Cribb et al. (1989). Les surnageants de protéines ou du tampon d'extraction qui constituait le blanc (20 μ l) ont été mélangé avec la solution de dosage (170 μ l ; tampon phosphate de sodium à 100 mM, NADPH à 0.7 mM, DTNB à 0,09, GSSG à 0.2 mM). L'activité de la GR est déterminée en suivant la cinétique production de TNB pendant 3 min à 412 nm. L'absorbance du blanc a été soustraite de celle des échantillons. Les résultats sont exprimés en mU mg^{-1} de protéine, où une unité est la quantité d'enzyme catalysant une μ mole de DTNB par minute ($\epsilon_{\text{DTNB}}=14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.9 Glutathion peroxydase

L'activité totale de la glutathion peroxydase (GPx, EC 1.11.1.9) a été dosée en suivant la méthode décrite par McFarland (1999). Les surnageants de protéines ou du tampon d'extraction (50 μ l) ont été mélangés avec du tampon d'essai (200 μ l ; tampon au phosphate à 62,5 mM, EDTA à 6,25 mM, GSH à 2.5 mM, GR à 2.5 U ml^{-1} , NADPH à 0.5 mM, hydroperoxyde de cumène à 1.875 mM) pour amorcer la réaction. Le suivi de la cinétique de la réduction du NADPH pendant 3 min à 25 ° C à 340 nm permet de déterminer l'activité de la GPx. Le coefficient d'extinction du NADPH est de 6.22 $\text{l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Les résultats sont rapportés dans mU mg^{-1} de protéine, où une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 μ mol de NADPH par minute ($\epsilon_{\text{NADPH}}=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.10 Oxyde nitrique synthase

L'activité de l'oxyde nitrique synthase (iNOS, EC 1.14.13.39) a été dosée selon la méthode non-radioactive décrite dans Richard et al. (2016). Les surnageants de protéines (55 μ l) ont été mélangés avec du tampon de dosage (5 μ l, tampon Tris à 20 mM à pH 7.4, NADPH à 1 mM, L-arginine à 1 mM, 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine à 10 μ M, FAD^+ à 5 μ M) et mis en incubation pendant 30 min à 37°. Pour évaluer

l'activité iNOS seul, des échantillons et des blancs ont également été mis en incubation avec un tampon de dosage contenant de la L-NMMA (200 pM), un inhibiteur spécifique de la iNOS. Les réactions ont été stoppées par l'addition d'un réactif de développement de couleurs (200 µl, COLDER) puis les échantillons et les blancs ont été incubés à 95 ° C pendant 15 min. L'activité de la iNOS a été déterminée en suivant la production de L-citrulline, après une incubation de 10 min à température ambiante en lisant l'absorbance à 530 nm. L'absorbance du blanc et des échantillons mis en incubation avec de la L-NMMA a été soustraite de celle des échantillons. L'activité de la iNOS a finalement été déterminée par comparaison avec une courbe standard réalisée en utilisant la iNOS de souris. Les résultats sont exprimés en mU mg⁻¹ de protéine où une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 µmole de L-citrulline par minute.

3.6 Prostaglandines

Pour son dosage, la prostaglandine E2 (PGE2) est convertie en un métabolite facilement quantifiable, le PGEM. Le dosage s'est fait à l'aide du kit de dosage EIA PG (Cayman Chemical n ° 514531, Ann Arbor, MI, USA) selon une procédure modifiée de Segueau et al.(2011) (Figure 17). Le dosage est basé sur la concurrence entre le PGEM et le conjugué PGEM-acétylcholinestérase (AChE) (qui sert de traceur) pour un nombre limité de sites de liaison à un antiserum de lapin. La concentration du traceur est maintenue constante, alors que la concentration de PGEM libre des échantillons est variable. La quantité du traceur est donc inversement proportionnelle à la quantité de PGEM libre.

Les échantillons ont été purifiés sur colonnes SPE C-18 (Waters, Milford, MA, USA). Des aliquots de poudre d'huître (20 mg) ont été mélangés dans de l'eau (500 µl) et ont été incubés à 4 ° C pendant 5 min avec de l'éthanol (2 ml), et centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes afin de précipiter les protéines. Les surnageants et les standards ont ensuite été mis dans des puits couverts d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre des anticorps de lapin. Des anticorps de lapin spécifiques contre la PGEM et les traceurs PGEM-AchE ont été ajoutés dans chaque puit et les plaques ont été incubées pendant 18 h. Après lavage, le réactif d'Ellman a été ajouté pour mesurer l'activité de l'AChE par lecture de l'absorbance à 415 nm avec

un lecteur de microplaques (Bio-Tek Synergy HT, Bio-Tek Instrument, États-Unis). L'absorbance est proportionnelle à la quantité de PGEM du traceur lié aux puits qui est inversement proportionnelle à PGEM libre de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en pg mg⁻¹ de la masse de tissus humide.

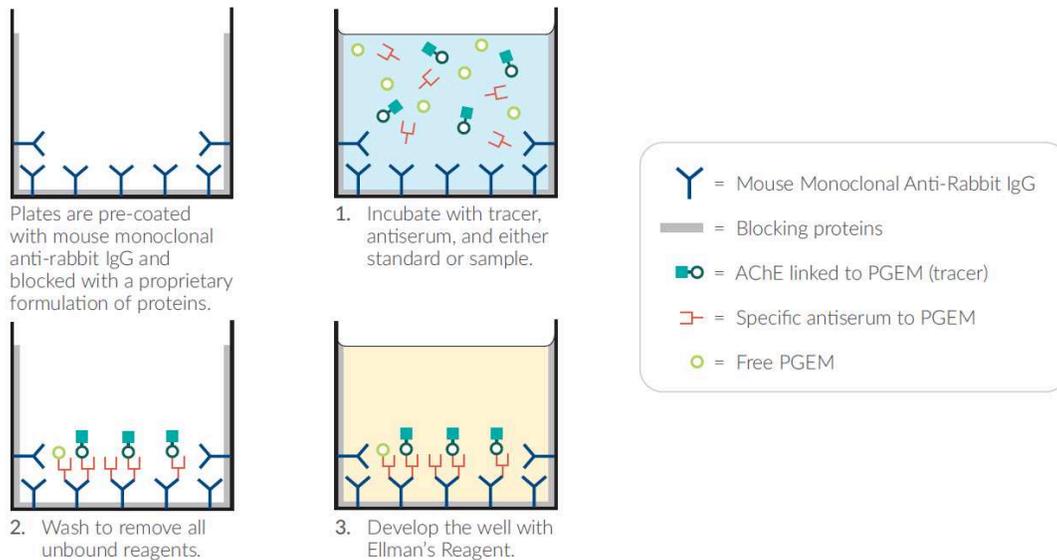


Figure 17: Principe de dosage de la prostaglandine E2 par quantification du PGEM (Cayman chemical, Prostaglandin E metabolite assay kit)

4 Statistiques

4.1 Analyse de survie

Les estimations non paramétriques de la fonction de survie ont été calculées selon Kaplan & Meier (1958). Le temps de survie a été mesuré en jours dès le début de l'infection (jour 0) lorsque les huîtres ont été exposées à la SI. Les courbes de survie des huîtres exposées à la SI ont été représentées graphiquement sous R.

Les courbes de temps de survie des huîtres connectées à la SI ont été comparées en utilisant le modèle de régression de Cox (1972), après ajustement pour l'effet des traitements. La survie des huîtres

témoins (non exposées à la SI) n'a pas été incluse dans le modèle statistique, car elle était toujours > 95%. La proportionnalité des risques (PR) a été vérifiée avec les résidus Martingale (Lin et al. 1993). Dans **l'expérience 1**, l'hypothèse de PR n'était pas respectée. Il a alors fallu ajouter des covariables dépendant du temps dans le modèle de survie. Il s'agissait de créer des nouvelles covariables correspondant à l'interaction des variables et du temps. Dans ce cas le temps (t) a été défini comme dichotomique: $t \leq 6$ jours ou $t > 6$ jours. Les rapports de risque ont été produits au moyen de contrastes. La régression de Cox a été réalisée en utilisant SAS 9.4 (SAS Institute, NC, Etats-Unis).

4.2 Analyse de la variance : plan d'expérience en parcelles divisées

Avant de réaliser les analyses de variance, la normalité et l'homogénéité des résidus du modèle ont été vérifiés graphiquement. Lorsque les postulats n'étaient pas vérifiés, les données ont été transformées en $\log(x+1)$. La fonction « aov » de R a été utilisée pour réaliser les ANOVAs. Quand des différences significatives étaient mises en évidence, un test de Tukey était réalisé, avec la fonction HSD.test de R, pour déterminer ces différences.

Des analyses de la variance associées à un plan d'expérience en parcelles divisées ont été réalisées afin de déterminer des différences pour chaque variable d'étude en fonction du paramètre environnemental d'étude (salinité ou pH), de l'infection, du niveau d'acclimatation et du temps d'échantillonnage. La parcelle principale consistait en l'interaction entre le paramètre environnemental et l'infection et (i) la sous-parcelle contenait le facteur d'acclimatation et la sous-sous parcelle était le temps d'échantillonnage (Expérience 1, chapitre1) (ii) ou la sous-parcelle contenait le temps d'échantillonnage (Expérience 1, chapitre 2 et Expérience 3, chapitre 3).

4.3 Régression multiple pas à pas

Des modèles de régressions multiples ont été utilisés pour étudier la relation entre (i) l'indice d'insaturation et les acides gras membranaires et (ii) les acides gras et la salinité (Chapitre 2). Pour chaque

modèle, les variables explicatives ont été sélectionnées par une méthode pas à pas. Cela signifie que les variables sont ajoutées une à une au modèle statistique. Avant l'introduction d'une nouvelle variable, la significativité des variables explicatives déjà présentes dans le modèle est testée. Les variables qui n'apportent pas de contribution significative sont éliminées.

4.4 Analyse descriptive des données

La heat map est un moyen graphique de représentation des données. Elle convient particulièrement à des jeux de données conséquents pour lesquels des individus sont décrits par de nombreuses variables. Ce moyen de représentation a donc été utilisé pour représenter des profils d'acides gras d'échantillons d'huître. Les données ont été centrées et réduites avant représentation et classification.

Les variables (acides gras) et les individus (échantillons) ont été classés grâce à une classification hiérarchique ascendante (CAH) avec la fonction « hclust » de R. La CAH permet de rassembler des individus selon un critère de ressemblance qui s'exprime sous la forme d'une matrice de distance, qui représente la distance euclidienne existant entre chaque individu ou variable pris deux à deux. Plus deux observations sont différentes, plus la distance est importante. La CAH rassemble des individus de manière itérative pour produire un dendrogramme. La classification est ascendante car elle part des observations individuelles et elle est hiérarchique car elle produit des classes de plus en plus vastes (Larmarange 2003). La méthode pour réaliser le dendrogramme est la méthode de Ward. Cette méthode utilise une analyse de la variance approchée pour évaluer les distances entre groupes.

Chapitre 1 : Effet de la
salinité sur la transmission
de la maladie induite par
OsHV-1 et la mortalité
associée de l'huître creuse

1 Présentation de l'Article 1

Les huîtres vivent naturellement dans les zones estuariennes et côtières, caractérisées par des fluctuations de salinité. Chez les bivalves, les faibles salinités réduisent les fonctions physiologiques comme la filtration, la croissance (Gosling 2003) mais aussi la défense (Matozzo & Marin 2011, pour revue), ce qui peut augmenter la sensibilité des animaux à un agent pathogène.

De plus, la salinité peut avoir des effets sur les agents pathogènes en altérant leur abondance et leur virulence (Burge et al, 2014). Par exemple, la prévalence de protistes du genre *Perkinsus* et *Haplosporidium* de l'huître américaine *Crassostrea virginica* est réduite lorsque la salinité est inférieure à 15‰ (Hofmann et al. 2009, Bushek et al. 2012, Ford et al. 2012).

Il est alors possible que l'hyposalinité constitue une barrière physique à la transmission de la maladie induite par OsHV-1 chez *C. gigas*. Les faibles salinités pourraient en effet agir sur l'infectiosité du virus et/ou sur le métabolisme de l'hôte, l'huître *C. gigas*.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- D'identifier les effets de la salinité sur la transmission et sur l'expression de la maladie d'huîtres acclimatées ou non à la salinité avant le début de l'infection (Expérience 1, Figure 18A).
- D'identifier les effets de la salinité sur la source infectieuse et plus particulièrement sur l'infectiosité de l'herpèsvirus OsHV-1 (Expérience 2, Figure 18B).

Pour l'expérience 1, des huîtres *C. gigas* de 4 mois produites en laboratoire ont été acclimatées 11 jours à quatre conditions de salinité (10, 15, 25, 35‰, 6 bassins par salinité). Pendant cette période d'autres huîtres (donneurs) issues de la même cohorte ont été infectées sur le terrain lors d'un épisode de mortalité massive. Lorsque ces animaux ont commencé à mourir, ils ont été ramenés en laboratoire et placés dans un bassin dont l'eau a servi de source infectieuse (SI). Ce même jour, des huîtres non-acclimatées ont été ajoutées dans chaque bassin avec les huîtres acclimatées. La SI a ensuite été distribuée à la moitié des

bassins (12 bassins, 3 par salinité) pour infecter les animaux receveurs. Le reste des bassins contenaient les animaux témoins. La mortalité a été suivie quotidiennement pendant 17 jours. Des échantillonnages ont été réalisés aux jours 0, 2 et 4 post-infection pour étudier la quantité d'ADN d'OsHV-1 et l'expression de certains gènes viraux dans les tissus d'huîtres.

Pour l'expérience 2, la SI a tout d'abord été exposée à une salinité de 10 ou 25 ‰ avant d'être distribuée à des huîtres receveuses acclimatées à 25‰. La survie a été suivie quotidiennement pendant 15 jours et des échantillonnages ont été réalisés aux jours 0, 2 et 4 post-infection pour étudier la quantité d'ADN d'OsHV-1 et l'expression de certains gènes viraux dans les tissus d'huîtres.

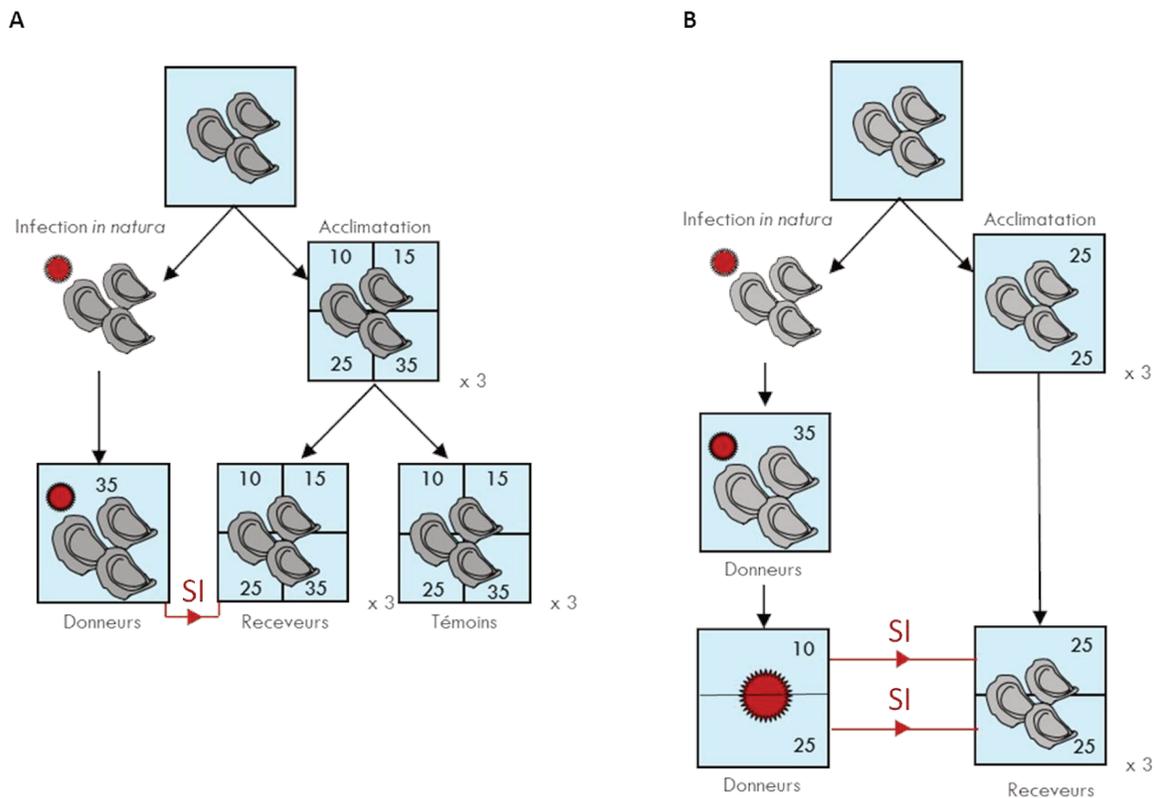


Figure 18: Schémas (A) de l'expérience 1 et (B) de l'expérience 2, SI ; source infectieuse

Ces études ont mis en évidence que la salinité est un facteur de risque de la mortalité induite par OsHV-1 et que son effet est variable selon l'acclimatation des huîtres. La survie d'huîtres acclimatées et

infectées à 10‰ (95%) est supérieure à celles observées à 15, 25, 35‰ (respectivement 73%, 43% et 62%). De plus, les quantités d'ADN viral et les expressions de 4 gènes viraux dans les tissus des huîtres infectées à 10‰ sont réduites en comparaison à ce qui est observé dans les animaux aux salinités plus élevées. Ainsi, le gain de survie observé à 10‰ s'explique par une diminution de l'infectiosité du virus. Ceci est d'ailleurs soutenu par le fait que lorsque la solution infectieuse est traitée à 10‰ avant une mise en contact avec des huîtres maintenues à 25‰ (salinité où la maladie s'exprime) elle n'induit pas de mortalité chez les animaux.

En ce qui concerne les huîtres non-acclimatées, les tendances de survie observées à 15, 25 et 35‰ sont les mêmes que pour les animaux acclimatés. En revanche, les huîtres non-acclimatées et infectées à 10‰ ne survivent qu'à hauteur de 23% en comparaison à plus de 95% lorsqu'elles sont acclimatées à cette même salinité. Comme nous avons montré que le virus OsHV-1 n'est plus actif à une salinité de 10‰, cela suggère que la mort de ces animaux n'est pas due au virus. Chez ces animaux, un choc hyposalin subit simultanément à une exposition à une source infectieuse pourrait en effet expliquer le taux de mortalité observé.

Cette expérience a donc mis en évidence l'importance de l'acclimatation des animaux dans leur réponse à une infection. Le début de l'événement de mortalité des huîtres non-acclimatées et infectées à 10 et 15‰ est retardé respectivement de 6 à 2 jours par rapport à des animaux acclimatés à ces salinités. Cela s'explique probablement par le temps d'acclimatation des huîtres à la salinité et donc au temps qu'il leur a fallu pour retrouver un niveau de filtration identique à celui des animaux maintenus à 25 et 35‰.

Enfin, quel que soit leur niveau d'acclimatation à la salinité, les huîtres infectées à 15, 25 et 35‰ ont la même quantité d'ADN d'OsHV-1 et les mêmes expressions de gènes viraux dans leurs tissus, mais leur survie est différente. La salinité influence les communautés microbiennes (Herlemann et al. 2011, Dupont et al. 2014), il se peut alors que certaines bactéries de la SI ou un dérèglement du microbiote de l'hôte puissent avoir contribué à la modulation de la maladie. Une autre hypothèse pour expliquer ce

différentiel de survie est la réponse métabolique de l'huître à la salinité. Cette hypothèse est développée dans le chapitre 2.

Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)

Marine Fuhrmann¹, Bruno Petton², Virgile Quillien¹, Nicole Faury³, Benjamin Morga³, Fabrice Pernet^{1,*}

¹Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Technopole de Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

²Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Presqu'île du vivier, 29840 Argenton, France

³Ifremer/ Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

ABSTRACT: Mortality of young Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) is occurring worldwide. Here, we examined for the first time the effect of salinity on OsHV-1 transmission and disease-related mortality of *C. gigas*, as well as salinity-related effects on the pathogen itself. To obtain donors for OsHV-1 transmission, we transferred laboratory-raised oysters to an estuary during a disease outbreak and then back to the laboratory. Oysters that tested OsHV-1 positive were placed in seawater tanks (35‰, 21°C). Water from these tanks was used to infect naïve oysters in 2 experimental setups: (1) oysters acclimated or non-acclimated to a salinity of 10, 15, 25 and 35‰ and (2) oysters acclimated to a salinity of 25‰; the latter were exposed to OsHV-1 water diluted to a salinity of 10 or 25‰. The survival of oysters exposed to OsHV-1 water and acclimated to a salinity of 10‰ was >95%, compared to only 43 to 73% survival in oysters acclimated to higher salinities (Expt 1), reflecting differences in the levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression (Expts 1 and 2). However, the survival of their non-acclimated counterparts was only 23% (Expt 2), and the levels of OsHV-1 DNA and the expression of 4 viral genes were low (Expt 1). Thus, OsHV-1 may not have been the ultimate cause of mortality in non-acclimated oysters weakened by a salinity shock. It appears that reducing disease risk by means of low salinity is unlikely in the field.

KEY WORDS: Bivalve · Herpesviridae · Infection · Disease transmission · Risk analysis

INTRODUCTION

Since 2008, massive mortality events of young Pacific oysters *Crassostrea gigas* have been reported in France (Miossec et al. 2009, EFSA AHAW 2010, Barbosa Solomieu et al. 2015, Pernet et al. 2016). These mortality events are associated with the infection of oysters with a newly described genotype (μ Var) of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Segarra et al. 2010). A causal relationship between OsHV-1 and oyster mortality has been established (Schikorski et al. 2011, EFSA AHAW 2015). This virus is now dis-

tributed along the European coastline from Portugal to Scandinavia, and closely related variants have been detected in Australia, New Zealand and Asia (Barbosa Solomieu et al. 2015, EFSA AHAW 2015, Pernet et al. 2016). OsHV-1 now poses a major challenge for Pacific oyster production around the world.

Oysters are grown in estuaries and bays, where they are often exposed to wide salinity fluctuations caused by evaporation, rainfall and inflow from rivers. Salinity may play a role in OsHV-1 transmission and disease development, as reported for other diseases of marine invertebrates (Haskin & Ford 1982, Ragone

*Corresponding author: fabrice.pernet@ifremer.fr

© The authors 2016. Open Access under Creative Commons by Attribution Licence. Use, distribution and reproduction are unrestricted. Authors and original publication must be credited.

Publisher: Inter-Research · www.int-res.com

Calvo et al. 1998, Brothers et al. 2000, Reid et al. 2003, Liu et al. 2006, Ford et al. 2012, Soudant et al. 2013). Indeed, salinity influences host–pathogen interactions by acting directly on the pathogen, the host or both, and it can modulate the severity of the disease.

Most pathogens are susceptible to salinity because of their ionic permeability. For instance, decreasing salinity damages protozoan parasites because they are unable to regulate their cell volume (Ford & Haskin 1988, Burreson et al. 1994). Salinity also affects the occurrence and persistence of bacteria in the aquatic environment. For instance, the optimal salinity for the growth of pathogenic strains of *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* is approximately 20‰ (Vezzulli et al. 2015). To our knowledge, no information is available on the precise effects of salinity on eukaryotic marine viruses, but for viruses that infect bacteria, salinity influences viral adhesion to the hosts or genome injection by altering their envelope or capsid (Cordova et al. 2003, Kukkaro & Bamford 2009, Mojica & Brussaard 2014).

The immune functions of bivalves are influenced by salinity with direct effects on the viability and activity of haemocytes (Matozzo & Marin 2011, Carregosa et al. 2014). Furthermore, the energy allocated for acclimation to salinity can impair defenses against pathogens (Gilles 1972, Shumway 1977, Shumway et al. 1977, Neufeld & Wright 1996). Thus, a change in salinity may increase host susceptibility to pathogens.

The aim of this study was to investigate the effect of salinity on disease transmission and the related mortality of *C. gigas*. Specifically, we examined the effect of salinity (1) on both the host and pathogens and (2) on the pathogens only. For both experiments, oysters were transferred to an estuary during a disease outbreak and then returned to the laboratory. Infected oysters were placed in tanks, and the surrounding seawater was used as a source of infection (SI). The SI was then (1) directed towards recipient oysters held at 4 salinities with or without prior acclimation or (2) brought to a salinity of 10 or 25‰ and directed towards recipient oysters maintained at 25‰. Overall, this method, which has been used in many previous studies (Petton et al. 2013, 2015a,b, Tamayo et al. 2014, Lassudrie et al. 2015, Lemire et al. 2015, Pernet et al. 2015), reproduces the natural infection process and takes into account the fact that OsHV-1 triggers oyster mortality, although other microorganisms can also play a role (Saulnier et al. 2010, Lemire et al. 2015, Petton et al. 2015b).

MATERIALS AND METHODS

Animals

The 4 mo old oysters used in Expts 1 and 2 were taken from 2 cohorts, produced in 2014 and 2015, respectively, according to Petton et al. (2015a). Adults originating from Fouras (France, 46°00'43.2" N, 1°07'02.9" W) were moved to the Ifremer marine station in Argenton (48°48'24.49" N, 3°0'22.84" W) for conditioning in January 2014 and March 2015 for Expts 1 and 2, respectively. These oysters were maintained at 17°C in 500 l flow-through tanks. Fertilization was achieved on 11 March 2014 (Expt 1) and on 28 April 2015 (Expt 2) by stripping the gonads. The embryos developed in 150 l tanks at 21°C for 48 h, and D-larvae were transferred to flow-through rearing systems at 25°C. After 15 d, competent larvae were collected and allowed to settle in downwellers. The entire rearing cycle was conducted in UV-sterilized, 1 µm filtered seawater enriched with living phytoplankton (Petton et al. 2015a). At the onset of both experiments (17 July 2014 and 7 August 2015), the total body mass of oysters was similar at 0.8 ± 0.2 g (mean \pm SD).

During the experiments, oysters were fed with a mixture of *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3) and *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) (1:1 in dry weight). Food concentration was ca. $1300 \mu\text{m}^3 \mu\text{l}^{-1}$ of microalgae at the outlet of the rearing tanks. Seawater was sampled daily at the inlet and outlet of each experimental tank to determine phytoplankton consumption. Cell concentrations were measured using an electronic particle counter (Multisizer 3) equipped with a 100 µm aperture tube. Salinity, temperature, pH and oxygen were controlled daily with the WTW probes cond340, xi3101, pH3310 and FDO 925, respectively. Each tank was lightly bubbled to maintain oxygen levels between 85 and 100% of saturation.

Method of infection

The method of infection was a modified procedure from Petton et al. (2015a). Oysters were transferred on 22 July 2014 (Expt 1) and 6 August 2015 (Expt 2) to a farming area of the Bay of Brest (48°20'06.19" N, 4°19'06.37" W) where oyster mortality was occurring. The salinity was 34‰. After a week of exposure to field conditions, few dead oysters were observed, and the remaining live individuals were moved back to the Ifremer facilities in Argenton. These oysters tested positive for the OsHV-1 µVar strain, and the

level of virus DNA was $1.9 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ copies mg^{-1} fresh weight (mean \pm SD; $n = 3$ pools of 15 oysters); they were therefore considered useful as OsHV-1 donors and placed in 45 l flow-through tanks at 35‰ and 21°C (Petton et al. 2013). The seawater surrounding the donors was used as the SI.

For Expt 1, the SI was connected by flexible tubes fitted inside a peristaltic pump to 45 l tanks ($n = 12$), which contained the recipient oysters at 4 salinities. The other 12 tanks were not connected to the SI and were used as controls. For each tank, the water flow from the SI was 11% of the total water flow (12 l h^{-1}). The water input from the SI was arrested on Day 6, when the recipients exhibited mortality. For Expt 2, the SI was connected to 45 l tanks ($n = 6$), which contained water at either 10 ± 0.7 ‰ (low-salinity tanks, $n = 3$) or 25.1 ± 0.4 ‰ (control tanks, $n = 3$). These salinities were obtained by mixing seawater from the SI (35‰) with fresh water. These tanks were then connected to 45 l tanks ($n = 6$) containing recipient oysters maintained at 25.4 ± 0.2 ‰. In each tank, the water flow from the SI was maintained at 11% of the total water flow fixed at 6 l h^{-1} for 4 d.

Experimental design

We first investigated the effect of 4 salinities (mean \pm SD: 10.2 ± 0.4 , 15 ± 0.8 , 24.9 ± 0.4 , 35.4 ± 0.2 ‰) encountered in the field (Fig. 1) on disease transmission and the subsequent mortality of Pacific oysters (Expt 1). These salinities were obtained by mixing 1 μm filtered and UV sterilized seawater (35‰) with fresh water from the tap (chlorine level $< 0.3 \text{ mg l}^{-1}$). Between 17 and 28 July 2014, oysters were acclimated to each salinity in 45 l tanks (Fig. 2, $n = 6$ tanks, 310 oysters tank $^{-1}$). Filtration rate, i.e. the volume of microalgae consumed per gram of oyster per day, was measured daily in each tank using the following formula: (1)

$$\text{Filtration rate } (\mu\text{m}^3 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \frac{([\text{Cell}_{\text{inlet}}] - [\text{Cell}_{\text{outlet}}]) \times \text{Waterflow}}{\text{Biomass of oysters}}$$

where the variables were the concentrations of microalgae at the inlet and outlet of the tank ($[\text{Cell}_{\text{inlet}}]$ and $[\text{Cell}_{\text{outlet}}]$ in μm^3 of algae per μl of seawater); the water flow in the rearing tank, which was maintained at 12 l h^{-1} ; and the biomass of oysters in each tank. On 28 July 2014 (Day 0), the biomass of acclimated

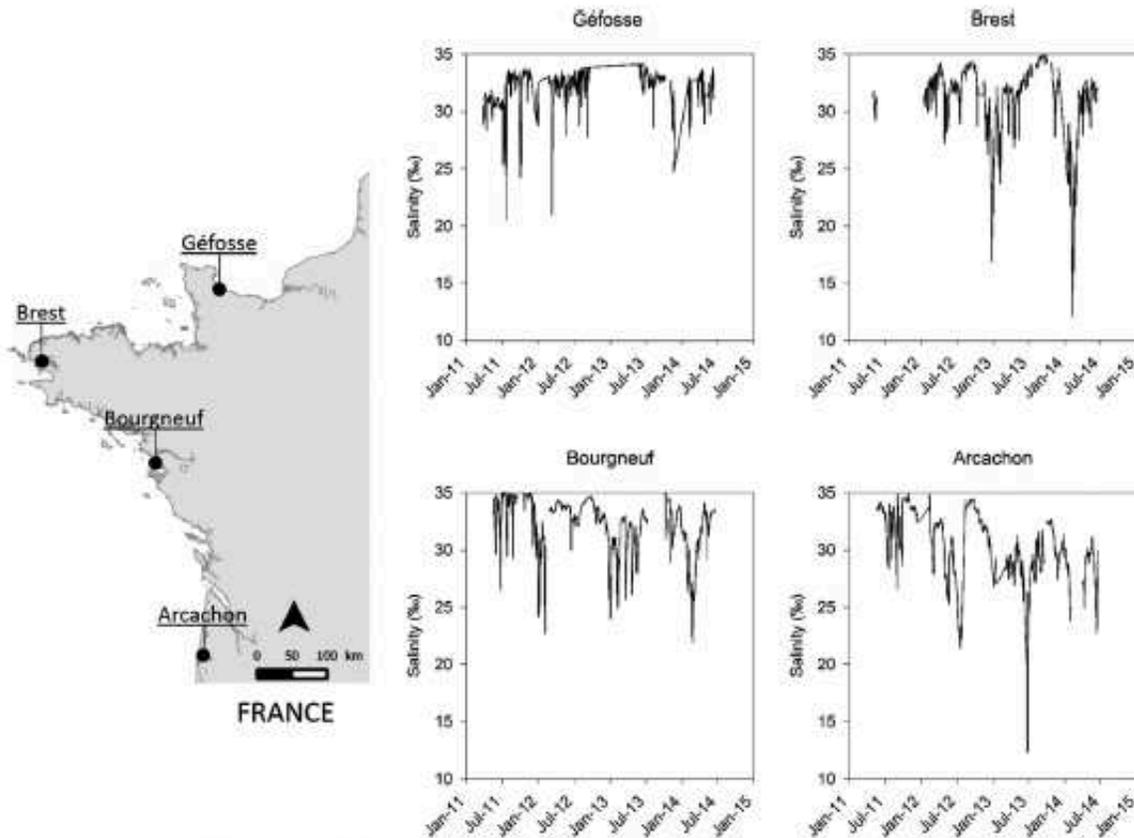


Fig. 1. Seawater salinities from January 2011 to June 2014 in 4 oyster farming areas along the French coast

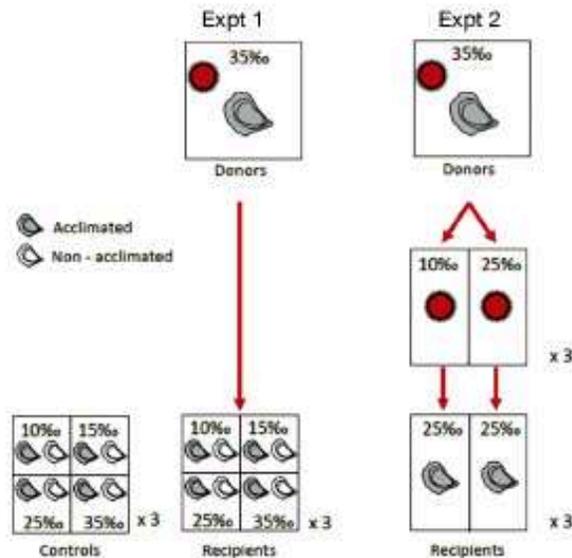


Fig. 2. Schematic of experimental designs. Expt 1: Study of the effect of salinity on disease transmission and related mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, in particular in the presence of ostreid herpesvirus OsHV-1 μ Var. We used 2 infection levels \times 4 salinity treatments \times 3 replicate tanks \times 2 acclimation levels (within tank). Expt 2: Study of the effect of salinity on pathogens, in particular on OsHV-1 μ Var. We used 2 salinity treatments \times 3 replicate tanks

oysters was standardized at ca. 160 g in each tank to remedy differences in the growth rates among the salinity treatments. In the same tanks, 160 g of non-acclimated oysters were added. Half of the tanks were connected for 6 d to the SI, and the other half were used as controls. Survival of recipient oysters was monitored daily for 17 d, and dead oysters were removed from tanks.

We then investigated the effect of salinity on the infectivity of OsHV-1 (Expt 2). Between 7 and 13 August 2015, oysters were acclimated at 25‰ in 45 1 tanks (Fig. 2, $n = 6$ tanks, 180 oysters tank⁻¹). On 13 August 2015 (Day 0), the biomass of acclimated oysters was standardized at ca. 150 g of total oyster biomass in each tank. The tanks were connected to the SI. Survival of recipient oysters was monitored daily for 14 d, and dead oysters were removed from tanks.

Alive recipient oysters (15 for Expts 1 and 10 for Expt 2) were sampled in each tank on Days 0, 2 and 4 before the onset of mortality (Petton et al. 2013, 2015a). Whole tissues were removed from the shells, pooled together, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The oyster tissues were then ground in liquid nitrogen with a MM400 homogenizer (Retsch), and the resulting oyster powder was subsampled (30 mg of fresh weight) for quantification of OsHV-1 DNA and viral gene expression.

OsHV-1 DNA quantification

These analyses were conducted by the Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Hérault (Montpellier, France) using oyster powder homogenized in sterile artificial seawater (Pepin et al. 2008). Total DNA was then extracted with a QIAamp tissue mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The extract was stored at -20°C before detection and quantification according to a real-time PCR protocol based on SYBR® Green chemistry (Pepin et al. 2008) with specific primers validated by Webb et al. (2007). The results were expressed as the number of OsHV-1 DNA copies per mg of wet tissue.

OsHV-1 gene expression

Total RNA was extracted with EXTRACT-ALL® (Eurobio) according to the manufacturer's recommendation, and 20 μg of extracted RNA were then removed from the genomic DNA using a DNase Max™ Kit (MO Bio). The RNA quantity and quality were determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Ambion®). A No-RT was then performed to confirm the absence of genomic DNA. First-strand cDNA synthesis was performed using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) on 500 ng of treated RNA.

The OsHV-1 genome has 207 439 bp and contains 124 unique genes (Davison et al. 2005). In this study, open reading frames 72, 75, 87 and 117 were selected from Segarra et al. (2014). These genes encode for a membrane protein, a dUTPase enzyme, an apoptosis inhibitor and a ring finger protein (Davison et al. 2005, Segarra et al. 2014). Gene expression was expressed as a delta threshold cycle number (Ct) and calculated using the following formula: Ct viral gene - Ct house-keeping gene (elongation factor).

Real-time (RT) quantitative PCRs were performed with an Mx3005P Thermocycler sequence detector (Agilent). The forward and reverse primers used for this study were described by Segarra et al. (2014). Amplification reactions were done in duplicate in a total volume of 20 μl . Each well contained 5 μl of cDNA solution (1/30, diluted in nuclease-free water), 10 μl of Brilliant® SYBR® Green III PCR mix (Agilent), 2 μl of forward and reverse primers (3 μM) and 1 μl of distilled water. The thermal cycling conditions for the PCRs were 3 min at 95°C followed by 40 amplification cycles at 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. To ensure the specificity of the primers used, melting curves were plotted (55 – 95°C). For each qPCR,

negative controls were included to rule out DNA contamination.

Statistical analyses

ANOVAs

The differences in oyster total body mass at the end of the acclimation period among the salinity treatments were analysed by ANOVA (Expt 1). Mixed-design ANOVAs were performed to assess differences in (1) the filtration rate depending on salinity (4 levels, main plots) and acclimation time (8 levels, subplots); (2) the levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression in oysters, depending on (1) salinity and infection (4 × 2 levels, main plot), acclimation (2 levels, subplots), time (for DNA only, 2 levels, sub-subplots) (Expt 1) and (2) salinity (2 levels, main plots) and time (2 levels, subplots) (Expt 2). Differences in viral gene expression among the salinity treatments were analysed by ANOVA (Expt 2).

The unit of replication was the tank in which the salinity and infection treatments were applied. All mutual interactions among the factors were tested, and Tukey's HSD was used as a post hoc test. The normality of residuals and homogeneity of variances were graphically checked, and the data were log (x + 1) transformed where necessary. ANOVAs were carried out using R (www.R-project.org/).

Survival analysis

Nonparametric estimates of the survivor function were computed according to Kaplan & Meier (1958). Survival time was measured as days from the onset of the experiment (Day 0) when oysters were exposed to the SI. The data were read as the number of dead animals within each tank on each day. Survival curves of exposed oysters were plotted and compared among the salinity treatments.

In Expt 1, the survival time curves of oysters connected to the SI were compared using the Cox regression model (Cox 1972) after adjustment for the effect of salinity and acclimation. The survival of control oysters (not exposed to the SI) was not included in the statistical models because it was always

>95%. The proportionality of hazards (PH) was checked with martingale residuals (Lin et al. 1993, Lee & Wang 2013). Because the PH assumption was violated, time-dependent covariates representing the interaction of the original covariates and time were added to the model. Time (*t*) was defined as dichotomous: *t* ≤ 6 d or *t* > 6 d. Custom hazard ratios were produced by means of contrasts. Cox regression was conducted using SAS 9.4 (SAS Institute).

RESULTS

Salinity modulates host–pathogen interaction (Expt 1)

Prior to the experiment, the filtration rates of oysters at 10 and 15‰ were initially lower than those of oysters at 25–35‰. The rates then increased during the first 2 to 6 d of acclimation until reaching the filtration rates of oysters at 25–35‰ (Fig. 3A, Table S1 in the Supplement at www.int-res.com/articles/suppl/q008p543_supp.pdf). At the end of the acclimation period, the total body mass of oysters at different salinity levels was ranked as follows: 10 < 15 < 25 = 35‰ (Fig. 3B, Table S2 in the Supplement). At 10‰, the oysters did not grow (*p* = 0.103).

Survival of control oysters was 99.1 ± 1.9% (mean ± SD) irrespective of salinity and acclimation treatments. Consequently, only oysters exposed to the SI were considered in this section.

At the end of the experiment, the survival of oysters exposed to the SI and acclimated at 10‰ was higher (95.8%) than that of oysters held at 15, 25 and 35‰,

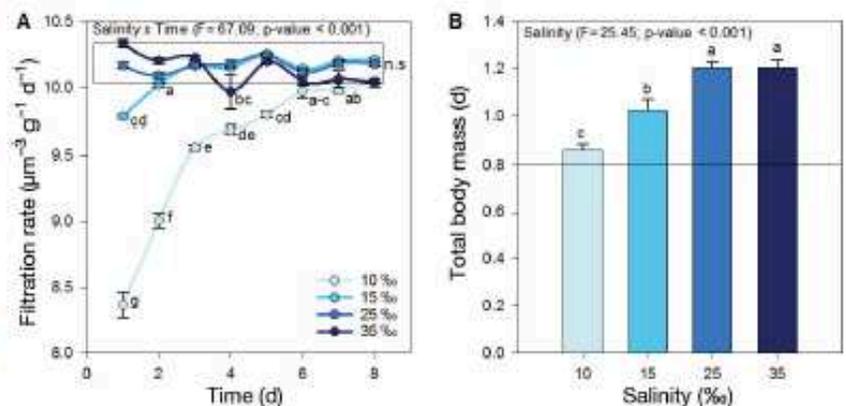


Fig. 3. (A) Filtration rate of Pacific oysters *Crassostrea gigas* during acclimation to salinity. (B) Body mass of oysters as a function of salinity after 11 d of acclimation (Expt 1). Data are means ± SE between replicates (*n* = 6). Letters indicate significant differences. Filtration rate was log (x + 1) transformed

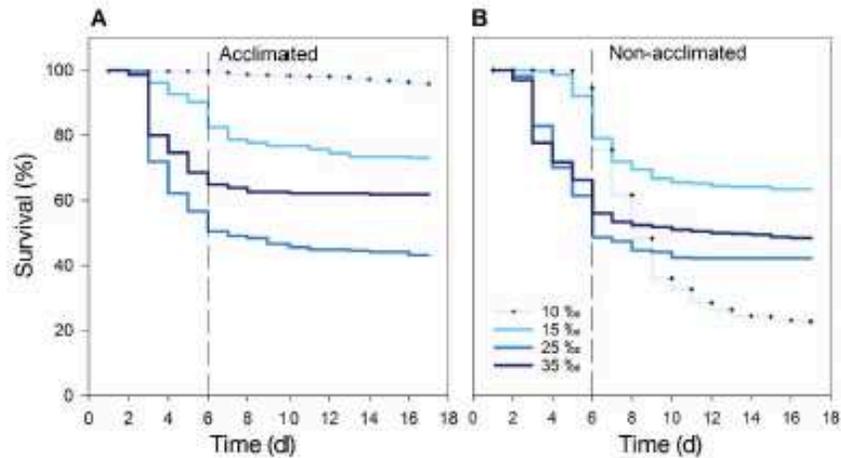


Fig. 4. Survival of Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed to the source of infection at 4 salinities (A) with or (B) without prior acclimation. Survival time was measured as days from the onset of exposure to the source of infection.

where survival was 73.2, 43.2 and 61.9%, respectively (Fig. 4A). In contrast, when oysters were exposed to the SI without prior acclimation to the salinity, their survival at 10‰ was markedly lower (22.8%) than at 15, 25 and 35‰, where survival was 63.5, 42.2 and 48.5%, respectively (Fig. 4B).

During the first 6 d, the oyster mortality hazard was ranked as $10 < 15 < 35 < 25‰$ or $10 < 15 < 25 = 35‰$ for acclimated and non-acclimated oysters, respectively (Table S3 in the Supplement). Between 7 and 17 d, the mortality hazard in acclimated oysters remained fairly similar ($10 < 35 < 15 < 25‰$) to that observed between 0 and 6 d. Overall, low salinity decreased the risk of mortality of acclimated oysters exposed to the SI. This was not the case in non-acclimated oysters, where the mortality hazard at 10‰ was 3 to 4 times higher than that at 15–35‰ between 7 and 17 d (Table S3).

On Day 0, OsHV-1 DNA was not detected in recipient oysters. Salinity influenced the levels of OsHV-1 DNA in exposed oysters but not in controls on Days 2 and 4 (Fig. 5A, Table S4 in the Supplement). In fact, at 10‰, the level of OsHV-1 DNA in exposed oysters was as low as in the controls (4.7×10^3 copies mg^{-1}), but it reached more than 10^6 copies mg^{-1} at higher salinities. Viral gene expression in exposed oysters was ranked as $10 < 15 = 25 = 35‰$, and at 10‰ it was as low as in the controls (Fig. 5B, Table S5 in the Supplement).

Low salinity reduces OsHV-1 infectivity (Expt 2)

When the SI was treated for 7 h at 10‰ before coming into contact with oysters at 25‰, survival of the

oysters remained 100% (Fig. 6A). In contrast, when the SI was treated at 25‰ (control), survival decreased to 44.8% after 14 d. The level of OsHV-1 DNA in oysters exposed to the SI treated at 10‰ was markedly reduced compared to that of controls (Fig. 6B, Table S6 in the Supplement). The levels of viral gene expression in oysters after the SI was treated at 10‰ were lower than that expressed after exposure to 25‰ (Fig. 6C, Table S7 in the Supplement).

DISCUSSION

The survival of oysters exposed to the SI and acclimated at 10‰ was always >95%, compared to only 43 to 73% at higher salinities. Concomitantly, the levels of OsHV-1 DNA and the expression of 4 viral genes in oysters were lower at 10‰ than at other salinities. Therefore, the high survival at 10‰ coincided with low levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression. Although the effect of salinity on virus–bivalve interactions has never been investigated, it is known to influence other host–pathogen interactions in the marine environment. Indeed, low salinity reduces the disease risk and prevalence of protozoan parasites in oysters and clams (Andrews & Wood 1967, Haskin & Ford 1982, Ragone Calvo et al. 1998, Brothers et al. 2000, Soudant et al. 2013). We further investigated whether the increased survival of oysters acclimated at 10‰ exposed to the SI reflects changes in pathogen infectivity or in host physiology or both.

Low salinity (10‰) clearly reduced OsHV-1 infectivity because (1) the survival of oysters held at 25‰

and further exposed to the SI previously treated at 10‰ was 100%, compared to only 45% in oysters exposed to the SI treated at 25‰, and (2) the levels of OsHV-1 DNA and the viral gene expression in oysters were much lower when the SI was treated at 10‰. Studies show that salinity influences the infectivity of bacteriophages by altering their structures and changing the adsorption rate to host cells (Mojica & Brussaard 2014). It is likely that OsHV-1, as an enveloped virus (Renault et al. 2004, Davison et al. 2005), is particularly susceptible to changes in envi-

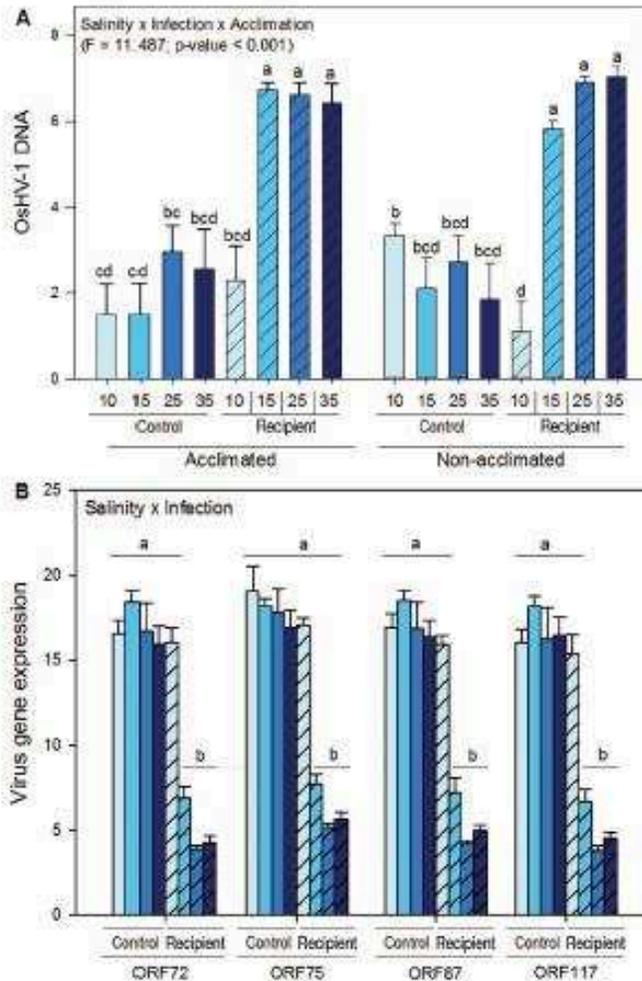


Fig. 5. (A) Quantification of OsHV-1 DNA, expressed as DNA copy numbers per mg of fresh weight and (B) virus gene expression as a delta threshold cycle number (Ct) of OsHV-1 open reading frames (ORFs) relative to Pacific oyster *Crassostrea gigas* elongation factor in live oysters as a function of salinity, exposure to the source of infection and acclimation. Data are means \pm SE (n = 3 tanks). For OsHV-1 DNA, data were log (x+1) transformed and are the means of Days 2 and 4. The viral gene expression analyses were conducted on Day 2 only. Different letters indicate significant differences

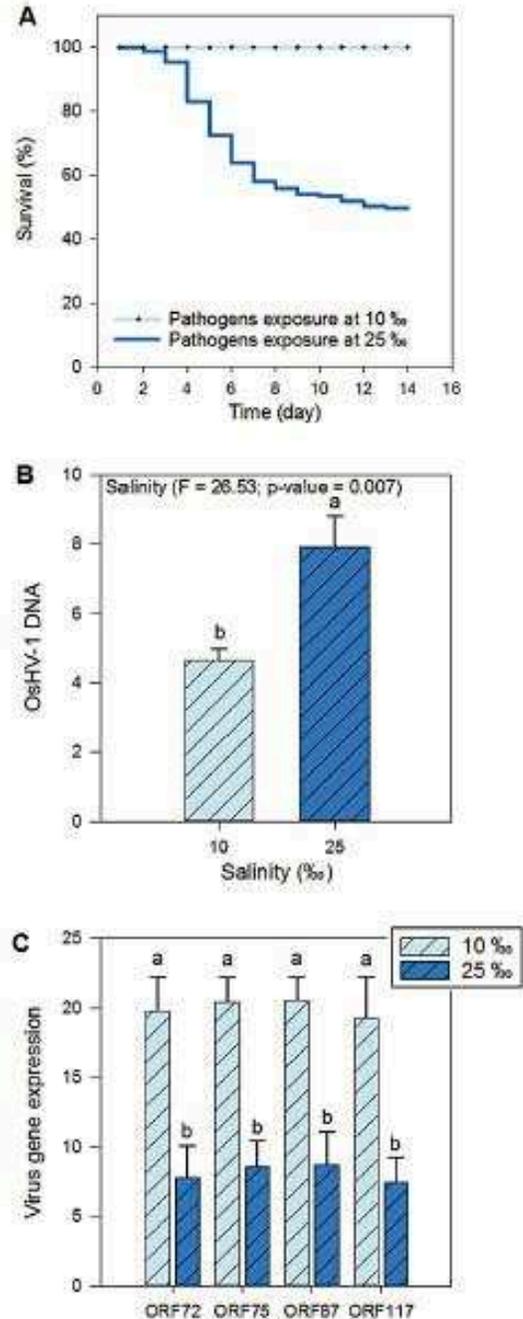


Fig. 6. (A) Survival of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, (B) quantification of OsHV-1 DNA, expressed as DNA copies number per mg of fresh weight and (C) virus gene expression as a delta threshold cycle number (Ct) of OsHV-1 open reading frames (ORFs) relative to *C. gigas* elongation factor in live recipient oysters maintained at 25‰ and exposed to the source of infection previously treated at 10 and 25‰. Survival time was measured as days from the onset of exposure to the source of infection. Data are means \pm SE (n = 3 tanks). For OsHV-1 DNA, the data were log (x+1) transformed and are the means of Days 2 and 4. The gene expression analyses were conducted on Day 2 only. Different letters indicate significant differences

ronmental parameters such as salinity. This type of virus is generally more susceptible to environmental changes than non-enveloped viruses (Lucas 2001, Kukkaro & Bamford 2009).

Prior acclimation to salinity plays a major role in the host response to a pathogen. The survival of oysters exposed to the SI and acclimated at 10‰ was always >95%, whereas the survival of their non-acclimated counterparts held in the same tanks was only 23%. Nevertheless, the levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression in these non-acclimated oysters were similar to those of controls and acclimated animals that showed no significant mortality. Therefore, OsHV-1 may not be the cause of mortality in these oysters. A more likely hypothesis is that another microorganism killed these animals simultaneously weakened by a salinity shock. In our study, donors were infected in the field where the OsHV-1-induced mortality occurred, and they may have introduced a diversity of *Vibrio* species or other pathogens to the recipients (Lemire et al. 2015, Petton et al. 2015b). In addition, acute exposure to low salinity may have altered the defenses of oysters either directly by impairing their immunity (Matozzo & Marin 2011, Carregosa et al. 2014, Knowles et al. 2014) or indirectly by causing the oysters to allocate energy to regulate intracellular osmotic concentrations (Gilles 1972, Shumway 1977, Shumway et al. 1977, Neufeld & Wright 1996), thus compromising the defense response.

Oyster mortality began after only 2 to 3 d of exposure to the SI except for the non-acclimated animals at 10 and 15‰, in which it occurred after 6 d. This delay may reflect salinity acclimation time. Indeed, bivalves exposed to an acute change in salinity first close their shells and reduce feeding (Pierce & Greenberg 1972). This behaviour was observed during acclimation prior to the experiment. Considering that suspension feeding is the portal of entry for pathogens in bivalves (Ben-Horin et al. 2015), the reduction in the oyster feeding rate at low salinity may have decreased the pathogen exposure, leading to delayed mortality.

At the onset of infection, oysters acclimated to different salinities showed major differences in growth, but their levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression after 2 d were similar. Therefore, it seems that the growth rate of oysters did not influence OsHV-1 replication. This result may appear somewhat paradoxical with the idea that the host cell machinery modulates the replication of herpes viruses (Lyman & Enquist 2009). More fundamental information on the physiology of the host with

respect to viral infection is needed. For instance, the impact of oyster growth conditions on their susceptibility to the virus and on the rate of virus proliferation has never been studied.

Differences in oyster survival at 15, 25 and 35‰ with similar levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression may reflect differences in bacterial communities. Indeed, several non-pathogenic bacteria contribute to the mortality of oysters (Lemire et al. 2015), and salinity is a major factor shaping the bacterial community in marine ecosystems (Herlemann et al. 2011, Dupont et al. 2014).

Estuaries and coasts, the natural habitats of oysters, are generally subject to wide fluctuations in salinity. However, salinities lower than 15‰ occur for only a few hours or days under natural field conditions in France (Fig. 1). Therefore, it appears that oysters are rarely acclimated to low salinity in the field, and reducing disease risk by means of low salinity is unlikely.

Acknowledgements. We thank the Ifremer staff involved in oyster and algae production at Argenton, the shellfish network Resco II (http://www.ifremer.fr/observatoire_conchylicole) and Sébastien Petton for processing the salinity data. We are grateful to Pierrick Le Souchu and Christian Mingant for their help with the experimental set-up and to Martin Protat, David Tamayo, Isabelle Quéau, Véronique Loiseau, Anaïs Guyon and Gaëlle Richard for their help with sampling. We also thank Morgane Chalopin for helping with the RNA analyses, Gaëtan Daigle for statistical advice and Marie-Agnes Travers for discussions. This work was supported by the GIGASSAT project funded by ANR-AGRO-BIOSPHERE No. ANR-12-AGRO-0001-01 (www.gigassat.org).

LITERATURE CITED

- ▶ Andrews JD, Wood JL (1967) Oyster mortality studies in Virginia. VI. History and distribution of *Minchinia nelsoni*, a pathogen of oysters, in Virginia. *Chesap Sci* 8:1–13
- ▶ Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers MA (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2–10
- ▶ Ben-Horin T, Bidegain G, Huey L, Narvaez DA, Bushek D (2015) Parasite transmission through suspension feeding. *J Invertebr Pathol* 131:155–176
- ▶ Brothers C, Marks E, Smolowitz R (2000) Conditions affecting the growth and zoosporulation of the protistan parasite QPX in culture. *Biol Bull (Woods Hole)* 199:200–201
- ▶ Burreson EM, Ragone Calvo LM, Lapeyre JF, Counts F, Paynter KT (1994) Acute osmotic tolerance of cultured-cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa, Perkinsida). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 109:575–582
- ▶ Carregosa V, Velez C, Soares A, Figueira E, Freitas R (2014) Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 177:178:1–9

- ▶ Cordova A, Deserno M, Gelbart WM, Ben-Shaul A (2003) Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophys J* 85:70–74
- Cox DR (1972) Regression models and life tables. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol* 20:187–220
- ▶ Davison AJ, Trus BL, Cheng NQ, Steven AC and others (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86:41–53
- ▶ Dupont CL, Larsson J, Yooseph S, Ininbergs K and others (2014) Functional tradeoffs underpin salinity-driven divergence in microbial community composition. *PLOS ONE* 9:e89549
- ▶ EFSA AHAW (European Food Safety Agency Panel on Animal Health and Welfare) (2010) Scientific opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European commission on the increased mortality events in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. EFSA J 8: 1894–1953
- EFSA AHAW (2015) Oyster mortality. EFSA J 13:4122
- ▶ Ford SE, Haskin HH (1988) Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 90:183–187
- ▶ Ford SE, Scarpa E, Bushek D (2012) Spatial and temporal variability of disease refuges in an estuary: implications for the development of resistance. *J Mar Res* 70:253–277
- ▶ Gilles R (1972) Osmoregulation in three molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). *Biol Bull (Woods Hole)* 142:25–35
- ▶ Haskin HH, Ford SE (1982) *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on Delaware Bay seed oyster beds—a host-parasite relationship along a salinity gradient. *J Invertebr Pathol* 40: 388–405
- ▶ Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5:1571–1579
- ▶ Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457–481
- ▶ Knowles G, Handlinger J, Jones B, Moltschanivskyj N (2014) Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. *J Invertebr Pathol* 121:78–84
- ▶ Kukkaro P, Bamford DH (2009) Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environ Microbiol Rep* 1:71–77
- ▶ Lassudrie M, Soudant P, Nicolas JL, Fabioux C and others (2015) Interaction between toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* exposure and disease associated with herpesvirus OsHV-1 μ Var in Pacific oyster spat *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 45:53–61
- Lee ET, Wang JW (2013) Statistical methods for survival data analysis. Encyclopedia Life Science. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ
- ▶ Lemire A, Goudenege D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y, Le Roux F (2015) Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* 9:1523–1531
- ▶ Lin DY, Wei LJ, Ying Z (1993) Checking the Cox model with cumulative sums of martingale-based residuals. *Biometrika* 80:557–572
- ▶ Liu B, Yu ZM, Song XX, Guan YQ, Jian XF, He JF (2006) The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 253:163–170
- Lucas W (2001) Viral capsids and envelopes: structure and function. Encyclopedia Life Science. John Wiley & Sons, Chichester
- ▶ Lyman MG, Enquist LW (2009) Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *J Virol* 83:2058–2066
- Matozzo V, Marin MG (2011) Bivalve immune responses and climate changes: Is there a relationship? *Invertebr Surviv J* 8:70–77
- Miossec L, Allain G, Arzul I, Francois C, Garcia C, Cameron A (2009) First results of an epidemiological study on oyster (*Crassostrea gigas*) mortality events in France during summer 2008. ISVEE XII—International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa
- ▶ Mojica KDA, Brussaard CPD (2014) Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiol Ecol* 89:495–515
- ▶ Neufeld DS, Wright SH (1996) Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *J Exp Biol* 199: 473–484
- ▶ Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269–276
- ▶ Pernet F, Tamayo D, Petton B (2015) Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* 445:57–62
- ▶ Pernet F, Lupo C, Bacher C, Whittington RJ (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371: 20150213
- ▶ Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquacult Environ Interact* 3:257–273
- ▶ Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015a) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquacult Environ Interact* 6: 205–222
- ▶ Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015b) *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* 6:686
- Pierce SK, Greenberg MJ (1972) The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J Exp Biol* 57: 681–692
- ▶ Ragone Calvo LM, Walker JG, Burreson EM (1998) Prevalence and distribution of QPX, Quahog Parasite Unknown, in hard clams *Mercenaria mercenaria* in Virginia, USA. *Dis Aquat Org* 33:209–219
- ▶ Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH (2003) Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 56:249–258
- ▶ Renault T, Arzul I, Lipart C (2004) Development and use of an internal standard for oyster herpesvirus 1 detection by PCR. *J Virol Methods* 121:17–23
- ▶ Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C (2010) A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb Ecol* 59:787–798
- ▶ Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pepin JF (2011) Experimental infection of Pacific oyster

- Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* 42:27
- ▶ Segarra A, Pepin JF, 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
 - ▶ Segarra A, Faury N, Pépin JF, Renault T (2014) Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J Invertebr Pathol* 119:5–11
 - ▶ Shumway SE (1977) Effect of salinity fluctuation on osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in hemolymph of bivalve molluscs. *Mar Biol* 41: 153–177
 - ▶ Shumway SE, Gabbott PA, Youngson A (1977) Effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin-positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve molluscs. *J Exp Mar Biol Ecol* 29:131–150
 - ▶ Soudant P, Chu FLE, Volety A (2013) Host-parasite interactions: marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J Invertebr Pathol* 114:196–216
 - ▶ Tamayo D, Corporeau C, Petton B, Quere C, Pernet F (2014) Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OshV-1 μ Var. *Aquaculture* 432:304–310
 - ▶ Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, Stagnaro L, Venier P, Pruzzo C (2015) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* 17:1065–1080
 - ▶ Webb SC, Fidler A, Renault T (2007) Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OshV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272: 126–139

Editorial responsibility: Megan La Peyre,
Baton Rouge, Louisiana, USA

Submitted: June 13, 2016; Accepted: July 31, 2016
Proofs received from author(s): September 6, 2016

2.2 Informations supplémentaires

Table S1: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of salinity (10, 15, 25, 35‰) and time (days 1 to 8 since the start of acclimation) and their interaction on the filtration rate of oysters. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	Sum square	Mean square	F	p
Main plot					
Salinity	3	12.4	4.1	340.0	< 0.001
Error a: Tank \times Salinity	20	0.2	0.01		
Subplot					
Time	7	4.5	0.6	79.1	< 0.001
Salinity \times Time	21	11.5	0.5	67.1	< 0.001
Error b: Tank \times Salinity \times Time	140	1.14	0.01		

Table S2: Results of a one-way ANOVA investigating the effect of salinity (10, 15, 25, 35‰) on the body mass of oysters. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	Sum square	Mean square	F	p
Salinity	3	0.493	0.2	25.45	< 0.001
Error: Tank \times Salinity	20	0.129	0.006		

Table S3: Odds of oyster mortality as a function of salinity (10, 15, 25, 35‰), acclimation (acclimated: A, non-acclimated: NA), and time (days 0 to 6 and 7 to 17). Custom hazard ratios were produced with exponentiated contrasts. The table also contains the standard error (SE) of the hazard ratio estimate and the confidence interval (CI) of the hazard ratio, the Wald χ^2 statistic and the resulting p-value. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Contrast Variable	Odds ratio	SE	95 % CI	Khi-2 de Wald	Pr > Khi-2
day 0 - day 6					
10 A vs 15 A	0.036	0.015	0.016 - 0.083	62.3	< 0.001
10 A vs 25 A	0.006	0.003	0.003 - 0.014	142.9	< 0.001
10 A vs 35 A	0.009	0.004	0.004 - 0.023	109.5	< 0.001
15 A vs 25 A	0.171	0.013	0.147 - 0.199	519.7	< 0.001
15 A vs 35 A	0.259	0.041	0.190 - 0.352	74.1	< 0.001
25 A vs 35 A	1.516	0.259	1.084 - 2.119	5.9	0.015
10 NA vs 15 NA	0.693	0.184	0.411 - 1.166	1.9	0.167
10 NA vs 25 NA	0.112	0.023	0.075 - 0.166	117.0	< 0.001
10 NA vs 35 NA	0.123	0.020	0.090 - 0.168	172.0	< 0.001
15 NA vs 25 NA	0.161	0.041	0.099 - 0.249	52.8	< 0.001
15 NA vs 35 NA	0.177	0.039	0.115 - 0.272	62.8	< 0.001
25 NA vs 35 NA	1.098	0.154	0.834 - 1.446	0.4	0.504
10 A vs 10 NA	0.070	0.033	0.027 - 0.179	30.8	< 0.001
15 A vs 15 NA	1.328	0.279	0.880 - 2.003	1.8	0.177
25 A vs 25 NA	1.255	0.127	1.030 - 1.529	5.1	0.024
35 A vs 35 NA	0.909	0.107	0.722 - 1.145	0.7	0.419
day 7 - day 17					
10 A vs 15 A	0.177	0.045	0.108 - 0.290	47.4	< 0.001
10 A vs 25 A	0.138	0.033	0.086 - 0.220	68.2	< 0.001
10 A vs 35 A	0.366	0.121	0.191 - 0.700	9.2	0.002
15 A vs 25 A	0.775	0.069	0.651 - 0.922	8.2	0.004
15 A vs 35 A	2.061	0.502	1.278 - 3.323	8.8	0.003
25 A vs 35 A	2.659	0.619	1.685 - 4.197	17.6	< 0.001
10 NA vs 15 NA	3.185	0.183	2.846 - 3.565	406.0	< 0.001
10 NA vs 25 NA	3.064	0.468	2.271 - 4.132	53.8	< 0.001
10 NA vs 35 NA	3.803	0.902	2.390 - 6.053	31.8	< 0.001
15 NA vs 25 NA	0.962	0.129	0.739 - 1.251	0.1	0.772
15 NA vs 35 NA	1.194	0.273	0.763 - 1.870	0.6	0.438
25 NA vs 35 NA	1.242	0.328	0.739 - 2.085	0.7	0.414
10 A vs 10 NA	0.031	0.007	0.019 - 0.049	214.8	< 0.001
15 A vs 15 NA	0.551	0.039	0.479 - 0.634	69.3	< 0.001
25 A vs 25 NA	0.684	0.083	0.539 - 0.867	9.8	0.002
35 A vs 35 NA	0.319	0.039	0.252 - 0.405	87.9	< 0.001

Table S4: Results of the split-split plot ANOVA investigating the effect of salinity (10, 15, 25, 35%), exposure to the source of infection (exposed, control) acclimation (acclimated, non-acclimated) and time (days 2 and 4) and their interactions on the level of OsHV-1 DNA in oyster tissues. Data were log (x+1) transformed. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	Sum square	Mean square	F	p
Mainplot					
Salinity	3	108.8	36.3	36.12	< 0.001
Infection	1	222.8	222.8	221.96	< 0.001
Salinity × Infection	3	115.0	38.3	38.19	< 0.001
Error: Tank × Salinity × Infection	16	16.1	1.0		
Subplot					
Acclim	1	0.01	0.01	0.02	0.885
Salinity × Acclim	3	0.8	0.3	0.49	0.693
Infection × Acclim	1	2.7	2.7	5.19	0.037
Salinity × Infection × Acclim	3	17.7	5.9	11.49	< 0.001
Error a: Tank × Salinity × Infection × Acclim	16	8.2	0.5		
Sub-subplot					
Time	1	63.0	63.0	50.86	< 0.001
Salinity × Time	3	10.8	3.6	2.90	0.050
Infection × Time	1	9.6	9.6	7.76	0.009
Acclim × Time	1	0.02	0.02	0.02	0.895
Salinity × Infection × Time	3	5.7	1.9	1.53	0.226
Salinity × Acclim × Time	3	3.4	1.1	0.92	0.443
Infection × Acclim × Time	1	0.2	0.2	0.18	0.679
Salinity × Infection × Acclim × Time	3	5.6	1.9	1.51	0.232
Error b: Tank × Salinity × Infection × Acclim × Time	32	39.6	1.2		

Table S5: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of salinity, exposure to the source of infection, acclimation and their interactions on the OsHV-1 gene expression in oyster tissues at day 2. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	ORF72		ORF75		ORF87		ORF117	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Main plot									
Salinity	3	23.9	< 0.001	43.0	< 0.001	26.6	< 0.001	16.0	< 0.001
Infection	1	257.8	< 0.001	371.1	< 0.001	305.8	< 0.001	212.4	< 0.001
Acclim	1	0.8	0.389	0.7	0.419	1.0	0.333	0.6	0.463
Salinity × Infection	3	26.3	< 0.001	26.4	< 0.001	28.1	< 0.001	20.6	< 0.001
Error a: Tank × Salinity × Infection	15								
Subplot									
Acclim	1	0.8	0.376	0.1	0.731	0.1	0.777	0.6	0.441
Salinity × Acclim	3	0.5	0.688	0.4	0.789	1.0	0.406	0.5	0.71
Infection × Acclim	1	0.3	0.615	0.6	0.442	0.01	0.910	0.2	0.657
Salinity × Infection × Acclim	3	2.4	0.109	0.6	0.639	1.7	0.201	1.2	0.342
Error b: Tank × Salinity × Infection × Acclim	15								

Table S6: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of salinity (10, 25%), time (days 2 and 4) and their interaction on the level of OsHV-1 DNA in oyster tissues. Data were log (x+1) transformed. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	Sum square	Mean square	F	p
Main plot					
Salinity	1	32.4	32.4	26.53	0.007
Error a: Tank × Salinity	4	4.9	1.2		
Subplot					
Time	1	5.1	5.1	11.26	0.028
Salinity × Time	1	1.1	1.1	2.51	0.188
Error b: Tank × Salinity × Time	4	1.8	0.5		

Table S7: Results of the ANOVA investigating the effect of salinity (10, 25‰) on the OsHV-1 gene expression in oyster tissues at day 2. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

OsHV-1 genes	Source of variation	d.f	Sum square	Mean square	F	p
ORF72	Salinity	1	214.80	214.80	12.67	0.024
	Residuals	4	67.82	16.96		
ORF75	Salinity	1	211.10	211.10	20.95	0.010
	Residuals	4	40.30	10.07		
ORF87	Salinity	1	209.81	209.81	16.4	0.016
	Residuals	4	51.17	12.79		
ORF117	Salinity	1	208.74	208.74	11.5	0.028
	Residuals	4	72.59	18.15		

3 Complément d'étude

En complément des mesures d'ADN et d'ARN d'OshV-1 réalisées sur les échantillons d'huîtres des expériences 1 et 2, des mesures d'expression du gène interferon-induced protein 44 (IFI44) de l'hôte ont été réalisées pour les échantillons d'huîtres maintenues aux salinités 10 et 25‰. Ce gène est impliqué dans la réponse antivirale et son expression augmente dans l'hémolymphe de juvéniles de *C. gigas* lors de l'exposition à OshV-1 (Renault et al. 2011). Les résultats obtenus sont présentés Figure 19.

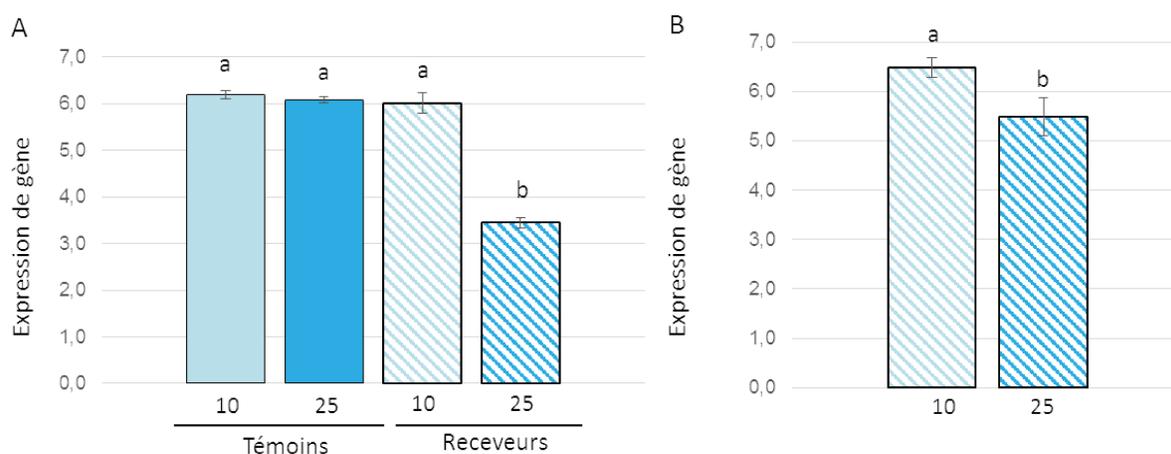


Figure 19: Expression du gène IFI44 (Delta Ct) de l'hôte *C. gigas* lors (A) de l'expérience 1 et (B) de l'expérience 2

Dans l'**expérience 1** l'infection par OshV-1 à 25‰ a provoqué une activation du gène IFI44 dans les tissus des huîtres en accord avec ce qui a été précédemment observé (Renault et al. 2011). L'expression de ce gène est seulement influencée par l'interaction entre la salinité et l'infection et est indépendante de l'acclimatation des animaux. Ainsi, les huîtres non-acclimatées à 10‰ qui survivent seulement à hauteur de 23% n'ont pas mis en place de réponse immunitaire en lien avec le gène IFI44. Cela pourrait laisser penser que la faible survie soit alors davantage expliquée par un affaiblissement métabolique de l'huître en réponse au choc salin plutôt qu'à une réponse à une infection. On peut se demander si la réduction de l'expression du gène IFI44 dans les huîtres à 10‰ est due à l'effet de la salinité sur l'infectiosité de la SI ou si le gène est inhibé chez l'huître. L'**expérience 2** permet de montrer que le traitement de la SI à 10‰

avant l'infection d'huîtres à 25% ne provoque pas d'augmentation de l'expression du gène IFI44 chez les animaux en comparaison à ce qui se passe lorsque la SI est traitée à 25%. Ainsi, ce résultat confirme la réduction d'infectiosité d'OsHV-1 et de manière plus globale une diminution de l'infectiosité de la SI à 10%.

Chapitre 2 : Réponse métabolique de l'huître creuse à la salinité et l'infection par OsHV-1

1 Présentation de l'Article 2

Dans le chapitre 1 (Article 1) nous avons vu que la salinité influence la réponse des huîtres à l'infection par OsHV-1. En effet, la survie d'huîtres infectées et acclimatées à 10‰ est de 95.8% alors qu'à 15, 25 et 35‰ elle est respectivement de 73.2, 43.2 et 61.9% (Fuhrmann et al. 2016). La réduction d'infectiosité d'OsHV-1 permet d'expliquer le gain de survie des huîtres acclimatées à 10‰ mais n'explique pas les différentiels de survie aux autres salinités. En effet, à 15, 25 et 35‰ les huîtres acclimatées ont la même quantité d'ADN viral et la même expression de gènes d'OsHV-1 dans leurs tissus.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer si la réponse métabolique d'huîtres acclimatées à la salinité peut expliquer les différentiels de survie observés dans l'**expérience 1**. Pour cela les échantillons d'huîtres acclimatées ont été analysés pour leur contenu énergétique (glucides, lipides), l'activité d'enzymes énergétiques (hexokinase et citrate synthase) et antioxydantes (superoxyde dismutase et catalase) ou encore la composition en acides gras membranaires.

Chez les bivalves, la consommation des réserves énergétiques et le métabolisme énergétique sont modulés par la salinité (Ballantyne & Berges 1991, Dickinson et al. 2012, Carregosa et al. 2014b). Or le statut énergétique des huîtres au moment d'une infection par OsHV-1 est un facteur qui influence la survie des animaux. Ainsi, la salinité pourrait moduler la réponse de l'huître à l'infection par OsHV-1 en modifiant son statut énergétique.

L'exposition de bivalves à des salinités se trouvant en dehors de leur optimum provoque une activation de la réponse antioxydante, qui peut toutefois être insuffisante et provoquer un stress oxydatif (An & Choi 2010, Carregosa et al. 2014b). De plus, les enzymes antioxydantes sont impliquées dans la réponse des bivalves à des infections (Genard et al. 2013, Richard et al. 2016). Ainsi, une perturbation du système antioxydant en réponse à la salinité pourrait compromettre la défense de l'huître contre le virus OsHV-1.

L'article 2 est en cours de préparation, les conclusions présentées dans ce manuscrit seront amenées à être davantage développées.

Les huîtres acclimatées aux salinités les plus faibles ont probablement régulé leur volume cellulaire par la synthèse de protéines, ce qui aurait permis de réduire la concentration intracellulaire en acides aminés libres et de maintenir un volume cellulaire relativement constant.

A 10 et 15‰ le contenu en glucides des huîtres est supérieur à celui des animaux maintenus à 25 et 35‰ et s'explique par une activité réduite de l'hexokinase. Le contenu en triglycérides est relativement constant en fonction de la salinité. L'activité de la citrate synthase est constante, ce qui signifie que les huîtres acclimatées aux faibles salinités ont maintenu ou rétabli un métabolisme aérobie. Ces résultats suggèrent une diminution du métabolisme des glucides aux faibles salinités.

Lors d'un changement de salinité les huîtres ferment leurs valves et diminuent leur consommation en oxygène (Shumway 1977a, Kim et al. 2001, Gosling 2003) réduisant ainsi l'utilisation d'énergie (Kim et al. 2001). Au cours de l'acclimatation les huîtres maintenues à 10 et 15‰ ont réduit leur taux de filtration pendant 2 à 6 jours et leur croissance (Fuhrmann et al., 2016) ce qui pourrait expliquer leur contenu énergétique plus élevé.

En général, les huîtres au contenu énergétique plus élevé sont plus résistantes à l'infection par OsHV-1 (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014a). Ainsi le gain de survie des huîtres à 15‰ par rapport à 25 et 35‰ s'expliquerait par le plus riche contenu en glucides.

En ce qui concerne le système antioxydant, l'activité de la catalase augmente avec la salinité tout comme le contenu en 20:4n-6. L'enrichissement cellulaire en 20:4n-6 peut provoquer une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Mazière et al. 1999), ce qui expliquerait une activation supérieure de la catalase dans les huîtres à 25 et 35‰. Le contenu en plasmalogènes augmente avec une salinité décroissante. Ces lipides ont des propriétés antioxydantes et auraient pu protéger les huîtres aux faibles salinités des ERO.

Le 20:4n-6 est plus élevé dans les huîtres infectées par OsHV-1. Il s'agit d'un précurseur des eicosanoïdes comme les prostaglandines qui sont impliquées dans le transport d'eau, de sels mais aussi dans la réponse immunitaire. Ainsi, dans notre étude, une modulation de la prostaglandine en réponse à la salinité aurait pu influencer la réponse immunitaire des huîtres.

Pour aller plus loin dans la compréhension des effets de la salinité sur le métabolisme de l'hôte et sa réponse à l'infection par OsHV-1, un modèle de survie comprenant les variables biochimiques va être développé.

2 Article 2

Ceci n'est pas la version finale de l'Article 2 qui est en cours d'écriture.

2.1 Corps de l'article

In preparation, will be submitted in Journal of Experimental Biology

Metabolism of oyster *Crassostrea gigas* is influenced by salinity and modulates its survival to the ostreid herpesvirus OsHV-1

Marine FUHRMANN¹, Bruno PETTON², Fabrice PERNET¹

¹ Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Technopole de Brest-Iroise, Plouzané, France

² Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Presqu'île du vivier, Argenton, France

Corresponding author: marine.fuhrmann@gmail.com

Abstract

Bivalves are grown in estuaries and bays characterized by wide salinity fluctuations, sometimes out of their optimal range. The increasing energetic demand during salinity acclimation may divert energy from other processes such as defence against pathogens. Here we investigated the interactive effect of acclimation to salinity and infection (exposed to OsHV-1 vs unexposed) on the metabolic response of the oyster *C. gigas*. In a companion paper the survival of acclimated oysters to OsHV-1 at 10, 15, 25, 35‰ was respectively 95.8, 73.2, 43.2 and 61.9%. In this study, at 10 and 15‰ oysters had a higher carbohydrate content and lower hexokinase activity likely reflecting a reduced carbohydrate metabolism. The higher energetic content may have protected oysters from OsHV-1. The oysters at higher salinities had higher catalase activity than animals at 10-15‰ suggesting a higher production of reactive oxygen species (ROS). This may be explained by the increasing amount of 20:4n-6 with increasing salinity. Furthermore, plasmalogens decreased with salinity and may have contributed to scavenge ROS in oysters at 10-15‰.

Key words: bivalves, infection, energetic, fatty acids, enzymes, OsHV-1

Introduction

Bivalves are grown in estuaries and bays where they are exposed to wide salinity fluctuations, sometimes out of their optimal range. Like most marine invertebrates, bivalves are osmoconformers. They have an osmotic concentration in their body fluids equal to that of the surrounding seawater. However, they maintain concentrations of salts that are out of equilibrium with the environment, and this requires extensive regulation (Schmidt-Nielsen 1997). Therefore, bivalves allocate energy to maintain cell volume and integrity (Gilles 1972, Shumway 1977a, b, Shumway et al. 1977, Neufeld & Wright 1996). Energy being limiting, the increasing energetic demand during an exposure to salinity change may divert resources from other processes such as defence against pathogens.

Salinity changes influence disease risk in oysters, directly by acting on the pathogen, the host or both (Burge et al. 2014). In a companion paper, we investigated the effect of four salinities (10, 15, 25 and 35 ‰) on disease transmission and the related mortality of *C. gigas*. The survival of oysters exposed to OsHV-1 and acclimated at 10‰ was higher (95.8%) than that of oysters held at 15, 25 and 35‰, where survival was 73.2, 43.2 and 61.9%, respectively (Fuhrmann et al. 2016). Although OsHV-1 infectivity at 10‰ was markedly lowered, it was similar at 15, 25 and 35‰. Thus, the differences in survival among salinities could also reflect changes in the metabolic response of the host.

The aim of this study was to investigate the interactive effect of salinity (10, 15, 25 and 35 ‰) and infection (exposed to OsHV-1 vs unexposed) on the metabolic response of the oyster *C. gigas*. Energetic reserves, key enzyme activities and the composition of fatty acid from polar lipids may change among salinities and therefore modulate the host response to pathogens.

Energetic budget of oysters is altered under suboptimal environmental conditions (Sokolova et al. 2012). Although carbohydrates and lipids are not osmotically important, they may play important roles in supplying energy requirements during osmotic stress in osmoconformers (Ballantyne & Moyes

1987). Also, energetic reserves play a role in the outcome (death or recovery) of an infection by OsHV-1 (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014a).

In marine bivalves, glycogen is the major source of glucose reserves and is known to play a significant role in providing energy for maintenance and gametogenic development (Gabbot 1975, Barber & Blake 1981, Berthelin et al. 2000). Glucose is converted to pyruvate by means of glycolysis to produce the high-energy compounds ATP (adenosine triphosphate) and NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide). The first step in glycolysis is the phosphorylation of glucose by hexokinase (HK). Activity of HK declines in oysters *C. virginica* at low salinity to achieve homeostasis of metabolic function (Ballantyne & Berges 1991). Also, activity of HK is lower in oysters infected by OsHV-1 than in control (Pernet et al. 2012, Tamayo et al. 2014). Therefore, HK activity may interact with salinity and infection to maintain homeostasis.

The enzyme citrate synthase (CS) is a pacemaking enzyme in the first step of the citric acid cycle. The citric acid cycle consists in a series of chemical reactions to generate energy through the oxidation of acetyl-CoA derived from carbohydrates, lipids and proteins. Although salinity or infection by OsHV-1 do not influence CS activity (Ballantyne & Berges 1991, Pernet et al. 2012, Tamayo et al. 2014), their interaction has never been investigated. Indeed, activity of CS correlates with respiration rate in marine invertebrates (Dahlhoff et al. 2002, Moran & Manahan 2004) and can be used as indicator of physiological condition (Dahlhoff 2004).

The main cellular defence mechanism in bivalves relies on phagocytosis by haemocytes. This process ends by the internal destruction of pathogens through an increased production of reactive oxygen species (ROS) that are toxic to invaders (Pipe et al. 1993, Donaghy et al. 2015). Accumulation of ROS can result in oxidative stress in the host (Lesser 2006) which is normally prevented by several enzymes (Sies 1993, Hermes-Lima 2004) such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Several studies have highlighted the importance of these antioxidant enzymes during acclimation to salinity (An & Choi 2010, Carregosa et al. 2014b) and exposure to pathogen in bivalves (Genard et al. 2013, Richard et al. 2016).

Physiologically stressful conditions, such as salinity changes, can increase cellular damage in marine invertebrates due to an increased production of ROS, leading to the oxidation of the lipid membranes (Sies 1993, Storey 1996, Abele & Puntarulo 2004). Lipid peroxidation was assessed by analysing membrane fatty acid composition and computing the membrane unsaturation index (Hulbert 2003).

Cell membranes of osmoconformers have to cope with fluctuation in salinity (Glémet & Ballantyne 1995). Indeed, membranes act as physical barriers to diffusion, control the movement of transmembrane solutes, regulate energy usage in terms of transmembrane ion gradients, and structure and regulate signal pathways. The “homeoviscous adaptation” theory (HVA) states that ectothermic animals compensate the effect of changes of environmental conditions on membrane fluidity by remodelling their lipids (Hazel 1995). HVA involves changes fatty acid composition. In bivalves, homeoviscous adaptation occurs with adaptation and acclimation temperature (Hall et al. 2002, Pernet et al. 2007). It is therefore likely that fatty acid remodelling occurs in accordance with HVA during acclimation to salinity, and this could influence the host response to pathogen.

Finally, twenty-carbon polyunsaturated fatty acids represent precursors of eicosanoids, a group of hormones that includes prostaglandins, leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids involved in inflammatory processes and stress response (Smith & Murphy 2002). Eicosanoid production is associated with stressful or energetically expensive situations such as gametogenesis and spawning in bivalves or stimulation of immune function in other invertebrates (Osada & Nomura 1989, Stanley & Howard 1998). In bivalves, membrane lipids of hemocytes are characterized by elevated amounts of arachidonic acid (20:4n-6), presumably to regulate immune responses (Delaporte et al. 2003). The fatty acid 20:4n-6 is an indicator of stress in bivalves that may prove useful for understanding the interactive effect of salinity and infection on the metabolic response of the oyster.

Materials and methods

Experimental design

Details about the rearing procedure and experimental design are presented in Fuhrmann et al (2016). Oysters were produced in hatchery at the Ifremer marine Station (Argenton, France, 48° 48' 24.49" N, 3° 0' 22.84" W) according to Petton et al. (2015). At the onset of the experiment (17 July 2014) oysters were 4 months old, 0.8 ± 0.2 g wet weight and 19.5 ± 2.5 mm shell length (mean \pm SD). They were maintained at 21.1°C, 35.2‰ salinity, and fed with *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3) and *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) (1:1 in dry weight). Phytoplankton concentration was maintained at ca. $1500 \mu\text{m}^3 \mu\text{l}^{-1}$ algae. A light bubbling was added to each tank to maintain the oxygen level between 85 and 100% of saturation.

From 17 to 28 July 2014, a subsample of the oyster cohort was placed at four salinities (10.2 ± 0.4 , 15 ± 0.8 , 24.9 ± 0.4 , 35.4 ± 0.2 ‰) in 45 l tanks (n=6 tanks per salinity) in a flow-through system. The salinities were obtained by melting 1 μm filtered and UV sterilized seawater (35‰) with freshwater. Each tank contained 310 oysters (total biomass = 250 g). These oysters were then used as pathogen recipients or controls.

The remaining oysters were transferred to a farming area of the Bay of Brest (Brittany, France, 48° 20' 06.19" N, 4° 19' 06.37" W) during a disease outbreak caused by OsHV-1 on 22 July 2014. After 6 days of field exposure, few individuals died. The remaining alive oysters were moved back to the laboratory. These infected oysters were positive to OsHV-1 and further used as pathogen donors (Petton et al. 2015).

On 28 July 2014 (day 0), the density of acclimated oysters was standardized at ca. 160 g in each tank, to remedy differences in growth rates among salinity treatments. The same day, 160g of non-acclimated oysters were added in each tank but they are not studied in this paper.

In the meantime, pathogen donors were placed in two 45 l flow-through tanks filled with seawater at 35‰ at 21°C. The seawater surrounding the donors was used as source of infection (SI). The SI was connected by flexible tubes fitted inside a peristaltic pump to half of tanks, which contained the recipient oysters at four salinities. The other twelve tanks were not connected to the SI and were

used as controls. For each tank connected to the SI, the water flow from the SI was 11% of the total water flow (12 l h⁻¹). The water input from the SI was stopped at day 6, when the recipients exhibited mortality.

Survival of control and recipient oysters was followed every day for 17 days. Dead oysters were removed from tanks. Alive oysters were sampled at days 0, 2 and 4 for each treatment combination, before the onset of mortality. Whole tissues from 15 oysters per tank were removed from the shells, pooled together, flash frozen and stored in liquid nitrogen.

Biochemical analyses

The 15-pooled oyster tissues were ground in liquid nitrogen with a MM400 homogenizer (Retsch, Eragny, France). The resulting oyster powders were stored at -80°C until further analyses. Biochemical analyses were conducted on oyster powder subsamples.

Water content

To quantify the water content of oysters, a subsample of oyster powder was weighed, dried at 60°C for 48 h, and weighed again. The total water content expressed as a percentage of wet tissue weight was calculated using the following formula: $\frac{\text{Wet weight} - \text{Dry weight}}{\text{Wet weight}} \times 100$.

Carbohydrates

Samples of 300 mg of powder were homogenized in 3 ml of nanopure water using a Polytron® PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland) and diluted 10.0 times. Carbohydrate concentrations were determined by colorimetric method according to Dubois (1956). Samples (250 µl) were mixed with phenol (0.5 ml, 5% m/v) and sulfuric acid (2.5 ml, 98%), and incubated for 40 min. Absorbance was read at 490 nm with a UV 941 spectrophotometer (Kontron instruments). Carbohydrate concentrations were determined using a standard calibration curve and expressed as mg of carbohydrates per g of dry weight.

Lipids

Neutral lipid class determination

Samples of 300 mg of powder was homogenized in 6 ml chloroform-methanol (2:1, v/v) according to Folch (1957), then sonicated and stored at -20°C until analyses. For determination of neutral lipid classes, samples were spotted on activated silica plates using a CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland) and plates were eluted in hexane-diethylether acetic acid (20:5:0.5 v/v/v) followed by hexane-diethylether (97:3, v/v). Lipid classes appeared as black spots after plates were dipped in a $\text{CuSO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ solution and heated. Plates were read by scanning at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG, Switzerland). Five neutral lipid classes (free fatty acids [FFA], alcohols [AL], mono-diacylglycerols [DG-MG], triacylglycerols [TAG], and sterols [ST]). Since TAG are mainly reserve lipids and ST are structural constituents of cell membranes, we used the TAG-ST ratio as an index of the relative contribution of reserve to structure.

Fatty acid composition of polar lipids

Polar lipids were extracted using a silica gel micro column (Marty et al. 1992). Aliquots of samples were evaporated until dryness and were recovered with three 500 μl washings of chloroform:methanol (98:2, v/v). Samples were then placed on the top of a silica gel micro column (30 \times 5 mm internal diameter; Kieselgel; 70–230 mesh [Merck, Lyon, France]; previously heated to 450 °C and deactivated with 5% water). The neutral lipids were removed with 10 ml of chloroform:methanol (98:2, v/v) and the polar lipids were recovered with 15 ml of methanol. A known amount of tricosanoic acid (23:0) was added to polar fraction as an internal standard. Polar lipids were transesterified at 100°C for 10 min with 1 mL of boron trifluoride–methanol (12% Me-OH) (Metcalf & Schmitz 1961). This transesterification produces fatty acid methyl esters (FAME) from the fatty acid esterified at the sn-1 and sn-2 position of diacylphospholipids, and the sn-2 position of plasmalogen phospholipids. It also produces dimethyl acetals (DMA) from the alkenyl chains at the sn-1 position of plasmalogens (Morrison & Smith 1964). Then, 1 ml of hexane and 1 ml of Milli-Q water were added,

and the organic phase containing fatty acid methyl esters was washed with 1 ml of water. FAME and DMA were analysed in a HP6890 GC system (Hewlett-Packard) equipped with a DB-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm; 0.25 μ m film thickness; Agilent technologies). Peaks were analysed by comparison of their retention time with those of a standard 37 component fatty acid methyl ether (FAME) mix and other standard mixes from marine bivalves. The unsaturation index is the average number of double bonds per acyl chain as calculated in Logue et al. (2000). Total DMA was used as an indicator of the plasmalogen level.

Proteins and enzymes

Protein concentrations and enzyme activities were measured using Nunc™ 96-well micro-plates (Thermo Scientific), a Synergy HT micro-plate reader and the software Gen5 v2.03, both from BioTek (Winooski, Vermont, USA). Catalase activity was measured using quartz Hellma cuve 110 (Dominique Dutscher, Brumath, France) and a UV 941 spectrophotometer (Kontron instruments, San Diego, California, USA).

Proteins

Proteins were extracted from oyster powder (200 mg) in ice-cold lysis buffer (2 ml), and homogenized with a Polytron® PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland). The buffer consisted in a mix of 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.5 % Igepal, 1 tablet of complete EDTA free protease inhibitor cocktail in 25 ml of buffer and the phosphatase inhibitor cocktail III, all at a pH 7.4 (Corporeau et al. 2012). Homogenates were centrifuged twice at 4000 rpm for 1 h at 4°C and at 11700 rpm for 45 min at 4°C to eliminate the lipid fraction of the samples, using GR412 and MR22 Jouan centrifuges (Thermo electron, Massachusetts, USA), respectively (Corporeau et al. 2014). The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analyses. Protein extracts were diluted by 20x and quantified according to Lowry (1951) using the DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Absorbance was read at 540 nm and protein

concentrations were determined by comparison with a calibration curve of Bovine Serum Albumin provided with the kit. Results are expressed as mg of proteins per g of dry weight.

Energetic enzymes

Enzyme assays were performed in triplicate at room temperature.

The activity of citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7), was assayed according to Childress & Somero (1979). Protein supernatant (20 μ l) were added in wells with buffer (160 μ l) which consisted of buffer 100 mM Tris-HCl, 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM DTNB. The reaction was initiated by addition of oxaloacetate (0.5 mM; 20 μ l). Absorbance was recorded for 10 min at 412 nm. Results are expressed in mU mg⁻¹ protein, where 1 U is the amount of enzyme to catalyze 1 μ mole of TNB per minute (using $\epsilon_{\text{TNB},412} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

The hexokinase activity (HK; EC 2.7.1.1) was determined as described by Greenway & Storey (1999). Protein supernatant (20 μ l) was mixed with assay buffer (180 μ l) consisting of 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 1 mM ATP, 0.2 mM NADP⁺ and 1 U ml⁻¹ Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. The production of NADPH is followed by absorbance, recorded for 15 min at 340 nm. The activity was calculated using the linear portion of the kinetic, that means between 4 and 8 minutes. Results are expressed as mU mg⁻¹ protein, where 1 U is the amount of enzyme necessary to oxidize 1 μ mole of NADP⁺ per minute (using $\epsilon_{\text{NADH or NADP}^+,340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Antioxidant enzymes

Total activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assessed using a SOD assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Protein supernatant (20 μ l) was mixed with 200 μ l of Water-Soluble Tetrazolium salt (WST-1) and with 20 μ l of xanthine oxidase (XO) and xanthine mix, to initiate the reaction. After a 20-min incubation at 25°C, absorbance was read at 450 nm. The activity of SOD was determined by comparison with a standard inhibition curve performed using SOD from bovine erythrocytes. Results are expressed as in U mg⁻¹ protein, where 1 U is the amount of enzyme necessary to inhibit by 50% the xanthine/ xanthine oxidase complex.

The activity of catalase (CAT; EC 1.11.1.6) was assayed according to Aebi (1984). Protein supernatant (8 μ l) was mixed with a 10-mM

hydrogen peroxide (H_2O_2) solution (792 μ l). Absorbance was instantaneously recorded for 90 s at 240 nm. Results are expressed as in U mg^{-1} protein, where 1 U is the amount of enzyme necessary to catalyze 1 μ mole of H_2O_2 per minute (using $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2, 240} = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Statistics

Multivariate analyses

To study the correlation between the fatty acids of oysters Pearson correlation coefficients were calculated. Stepwise multiple regression models were used to examine the relationship between (i) unsaturation index and fatty acids of oysters and (ii) fatty acids and salinity.

ANOVAs

Split plot ANOVAs were conducted to determine differences in all biochemical variables, according to salinity, infection and sampling time and their interactions. The experimental unit was the tank in which pH and infection were applied. Main plots were salinity and infection levels, subplots were sampling times. Where significant differences were detected, Tukey multiple comparison tests were used to determine which means were different.

All statistical analyses were conducted using R Software (www.R-project.org/). The graphs presented only the significant effects.

Results

Proximate composition

The water content of oyster tissues varied as a function of salinity \times infection and infection \times time. This parameter decreased with increasing salinity (Fig. 1A). Significant differences were observed between controls at 10 vs higher salinities, and between recipients at 10-15‰ vs 25-35‰ (Fig.1A,

Tables S1 and S2). The water content of oyster tissues decreased over time (irrespective of salinity), particularly in controls where differences were significant.

Carbohydrates content in oysters decreased with increasing salinity. More particularly, level of carbohydrates in oysters held at 10-15‰ was 54% higher than that of animals maintained at 25-35‰ (Fig.1B, Tables S1 and S2). The level of triglycerides (TAG relative to sterols) in oysters at 10‰ was ~20% higher than at that of oysters held at higher salinities, excepted at 25‰ where difference was not significant (Fig.1C, Tables S1 and S2). The protein content of oyster tissues at 10-15‰ was 17% higher than in those at 25-35‰ (Fig.1D, Tables S1 and S2).

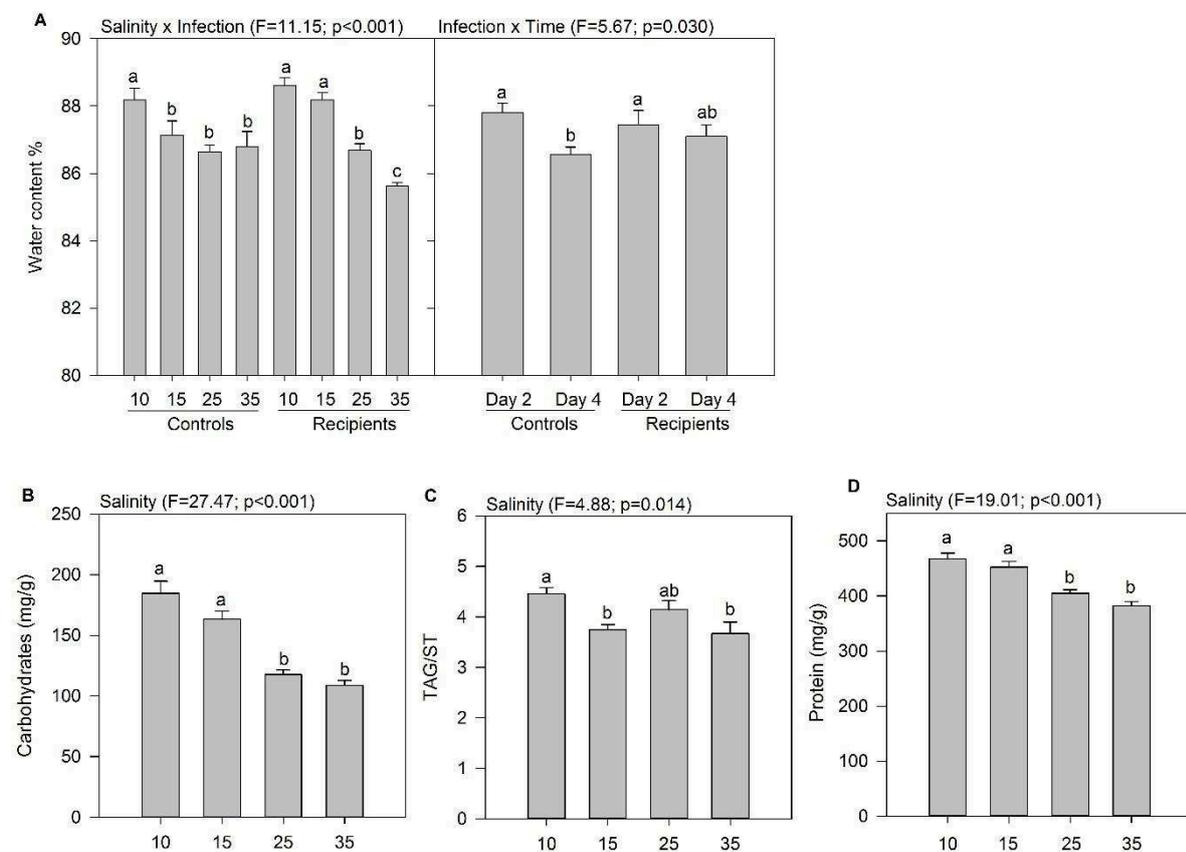


Fig.1: Proximate composition of oyster tissues giving the content of (A) water as a function of salinity x infection and infection x time, (B) carbohydrates as a function of salinity, (C) triglycerides (TAG) relative to sterols (ST) as a function of salinity, (D) protein as a function of salinity. Data are

means \pm SE between replicates depending on combination of treatments. Letters indicate significant differences.

Energetic and antioxidant related enzymes

The activity of citrate synthase (CS) in oyster tissues increased slightly between day 2 and 4, irrespective of salinity and infection (Fig.2A, Tables S3 and S4). The activity of hexokinase (HK) varied as a function of salinity \times infection and salinity \times time. Activity of HK generally increased with increasing salinity in both controls and recipients, and was the highest in infected oysters at 35‰ (Fig.2B). At days 2 and 4 in oysters held at 25-35‰ the HK activity was higher than at 10-15‰ at day 2 (Fig.2B, Tables S3 and S4).

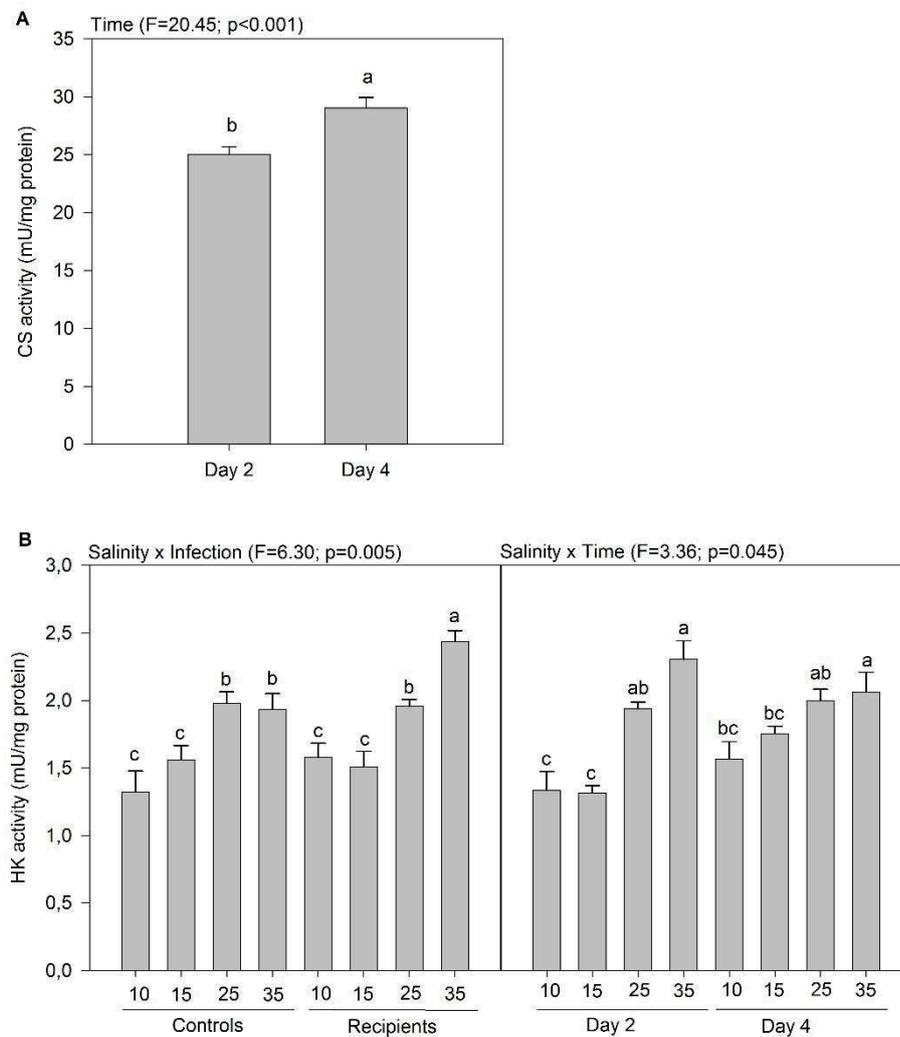


Fig.2: (A) Citrate Synthase (CS) activity as a function of time, (B) hexokinase (HK) activity as a function of salinity x infection and salinity x time. Data are means \pm SE between replicates depending on combination of treatments. Letters indicate significant differences.

The activity of superoxide dismutase (SOD) in oyster tissues decreased markedly between days 2 and 4, irrespective of salinity and infection (Fig.3A, Tables S3 and S4). The activity of catalase (CAT) increased with increasing salinity up until reaching a plateau at 25‰, and it was 15% lower in recipients than in controls (Fig.3B, Tables S3 and S4).

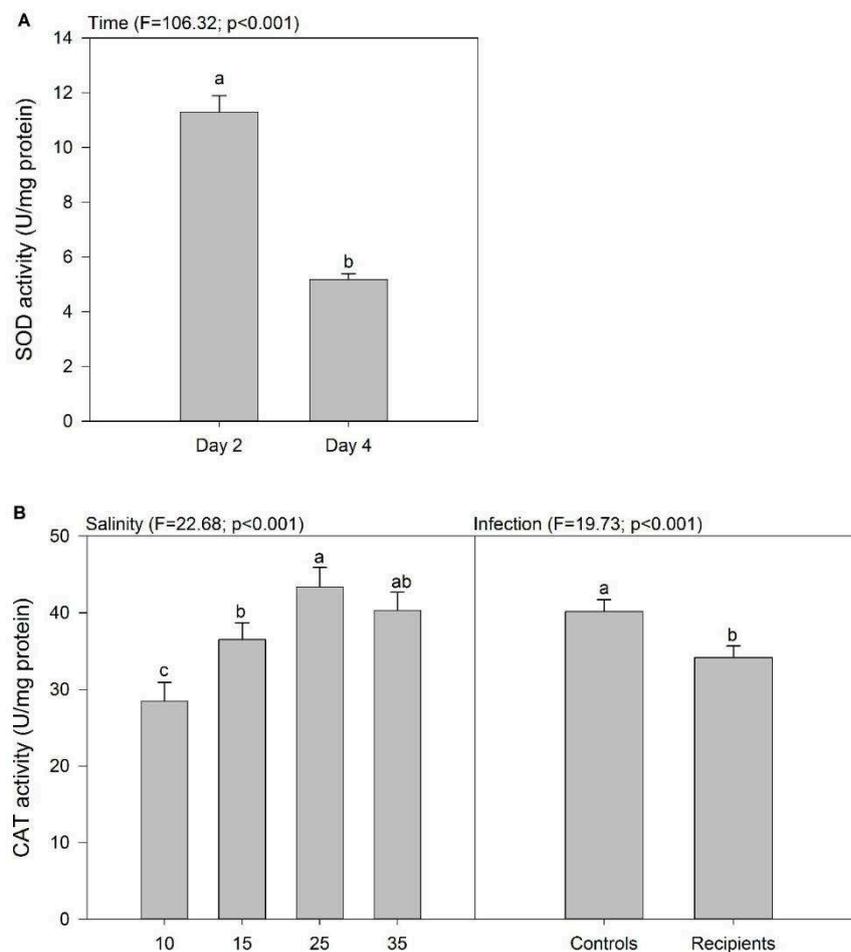


Fig.3: (A) Superoxyde (SOD) activity as a function of time, (B) catalase (CAT) activity as a function of salinity and infection separately. Data are means \pm SE between replicates depending on combination of treatments. Letters indicate significant differences.

Fatty acids from polar lipids

The unsaturation index (UI) of the polar lipids of oysters was slightly lower in animals held at 10‰ (mean UI=264) compared to that of individuals maintained at 15 and 25‰ (mean UI=270, Table 1, Table S5). The UI of oysters held at 35‰ was intermediate. These variations in UI were mainly attributable to changes in 20:1n-11 ($UI = -10.57 \times 20:1n-11 + 294.64$, $r = 0.857$, $p < 0.001$, Table S6).

The level of 18:0 DMA, 20:1 DMA, 18:1n-9 and 22:5n-3 decreased with increasing salinity whereas level of 18:0, 18:1n-7 and 20:4n-6 increased with increasing salinity (Table 1, Table S5 and Table S6). The fatty acid 20:4n-6 showed the strongest correlation with salinity ($\%20:4n-6 = 0.12 \times \text{Salinity} + 4.98$, $r = 0.94$, $p < 0.001$, Table S6). This fatty acid increased from 5.8% to 9.0% when salinity rose from 10‰ to 35‰ (Table 1 and Table S5). Also, level of 20:4n-6 in controls was slightly lower than that of recipients (Table 1 and Table S5).

Table 1: Summary of ANOVAs on the fatty acids composition of the polar lipids of oysters as a function of salinity (10, 15, 25, 35‰) and infection

(Controls vs. Recipients). The fatty acids are expressed as % of the total fatty acid composition, values are mean \pm SD between replicates.

Fatty acids	F	p	10‰	15‰	25‰	35‰	F	p	Controls	Recipients
14:0*	10.44	< 0.001	2.7 \pm 0.1 ^a	2.7 \pm 0.1 ^a	2.6 \pm 0.2 ^a	2.4 \pm 0.3 ^b	29.25	< 0.001	2.7 \pm 0.1 ^a	2.5 \pm 0.2 ^b
16:0	1.23	0.333	10.4 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2	10.2 \pm 0.3	1.57	0.228	10.3 \pm 0.3	10.2 \pm 0.2
16:1n-7	3.14	0.055	2.3 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	2.3 \pm 0.2	1.9	0.188	2.4 \pm 0.2	2.4 \pm 0.1
18:0 DMA	4.98	0.013	9.3 \pm 1.2 ^a	8.7 \pm 0.4 ^{ab}	8.7 \pm 0.6 ^{ab}	6.9 \pm 1.8 ^b	0.69	0.418	8.2 \pm 1.8	8.6 \pm 0.8
18:0	18.87	< 0.001	2.7 \pm 0.1 ^b	2.8 \pm 0.1 ^b	2.8 \pm 0.2 ^b	3.3 \pm 0.2 ^a	1.76	0.203	2.9 \pm 0.3	2.9 \pm 0.3
18:1n-9	22.43	< 0.001	2.3 \pm 0.1 ^a	2.2 \pm 0 ^a	2.1 \pm 0.1 ^b	2 \pm 0.1 ^c	4.22	0.057	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1
18:1n-7	83.61	< 0.001	6.1 \pm 0.2 ^d	6.7 \pm 0.1 ^c	7.1 \pm 0.2 ^b	7.7 \pm 0.3 ^a	8.96	0.009	6.8 \pm 0.6 ^a	7 \pm 0.7 ^b
18:2n-6	10.88	< 0.001	2.3 \pm 0.1 ^a	2.5 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.2 ^a	2.1 \pm 0.1 ^b	9.84	0.006	2.4 \pm 0.2 ^a	2.2 \pm 0.2 ^b
18:3n-3	4.03	0.026	1.2 \pm 0.1 ^{ab}	1.3 \pm 0.1 ^a	1.3 \pm 0.2 ^{ab}	1.1 \pm 0.2 ^b	17.36	0.001	1.3 \pm 0.1 ^a	1.1 \pm 0.1 ^b
18:4n-3	11.95	< 0.001	1.7 \pm 0.1 ^b	2 \pm 0.2 ^a	1.9 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.2 ^b	36.44	< 0.001	2.0 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.2 ^b
20:1 DMA	11.17	< 0.001	3.2 \pm 0.3 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	2.9 \pm 0.2 ^a	2.2 \pm 0.5 ^b	1.05	0.32	2.8 \pm 0.6	2.9 \pm 0.4
20:1n-11	13.79	< 0.001	2.8 \pm 0.2 ^a	2.4 \pm 0.1 ^{bc}	2.2 \pm 0.1 ^c	2.7 \pm 0.3 ^{ab}	0.08	0.786	2.5 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2
20:1n-7	2.77	0.076	4.5 \pm 0.1	4.6 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3	4.9 \pm 0.2	0.58	0.459	4.6 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3
20:4n-6	171.48	< 0.001	5.8 \pm 0.3 ^d	7.2 \pm 0.3 ^c	8.2 \pm 0.4 ^b	9 \pm 0.2 ^a	8.92	0.009	7.4 \pm 1.3 ^b	7.7 \pm 1.3 ^a
20:5n-3	27.69	< 0.001	10 \pm 0.3 ^a	8.9 \pm 0.3 ^{bc}	8.6 \pm 0.2 ^c	9.3 \pm 0.3 ^b	0.4	0.537	9.2 \pm 0.7	9.3 \pm 0.5
22:5n-6	79.69	< 0.001	1.6 \pm 0.1 ^c	2.1 \pm 0.1 ^b	2.3 \pm 0.1 ^a	2.3 \pm 0.1 ^{ab}	3.4	0.084	2.1 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3
22:5n-3	35.83	< 0.001	1.1 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b	0.49	0.494	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
22:6n-3	9.42	< 0.001	12.6 \pm 0.3 ^b	13.6 \pm 0.3 ^a	13.5 \pm 0.3 ^a	13.1 \pm 0.4 ^{ab}	0.93	0.35	13.3 \pm 0.6	13.1 \pm 0.4
20:2 NMI	3.83	0.030	1 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.1 ^{ab}	0.8 \pm 0.1 ^{ab}	0.9 \pm 0.1 ^b	0.07	0.793	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
22:2 NMI	11.61	< 0.001	7.2 \pm 0.2 ^a	6.5 \pm 0.2 ^b	6.3 \pm 0.3 ^b	6.6 \pm 0.3 ^b	1.1	0.31	6.6 \pm 0.5	6.7 \pm 0.4
Branched FA*	7.39	0.003	0.9 \pm 0 ^a	0.9 \pm 0 ^{ab}	0.8 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0 ^a	2.54	0.131	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0
UI	9.34	< 0.001	264.0 \pm 1 ^b	269.1 \pm 1.9 ^a	270.8 \pm 1.8 ^a	267.3 \pm 4.1 ^{ab}	0.16	0.691	267.6 \pm 0.1	268.3 \pm 0.1

*These FAs also varied as a function of the interaction between salinity and infection: 14:0 (F=4.2, p=0.023) and branched FA (F=3.37, p=0.045)

Discussion

Energetic metabolism

The water content in oyster tissues increased by 3% with decreasing salinity from 35‰ to 10‰. This result is consistent with the fact that when salinity decreases, the extracellular concentration is lowered and cells of osmoconformers take up water (Schmidt-Nielsen 1997). In *C. virginica*, the water content increases from 75 to 84% when seawater is diluted by 50% (Shumway 1977a). Overall, these changes in hydration of tissues are relatively minor compared to those occurring in the surrounding water. In the absence of any regulating mechanism, an animal exposed to 50% diluted seawater would expect to double its cellular water content (Shumway 1977a). Therefore, oysters actively regulate their internal fluids in response to salinity to maintain the cell volume relatively constant.

In our study, the protein concentrations in oysters increased with decreasing salinity. Protein synthesis may have occurred in response to low salinity to reduce the concentration of amino acid in the cell, so that the cell remains isotonic with the surrounding seawater. Intracellular concentration of free amino acids is an important parameter for controlling cell volume in response to changes in salinity in osmoconformers (Pierce 1971, Shumway 1977a, Yancey et al. 1982, Hawkins & Hilbish 1992, Schmidt-Nielsen 1997). Such compensatory mechanisms allow acclimation to salinity but they can affect energy status (Sokolova 2011).

Carbohydrate level in oysters held at 10-15‰ was higher than at 25-35‰. Consistently, activity of hexokinase (HK), the first enzyme involved in the glycolysis pathway, decreased with decreasing salinity. Similarly, HK activity in the oyster *C. virginica* decreased by 2 times when seawater is diluted with 50% freshwater (Ballantyne & Berges 1991).

Furthermore, TAG level (relative to ST) was the highest in oysters at 10‰. Accordingly, the activity of 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, an enzyme involved in the beta-oxidation, the catabolic process of fatty acids is reduced in oyster *C. virginica* at low salinity (Ballantyne & Berges 1991). The

response to low salinity by euryhaline molluscs may involve the reduction of some enzymatic activities for homeostasis of metabolic function (Ballantyne & Berges 1991).

The CS activity in oysters remained similar among salinities as observed in the gills, the hepatopancreas and adductor muscle of *C. virginica* (Ballantyne & Berges 1991). The CS, an enzyme involved in tricarboxylic acid cycle, is critical for aerobic metabolism and directly correlates with metabolic rate of organism (Dahlhoff 2004). Here, the result suggests that oysters succeed to maintain an aerobic metabolism at low salinity.

In our study, energetic reserves (carbohydrates and triglycerides) were higher in oysters maintained at low salinity for 14 d, and this agrees with HK and CS activity. The lipid content of oyster *C. virginica* maintained at 15‰ was 50% lower than that of animals acclimated at 30‰ for 11 weeks (Dickinson et al. 2012). This result suggests that the short-term effect of exposure to low salinity on the energetic metabolism are different than those observed on the long-term.

More broadly, the higher level of energetic reserves in oysters at low salinity may reflect that when the surrounding salinity is changed, they close their valves and their oxygen consumption rate decreases (Shumway 1977a, Kim et al. 2001, Gosling 2003). This protective strategy against osmotic stress is in favor of energy conservation by reducing respiration and activity (Kim et al. 2001). In our study, growth rate of oysters at 10‰ was null during the first 11 days of acclimation, and growth ranked as 10‰ < 15‰ < 25‰ = 35‰ (Fuhrmann et al. 2016). Also, filtration rates of oysters at 10 and 15‰ were initially lower than those of oysters at 25–35‰. Filtration rates then increased during the first 2 to 6 d of acclimation until reaching those of oysters at 25–35‰. Reduction in growth and the time-response of filtration rates of oysters are in good agreement with energy sparing at low salinity.

Oysters held at 15‰ exhibited higher level of carbohydrates than those maintained at 25‰ and 35‰, and these animals were more resistant to OsHV-1. Indeed, the survival of oysters exposed to OsHV-1 was ranked as 10‰ > 15‰ > 35‰ > 25‰. At 10‰ the infectivity of OsHV-1 was markedly lowered whereas it was similar at 15‰, 25‰ and 35‰ (Fuhrmann et al. 2016). Thus, the differences in

survival among these salinities could reflect changes in the host metabolism and particularly carbohydrates. This agrees with the fact that oysters containing higher carbohydrate content are more resistant to OsHV-1 (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014). The risk of disease mortality in oysters exposed to OsHV-1 decreases with increasing mobilization of energetic reserves during the infection period, probably to sustain the immune response (Pernet et al. 2014).

Antioxidant response

In bivalves, immunity consists of innate processes, including phagocytosis accompanied by production of reactive oxygen species (ROS) neutralized by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Although activity of SOD in oysters remained unaffected by salinity, activity of CAT increased with increasing salinity. In contrast, activities of SOD and CAT in gills and digestive gland of the ark shell *Scapharca broughtonii* and in whole-tissues of clams *Ruditapes* spp. increase in response to low salinity (An & Choi 2010, Carregosa et al. 2014). Discrepancies among studies may reflect differences in duration of acclimation to salinity. In our study, oysters were acclimated for 13 to 15d before sampling whereas ark shells and clams were exposed to salinity change for 5 to 6d (An & Choi 2010, Carregosa et al. 2014). The specific time response of antioxidant enzymes during acclimation to salinity needs further investigation.

The production of ROS can lead to peroxidation of lipid membranes (Sies 1993, Storey 1996, Abele & Puntarulo 2004) as observed in Ark shell and clams at low salinity (An & Choi 2010, Carregosa et al. 2014). In our study, the unsaturation index of membrane lipids, which is viewed as a peroxidation index (Hulbert 2003), is higher at 15, 25 and 35‰ than at 10‰, and reflects regulation of 20:1n-11, a fatty acid related to plasmalogens. This result suggests that the higher activity of CAT at 25-35‰ allowed to protect membrane lipids from ROS (Matozzo et al. 2012, Carregosa et al. 2014). In addition, dimethylacetals (18:0 DMA and 20:1 DMA) decreased with increasing salinity. The DMA are plasmalogen related fatty acids. Plasmalogens are endogenous membrane antioxidants (Hulbert et al. 2014) and their higher level in oysters at low salinity may have protected them from ROS.

The fatty acid 20:4n-6, increased linearly with salinity and correlates with activity of CAT. In addition, 20:4n-6 level was higher in infected oysters than controls. Accordingly, dietary and membrane levels of 20:4n-6 enhanced immune parameters and antioxidant activity of hemocytes of clams and oysters (Delaporte et al. 2003). Also, cellular enrichment with 20:4n-6 elicits an increase of ROS production and lipid peroxidation (Mazière et al. 1999) and may explain the higher activity of CAT at 25 and 35‰ in comparison to 10 and 15‰.

The ROS production and lipid peroxidation generally resulted from oxidative stress (Sies 1993, Storey 1996), but may also be linked to prostaglandin synthesis from 20:4n-6, as it has been observed in rat eochromocytoma PC12 cells (Jiang et al. 2004) et al. 2004) and human neuroblastoma cells (Kondo et al. 2001). In invertebrates, eicosanoids are involved in salt and water transport (Stanley-Samuelson 1994), but also in cellular immune reactions (Stanley-Samuelson 1994, Segueineau et al. 2011). In our study, modulation of prostaglandin in response to salinity may have influenced its role in immunity and needs further investigations.

Acknowledgements

We are grateful to Martin Protat and Anaïs Guyon for their technical assistance, Pierrick le Souchu and Cristian Mingant for their help with the experimental set-up, the Ifremer staff involved in oyster and algae production at Argenton. We wish to thank Gaëlle Richard for its help in antioxydant enzymes assays, Claudie Quéré for teaching fatty acids analysis and Yanouk Epelboin for enriching discussion about the results. This work was supported by the GIGASSAT project funded by ANR-AGROBIOSPHERE No. ANR-12-AGRO-0001-01 (www.gigassat.org).

Abbreviations

ATP, adenosine triphosphate; CAT, catalase; CDNB, 1-chloro-2,4 dinitrobenzene; CS, citrate synthase; DMA, dimethyl acetal fatty acid; DNA, deoxyribose nucleic acid; DTNB, 5,5-dithiobis-[2-nitrobenzoic]; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; HK, hexokinase; NADP(H), HPTLC, high performance thin layer

chromatography; Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced); NMI, non-methylene-interrupted fatty acid; OsHV-1, ostreid herpesvirus 1; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; ST, sterol; TAG, triglycerides; UV; ultraviolet; WST-1, water-soluble tetrazolium salt; XO, xanthine oxidase.

Competing interest

The authors declare no competing or financial interest

Authors contribution

All authors approved the final manuscript.

References

- Abele D, Puntarulo S (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Phys. A* 138:405-415
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126
- An MI, Choi CY (2010) Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Phys. B* 155:34-42
- Ballantyne JS, Berges JA (1991) Enzyme activities of gill, hepatopancreas, mantle, and adductor muscle of the oyster (*Crassostrea virginica*) after changes in diet and salinity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 48:1117-1123
- Ballantyne JS, Moyes CD (1987) Osmotic effects on fatty acid, pyruvate, and ketone body oxidation in oyster gill mitochondria. *Physiol. Zool.* 60:713-721
- Barber BJ, Blake NJ (1981) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52:121-134
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Phys. B* 125:359-369
- Burge CA, Eakin CM, Friedman CS, Froelich B, Hershberger PK, Hofmann EE, Petes LE, Prager KC, Weil E, Willis BL, Ford SE, Harvell CD (2014) Climate change influences on marine infectious diseases: Implications for management and society. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6:249-277
- Carregosa V, Velez C, Soares A, Figueira E, Freitas R (2014) Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Phys. B* 177:1-9
- Childress JJ, Somero GN (1979) Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52:273-283
- Corporeau C, Tamayo D, Pernet F, Quere C, Madec S (2014) Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J. Proteomics* 109:176-187

- Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Huvet A, Madec S (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 75:5554-5563
- Dahlhoff EP (2004) Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annu. Rev. of Physiol.* 66:183-207
- Dahlhoff EP, Stillman JH, Menge BA (2002) Physiological community ecology: variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal invertebrates along environmental gradients. *Integr. Comp. Biol.* 42:862-871
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species- *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206:3053-3064
- Dickinson GH, Ivanina AV, Matoo OB, Portner HO, Lannig G, Bock C, Beniash E, Sokolova IM (2012) Interactive effects of salinity and elevated CO₂ levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 215:29-43
- Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C, Choi K-S (2015) The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42:91-97
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509
- Fuhrmann M, Petton B, Quillien V, Faury N, Morga B, Pernet F (2016) Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquacul. Env. Interact.* 8:543-552
- Gabbot PA (1975) Storage cycle in marine bivalve molluscs a hypothesis concerning glycogen metabolism and gametogenesis. *Proceeding in the 9th European Marine Biology Symposium*
- Genard B, Miner P, Nicolas JL, Moraga D, Boudry P, Pernet F, Tremblay R (2013) Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *Plos One* 8
- Gilles R (1972) Osmoregulation in Three Molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole* 142:25-35
- Glémet HC, Ballantyne JS (1995) Influences of environmental salinity on the structure and function of gill mitochondrial membranes of an osmoconforming invertebrate, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 121:673-683
- Gosling E (2003) *Bivalve mollusc*. Fishing News Books
- Greenway SC, Storey KB (1999) The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J.Exp. Mar. Biol.Ecol* 242:259-272
- Hall JM, Parrish CC, Thompson RJ (2002) Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biol. Bull.* 202:201-203
- Hawkins AJS, Hilbish TJ (1992) The cost of cell volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 72:569-578
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57:19-42
- Hermes-Lima M (2004) *Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals*. Functional Metabolism. John Wiley & Sons, Inc.

- Hulbert AJ (2003) Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206:2303-2311
- Hulbert AJ, Kelly MA, Abbott SK (2014) Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J. Comp. Physiol. B* 184:149-166
- Jiang J, Borisenko GG, Osipov A, Martin I, Chen R, Shvedova AA, Sorokin A, Tyurina YY, Potapovich A, Tyurin VA, Graham SH, Kagan VE (2004) Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. *J. Neurochem.* 90:1036-1049
- Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K (2001) Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276:12076-12083
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68:253-278
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin reagent. *The J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163:221-234
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG (2012) First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *Plos One* 7
- Mazière C, Conte M-A, Degonville J, Ali D, Mazière J-C (1999) Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF κ B. *BBRC* 265:116-122
- Metcalfe LD, Schmitz AA (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33:363-364
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608
- Neufeld DS, Wright SH (1996) Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *J. Exp. Biol.* 199:473-484
- Osada M, Nomura T (1989) Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Phys. C*: 93:349-353
- Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Degremont L, Lagarde F, Pepin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquacult. Environ. Interact.* 2:215-237
- Pernet F, Lagarde F, Jeanneé N, Daigle G, Barret J, Le Gall P, Quere C, D'Orbcastel ER (2014) Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *Plos One* 9
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J. Exp. Biol.* 210:2999
- Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015) *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front. Microbio.* 6
- Pierce SK (1971) Volume regulation and valve movements by marine mussels. *Comp. Biochem. Phys. A* 39:103-117

- Richard G, Guerard F, Corporeau C, Lambert C, Paillard C, Pernet F (2016) Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Dev. Comp. Immunol.* 60:96-107
- Schmidt-Nielsen K (1997) *Animal physiology Adaptation and environment.* Cambridge University Press, 617
- Seguineau C, Racotta IS, Palacios E, Delaporte M, Moal J, Soudant P (2011) The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Phys A* 160:87-93
- Shumway SE (1977a) Effect of fluctuating salinity on tissue water-content of 8 species of bivalve mollusks. *J. Comp. Phy* 116:269-285
- Shumway SE (1977b) Effect of salinity fluctuation on osmotic-pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in hemolymph of bivalve mollusks. *Mar. Biol.* 41:153-177
- Shumway SE, Gabbott PA, Youngson A (1977) Effect of fluctuating salinity on concentrations of free amino-acids ninhydrin substances or muscles of 8 species of bivalve mollusks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 29:131-150
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215:213-219
- Smith WL, Murphy RC (2003) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Book 36. Elsevier Science, Amsterdam
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79:1-15
- Sokolova IM, Sukhotin, A. A. and Lannig, G. (2011) Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*
- Stanley DW, Howard RW (1998) The Biology of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates: Cellular, Organismal and Ecological Actions. *Am. Zool.* 38:369
- Stanley-Samuelson DW (1994) The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *Am Zool* 34:589-598
- Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1715-1733
- Tamayo D, Corporeau C, Petton B, Quere C, Pernet F (2014) Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 μ Var. *Aquaculture* 432:304-310
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water-stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222

2.2 Informations supplémentaires

Table S1: Proximate composition of oysters as a function of salinity (%), infection (controls vs. recipients) and time (d2 vs 4). Values are means \pm SE between replicate tanks (n=3)

Variables	Time	Controls				Recipients			
		10	15	25	35	10	15	25	35
Water (%)	2	88.9 \pm 0.3	87.8 \pm 0.6	87.0 \pm 0.1	87.5 \pm 0.6	88.9 \pm 0.3	88.5 \pm 0.3	86.8 \pm 0.4	85.7 \pm 0.2
	4	87.5 \pm 0.2	86.5 \pm 0.4	86.3 \pm 0.2	86.1 \pm 0.4	88.3 \pm 0.3	87.97 \pm 0.26	86.6 \pm 0.1	85.6 \pm 0.2
Protein (mg g ⁻¹ DW)	2	450.0 \pm 27.4	470.80 \pm 9.5	416.2 \pm 5.7	403.0 \pm 19.6	484.4 \pm 13.2	480.4 \pm 12.3	406.2 \pm 13.5	375.5 \pm 2.9
	4	444.5 \pm 28.9	413.2 \pm 7.6	387.4 \pm 14.5	380.2 \pm 10.5	488.7 \pm 10.6	444.6 \pm 26.3	409.6 \pm 16.3	370.2 \pm 22.6
Carbohydrate (mg g ⁻¹ DW)	2	191.6 \pm 32.1	176.7 \pm 7.0	111.7 \pm 9.7	108.8 \pm 9.1	164.7 \pm 17.5	131.2 \pm 4.4	114.0 \pm 9.0	108.8 \pm 7.9
	4	209.3 \pm 12.9	168.9 \pm 1.5	113.0 \pm 1.9	98.5 \pm 0.4	173.3 \pm 8.4	176.4 \pm 16.2	132.1 \pm 3.7	118.7 \pm 11.5
TAG/ST	2	4.3 \pm 0.2	3.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2	4.5 \pm 0.1	3.5 \pm 0.3	4.2 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2
	4	4.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	3.6 \pm 0.4	4.6 \pm 0.5	3.7 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2	4.1 \pm 0.6

Table S2: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of salinity, infection and time and their interactions on proximate composition of oysters. Significant p-values ($p < 0.05$) are in **bold**

Source of variation	d.f	Water		Protein		Carbohydrate		TAG/ST	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Mainplot									
Salinity	3	49.00	< 0.001	19.01	< 0.001	27.47	< 0.001	4.88	0.014
Infection	1	0.37	0.552	1.68	0.213	1.14	0.301	4.42	0.052
Salinity × Infection	3	11.15	< 0.001	1.81	0.187	2.33	0.113	2.62	0.087
Error a: Tank × Salinity × Infection	16								
Subplot									
Time	1	18.47	0.001	5.74	0.029	4.09	0.060	8.33	0.011
Salinity × Time	3	0.43	0.736	1.63	0.222	0.60	0.623	2.04	0.149
Infection × Time	1	5.66	0.030	1.73	0.207	3.91	0.066	2.16	0.161
Salinity × Infection × Time	3	0.26	0.852	0.09	0.964	1.55	0.240	0.74	0.543
Error b: Tank × Salinity × Infection × Time	16								

Table S3: Activities of energetic and antioxidant related enzymes as a function of salinity (%), infection (controls vs. recipients) and time (d2 vs d4). Values are means \pm SE between replicate tanks (n=3).

Variables	Time	Controls				Recipients			
		10	15	25	35	10	15	25	35
CS (mU mg ⁻¹)	Day 2	23.8 \pm 1.6	28.15 \pm 0.7	25.0 \pm 1.1	24.6 \pm 1.5	25.8 \pm 1.3	22.0 \pm 1.7	26.8 \pm 4.4	24.0 \pm 0.2
	Day 4	28.5 \pm 3.6	30.5 \pm 3.0	30.1 \pm 3.0	22.7 \pm 0.1	33.2 \pm 0.5	27.7 \pm 1.3	31.5 \pm 1.3	28.4 \pm 1.7
HK (mU mg ⁻¹)	Day 2	1.2 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1
	Day 4	1.5 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
SOD (U mg ⁻¹)	Day 2	11.8 \pm 3.1	9.9 \pm 0.4	11.5 \pm 2.0	12.7 \pm 1.8	9.8 \pm 1.6	12.6 \pm 1.9	12.3 \pm 1.8	9.8 \pm 1.3
	Day 4	5.2 \pm 0.7	5.7 \pm 0.4	4.3 \pm 0.7	5.5 \pm 0.5	4.5 \pm 0.4	6.0 \pm 0.6	5.7 \pm 0.2	4.5 \pm 1.0
CAT (U mg ⁻¹)	Day 2	32.5 \pm 5.1	38.2 \pm 2.3	40.8 \pm 1.3	42.0 \pm 3.9	22.8 \pm 1.0	36.8 \pm 1.8	38.6 \pm 0.9	33.9 \pm 1.0
	Day 4	31.6 \pm 2.6	41.0 \pm 3.3	50.8 \pm 4.0	44.3 \pm 2.5	26.8 \pm 1.9	29.9 \pm 1.1	43.4 \pm 3.3	40.8 \pm 3.4

Table S4: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of salinity, infection and time and their interactions on enzyme activities in oysters. Significant p-values ($p < 0.05$) are in **bold**.

Source of variation	d.f	CS		HK		SOD		CAT		
		F	p	F	p	F	p	F	p	
Mainplot										
Salinity	3	1.71	0.206	46.45	< 0.001	0.17	0.913	22.68	< 0.001	
Infection	1	0.47	0.503	11.16	0.004	0.06	0.806	19.73	< 0.001	
Salinity × Infection	3	2.37	0.108	6.30	0.005	1.22	0.335	0.13	0.939	
Error a: Tank × Salinity × Infection	16									
Subplot										
Time	1	20.45	< 0.001	2.36	0.144	106.32	< 0.001	4.32	0.054	
Salinity × Time	3	1.32	0.304	3.36	0.045	0.28	0.840	2.17	0.132	
Infection × Time	1	2.70	0.120	0.26	0.616	0.11	0.743	0.24	0.631	
Salinity × Infection × Time	3	0.58	0.636	0.34	0.795	0.71	0.558	1.77	0.193	
Error b: Tank × Salinity × Infection × Time	16									

Table S5: Results of the ANOVA investigating the effect of salinity, infection and time and their interactions on the fatty acids composition of the polar lipids

of oysters. Only fatty acid contributing to >1% were considered. Significant p-values ($p < 0.05$) are in **bold**.

Source of variation	14:0		16:0		16:1n-7		16:4n-1		18:0		18:1n-9		
	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Salinity	3	10.44	< 0.001	1.23	0.333	3.14	0.055	4.98	0.013	18.87	< 0.001	22.43	< 0.001
Infection	1	29.25	< 0.001	1.57	0.228	1.90	0.188	0.69	0.418	1.76	0.203	4.22	0.057
Salinity × Infection	3	4.20	0.023	1.09	0.383	2.15	0.134	0.67	0.581	1.73	0.201	0.67	0.583
Error: Tank × Salinity × Infection	16												
Source of variation	18:1n-7		18:2n-6		18:3n-3		18:4n-3		20:1 DMA		20:1n-11		
	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Salinity	3	83.61	< 0.001	10.88	< 0.001	4.03	0.026	11.95	< 0.001	11.17	< 0.001	13.79	< 0.001
Infection	1	8.96	0.009	9.84	0.006	17.36	0.001	36.44	< 0.001	1.05	0.320	0.08	0.786
Salinity × Infection	3	2.16	0.133	1.14	0.362	2.08	0.143	2.62	0.087	0.21	0.890	1.62	0.225
Error: Tank × Salinity × Infection	16												
Source of variation	20:1n-7		20:4n-6		20:5n-3		22:5n-6		22:5n-3		22:6n-3		
	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Salinity	3	2.77	0.076	171.48	< 0.001	27.69	< 0.001	79.69	< 0.001	35.83	< 0.001	9.42	< 0.001
Infection	1	0.58	0.459	8.92	0.009	0.40	0.537	3.40	0.084	0.49	0.494	0.93	0.350
Salinity × Infection	3	0.63	0.607	0.38	0.769	0.46	0.713	1.06	0.395	0.54	0.659	1.28	0.315
Error: Tank × Salinity × Infection	16												
Source of variation	20:2 NMI		22:2 NMI		Branched FA		Unsaturation index						
	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p				
Salinity	3	3.83	0.030	11.61	< 0.001	7.39	0.003	9.34	< 0.001				
Infection	1	0.07	0.793	1.10	0.310	2.54	0.131	0.16	0.691				
Salinity × Infection	3	2.98	0.063	0.74	0.546	3.37	0.045	2.37	0.109				
Error: Tank × Salinity × Infection	16												

Table S6: Matrix of correlation of fatty acids showing r coefficient obtained with Pearson method. When the linear model is significant (p-value < 0.05), the r value is in bold. Abbreviations: Carbo, carbohydrates; DMA, dimethyl acetals; NMI, non-methylene-interrupted; BR, branched; UI, unsaturation index.

	Salinity	Water	Carbohydrates	TAG:ST	Proteins	CS	HK	CAT	SOD	14:0	16:0	16:1n-7	18:0 DMA	18:0	18:1n-9	18:1n-7	18:2n-6	18:3n-3	18:4n-3	20:1 DMA	20:1n-11	20:1n-7	20:4n-6	20:5n-3	22:5n-6	22:5n-3	22:6n-3	20 NMI	22 NMI	BR	UI
Salinity	1	-0.9	-0.85	-0.36	-0.83	-0.28	0.86	0.63	0.02	-0.53	-0.33	0.51	-0.6	0.75	-0.86	0.92	-0.52	-0.16	-0.07	-0.74	-0.15	0.55	0.94	-0.35	0.76	-0.66	0.2	-0.35	-0.46	-0.12	0.3
Water		1	0.66	0.12	0.86	0.11	-0.83	-0.65	0.06	0.49	0.36	-0.37	0.44	-0.62	0.72	-0.84	0.42	0.16	-0.02	0.57	0.3	-0.44	-0.84	0.43	-0.73	0.66	-0.36	0.47	0.54	0.36	-0.47
Carbohydrates			1	0.42	0.58	0.29	-0.77	-0.48	0.13	0.39	0.3	-0.47	0.57	-0.59	0.67	-0.78	0.33	0.01	-0.04	0.65	0.25	-0.47	-0.84	0.39	-0.74	0.69	-0.33	0.24	0.45	0.13	-0.33
TAG:ST				1	0.24	0.39	-0.11	-0.28	-0.15	-0.09	-0.2	-0.24	0.67	-0.29	0.12	-0.35	-0.1	-0.33	-0.36	0.58	-0.09	-0.36	-0.39	0.18	-0.39	0.28	-0.2	-0.15	0.18	-0.24	0.14
Proteins					1	0	-0.76	-0.7	-0.23	0.38	0.2	-0.49	0.49	-0.58	0.74	-0.76	0.44	0.08	-0.03	0.62	0.15	-0.48	-0.76	0.31	-0.62	0.46	-0.16	0.44	0.46	0.25	-0.26
CS						1	-0.07	-0.02	0.15	0.18	0.05	0.05	0.44	-0.46	0.12	-0.22	0.21	0.12	0.04	0.41	-0.34	-0.46	-0.26	-0.12	-0.15	0.17	0.03	-0.18	-0.12	-0.29	0.2
HK							1	0.44	-0.1	-0.66	-0.44	0.28	-0.46	0.66	-0.77	0.86	-0.57	-0.32	-0.23	-0.61	-0.14	0.55	0.84	-0.29	0.6	-0.52	0.18	-0.25	-0.33	-0.16	0.32
CAT								1	0.25	0.05	-0.2	0.4	-0.29	0.18	-0.46	0.53	0.09	0.39	0.52	-0.37	-0.5	0.25	0.65	-0.75	0.84	-0.74	0.53	-0.49	-0.68	-0.6	0.56
SOD									1	0.16	0.41	-0.01	-0.05	-0.14	-0.02	0.01	0.03	0.11	0.09	-0.02	-0.13	0.18	0.04	-0.09	0.07	0.03	-0.09	-0.11	-0.15	0.14	-0.08
14:0										1	0.62	0.09	0.17	-0.72	0.7	-0.63	0.87	0.86	0.78	0.28	-0.23	-0.6	-0.55	-0.07	-0.11	0.11	0.27	0.15	-0.18	-0.15	-0.03
16:0											1	0.1	-0.22	-0.24	0.43	-0.33	0.47	0.47	0.3	-0.12	0.12	-0.29	-0.36	0.33	-0.21	0.32	0.05	0.22	0.03	0.44	-0.36
16:1n-7												1	-0.43	0.33	-0.44	0.38	-0.08	0.32	0.2	-0.46	-0.18	0	0.42	-0.11	0.41	-0.35	0.08	-0.28	-0.4	-0.03	0.05
18:0 DMA													1	-0.65	0.37	-0.62	0.25	-0.07	-0.04	0.92	-0.32	-0.63	-0.61	-0.05	-0.42	0.23	-0.08	-0.27	0.03	-0.37	0.3
18:00														1	-0.81	0.69	0.39	0.35	0.51	0.1	-0.56	-0.8	0.21	-0.53	0.45	0.03	0.43	0.3	0.14	-0.23	
18:1n-9															1	-0.5	-0.23	-0.13	-0.74	-0.16	0.61	0.96	-0.34	0.73	-0.64	0.25	-0.32	-0.41	-0.06	0.32	
18:1n-7																1	0.86	0.82	0.31	-0.42	-0.64	-0.44	-0.31	0.06	-0.09	0.59	0.04	-0.29	-0.31	0.29	
18:2n-6																	1	0.92	0	-0.46	-0.44	-0.13	-0.39	0.32	-0.29	0.6	-0.05	-0.48	-0.36	0.28	
18:3n-3																		1	0.92	0	-0.46	-0.44	-0.13	-0.39	0.32	-0.29	0.6	-0.05	-0.48	-0.36	0.28
18:4n-3																			1	-0.01	-0.55	-0.36	-0.02	-0.55	0.46	-0.45	0.68	-0.13	-0.62	-0.47	0.42
20:1 DMA																				1	-0.28	-0.58	-0.68	-0.04	-0.48	0.29	-0.11	-0.09	0.1	-0.28	0.14
20:1n-11																					1	0.34	-0.28	0.81	-0.63	0.74	-0.71	0.58	0.88	0.66	-0.86
20:1n-7																						1	0.6	0.01	0.26	-0.15	-0.21	0.09	0.18	0.17	-0.24
20:4n-6																							1	-0.5	0.84	-0.77	0.33	-0.33	-0.53	-0.15	0.38
20:5n-3																								1	-0.82	0.85	-0.76	0.44	0.78	0.69	-0.81
22:5n-6																									1	-0.95	0.73	-0.46	-0.81	-0.46	0.68
22:5n-3																										1	-0.71	0.49	0.84	0.52	-0.76
22:6n-3																											1	-0.34	-0.7	-0.57	0.79
20 NMI																												1	0.53	0.53	-0.67
22 NMI																													1	0.54	-0.76
BR																														1	-0.78
UI																															1

Chapitre 3 : Effet du pH sur
la transmission de la
maladie induite par OsHV-
1 et la mortalité associée de
C. gigas

1 Présentation de l'Article 3

Le pH est un paramètre qui fluctue naturellement dans les estuaires et zones côtières. De plus, en réponse à l'augmentation du CO₂ dans l'atmosphère, l'océan s'acidifie (Raven et al. 2005, NOAA 2017). D'ici 2100, il est prévu une baisse du pH de 0.3-0.4 unité (Orr et al. 2005).

Les mollusques font partie des organismes marins les plus sensibles à l'AO (Kroeker et al. 2013). La diminution du pH de l'eau de mer conduit à la réduction de la disponibilité des carbonates nécessaires à ces organismes pour la formation de leur coquille, mais aussi à la dissolution de cette structure, ce qui a des conséquences sur la croissance. L'AO affecte aussi d'autres fonctions de base comme l'équilibre acide-base et le budget énergétique (Gazeau et al. 2013, pour revue). Dans ce contexte, la plus grande proportion d'énergie allouée au maintien de l'équilibre acide-base peut se faire au détriment d'autres fonctions comme la réponse immunitaire (Gazeau et al. 2013, pour revue).

Une diminution de pH réduit la capacité de réponse immunitaire des invertébrés marins, en affectant des propriétés de l'hémolymphe, l'intégrité et la fonctionnalité des hémocytes et peut provoquer un stress oxydatif (Malagoli & Ottaviani 2005, Beesley et al. 2008, Bibby et al. 2008, Matozzo et al. 2012). Ces études analysent la réponse immunitaire des organismes sans les mettre en condition d'infection. Or les modifications engendrées par une réduction de pH peuvent parfois revenir à la normale lorsque l'organisme est soumis à une infection (Ellis et al. 2015). Ainsi, pour étudier les effets du pH sur la sensibilité d'un organisme à un agent pathogène, il est nécessaire d'étudier l'interaction hôte-pathogène. Sur le nombre grandissant d'études qui s'intéressent à l'AO, peu d'entre elles prennent en compte l'interaction hôte-pathogène (Ellis 2012, Asplund et al. 2014, Mackenzie et al. 2014, Ellis et al. 2015, Harland et al. 2015, Keppel et al. 2015, MacLeod & Poulin 2015, MacLeod & Poulin 2016). Ainsi, les objectifs de ce chapitre sont :

- D'identifier l'effet du pH sur la transmission et l'expression de la maladie de *C. gigas* induite par OsHV-1.
- Déterminer les effets du pH et de l'infection par OsHV-1 sur la réponse métabolique des huîtres.

Des huîtres de 4 mois produites en laboratoire ont été acclimatées 6 jours à 2 conditions de pH (pH 8.1, actuel vs pH 7.8, prévu dans 2100, 6 bassins par condition de pH). Pendant cette période, d'autres huîtres (donneurs) issues de la même cohorte ont été infectées sur le terrain lors d'un épisode de mortalité massive. Lorsque ces animaux ont commencé à mourir, ils ont été ramenés en laboratoire et positionnés dans un bassin dont l'eau a servi de source infectieuse (SI). La SI a ensuite été acidifiée à pH 7.8 par injection de CO₂ ou maintenue à pH 8.1 avant d'être distribuée à la moitié des bassins (6 bassins, 3 par condition de pH) pour infecter des animaux receveurs. Le reste des bassins contenaient les animaux témoins (Figure 20).

La mortalité a été suivie quotidiennement pendant 15 jours. De plus, des échantillonnages de tissus d'huîtres ont été réalisés aux jours 0, 2 et 4 post-infection pour étudier la quantité d'ADN d'OsHV-1, l'expression de certains gènes viraux, mais aussi des paramètres du métabolisme de l'hôte (réserves énergétiques, réponse antioxydante, composition en acides gras des membranes).

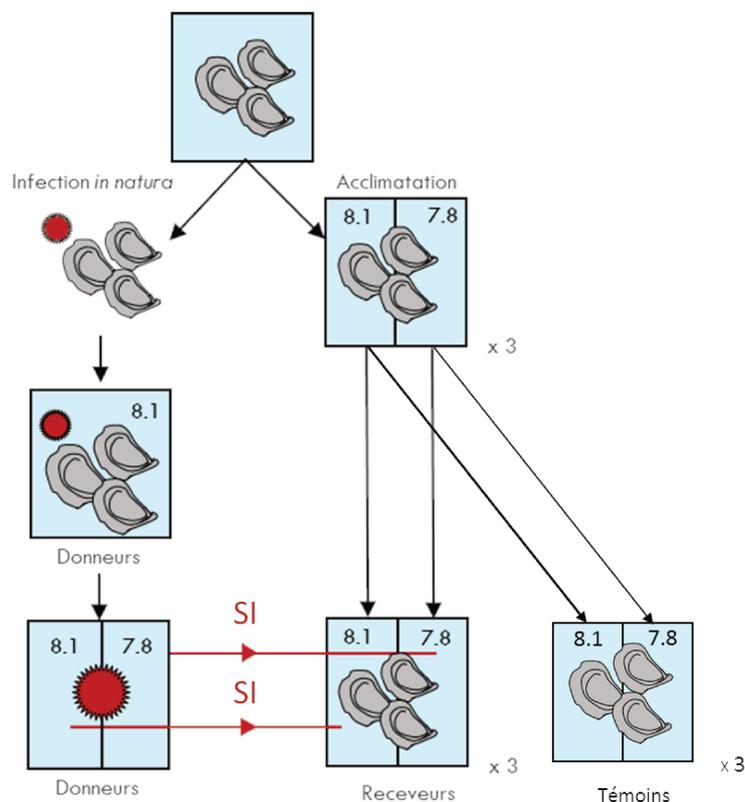


Figure 20: Dispositif expérimental de l'expérience 3

Les huîtres infectées à pH 7.8 ont une survie 12% plus faible que celles infectées à pH 8.1

La quantité d'ADN d'OsHV-1 et l'expression de 4 gènes viraux sont similaires dans les tissus d'huîtres infectées à pH 7.8 ou pH 8.1. Ainsi, la réduction du pH ne semble pas affecter l'infectiosité d'OsHV-1. Le différentiel de survie des huîtres infectées s'explique alors probablement par un changement métabolique de l'hôte lorsque l'eau de mer est acidifiée.

Les huîtres maintenues à pH 7.8 maintiennent leurs niveaux de réserves énergétiques en glucides et lipides en comparaison aux huîtres à pH 8.1. Dans des conditions sous-optimales, les invertébrés aquatiques mettent en place des mécanismes, en vue de maintenir l'homéostasie énergétique et de maintenir le bon fonctionnement de l'animal (Sokolova et al. 2012). Ainsi dans cette expérience, la tolérance des huîtres à pH 7.8 peut s'expliquer par leur capacité à maintenir une homéostasie énergétique.

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans les huîtres maintenues à pH 7.8 est réduite en comparaison à ce qui est observé à pH 8.1. De plus, en réponse à l'infection, l'activité de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) augmente le 2^{ème} jour post-infection dans les huîtres maintenues à pH 8.1. Ce n'est pas le cas des huîtres infectées à pH 7.8, ce qui laisse penser que la production d'espèces réactives de l'azote (ERN) soit restée à un niveau basal. L'augmentation de production des espèces réactives de l'oxygène et des ERN, ainsi que l'activation de la réponse antioxydante sont essentielles pour la réponse à une infection et le maintien d'un équilibre oxydo-réducteur des organismes marins (Donaghy et al. 2015, Genard et al. 2013, Corporeau et al. 2014, Richard et al., 2016). D'ailleurs, en réponse à l'infection par OsHV-1 les activités de la SOD et de la GST augmentent le 4^{ème} jour post-infection dans les huîtres et reflètent sans doute une hausse de la production d'ERO.

Ainsi, la plus faible activité de la SOD des huîtres à pH 7.8 et le maintien d'une activité basale de la iNOS des huîtres infectées à pH 7.8 suggèrent respectivement une moindre capacité de production d'ERO et d'ERN en comparaison à pH 8.1. Cela pourrait refléter une moindre capacité de défense des

huîtres à pH 7.8 en comparaison aux huîtres à pH 8.1 et expliquerait le différentiel de survie observé entre les huîtres infectées aux deux pH.

Enfin, seules des différences mineures de la composition en acides gras et en contenus en 20:4n-6 et prostaglandine E2 ont été mises en évidence. Ces molécules sont impliquées dans la réponse immunitaire des invertébrés (Stanley-Samuels 1994, Segueau et al. 2011). Cela suggère que le pH et l'infection n'ont pas activé la voie inflammatoire des prostaglandines.

Une autre explication au différentiel de survie observé entre les deux pH pourrait être une différence de la virulence, d'abondance et de diversité des microorganismes présents dans la source infectieuse ou dans le microbiome des huîtres (Asplund et al. 2014, Burge et al. 2014, Mackenzie et al. 2014).

2.1 Corps de l'article

In preparation, will be submitted in Journal of Experimental Biology

Low pH reduced survival of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the ostreid herpesvirus 1 by altering the metabolic response of the host

Marine FUHRMANN¹, Gaëlle RICHARD², Claudie QUERE¹, Bruno PETTON³, Fabrice PERNET¹

¹ Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Technopole de Brest-Iroise, Plouzané, France

² LEMAR UMR 6539, Technopole de Brest-Iroise, Plouzané, France

³ Ifremer/ LEMAR UMR 6539, Presqu'île du vivier, Argenton, France

Abstract

The amount of atmospheric CO₂ penetrating the ocean is expected to increase over the next century and to cause a pH reduction estimated at 0.3/0.4 pH unit. Environmental change in the marine realm has been accompanied emerging diseases as new pathogens evolve to take advantage of hosts weakened by environmental stress. Here we investigated how an exposure to reduced seawater pH influenced the response of the oyster *Crassostrea gigas* to an infection by the ostreid herpesvirus type I (OsHV-1). Oysters were acclimated at pH 8.1 or pH 7.8 and then exposed to OsHV-1 at these pH. Their survival was monitored and oyster tissues were sampled for biochemical analyses. The survival of oysters exposed to OsHV-1 at pH 7.8 was lower (33.5%) than that of their counterparts at pH 8.1 (44.8%) whereas levels of OsHV-1 DNA were similar. Energetic reserves, fatty acid composition and prostaglandin levels in oyster did not vary consistently with pH, infection or their interactions. However, there was a reduction in the response of certain antioxidant and immune related enzymes at low pH which is consistent with the observed difference in survival.

Introduction

The amount of atmospheric CO₂ penetrating the ocean is expected to increase over the next century and to cause a pH reduction estimated at 0.3/0.4 pH unit (Caldeira & Wickett 2003). Calcifying organisms and more specifically bivalves are susceptible to pH reduction (Kroeker et al. 2013). They allocate energy to the maintenance of acid–base balance at the expense of shell and somatic growth, protein synthesis, behaviour, reproduction and immune response (Gazeau et al. 2013, Parker et al. 2013).

The host response to its pathogens is a key determinant of survival under changing environmental conditions. Investigations showed that low pH can reduce health of bivalves by limiting immune and antioxidant responses (Malagoli & Ottaviani 2005, Beesley et al. 2008, Bibby et al. 2008, Tomanek et al. 2011, Matozzo et al. 2012, Range et al. 2014, Ellis et al. 2015, Li et al. 2015, Wang et al. 2016). It is therefore suggested that low pH can render animals more vulnerable to pathogens, but this has rarely been examined in term of host survival in the context of an infection (Ellis et al. 2015, MacLeod & Poulin 2016).

Here we investigated how an exposure to reduced seawater pH influenced the response of the oyster *C. gigas* to an infection by the ostreid herpesvirus type I (OsHV-1). In 2008, massive mortality events of young Pacific oysters have been reported in France and since then in other European countries and Oceania (Barbosa Solomieu et al. 2015, Pernet et al. 2016). These mortality events are associated with the infection of oysters with a newly described genotype of OsHV-1 (Segarra et al. 2010). This virus now poses a major challenge for Pacific oyster production around the world. To our knowledge, this study is the first to investigate how pH influences the response of a bivalve to a viral infection.

In this study, four months old oysters were transferred to an estuary during a disease outbreak and brought back to the laboratory. These oysters were positive to OsHV-1 and they were placed in a seawater tank at pH 8.1. The seawater from this tank was used as source of infection (SI). Naive oysters (recipients) were exposed to SI after a short acclimation period at pH 8.1, the current pH of ocean, or pH 7.8, the predicted value at the end of the 21st century. Control oysters were left unexposed to the SI.

Oyster survival was monitored for 15 days. Oyster tissues were sampled for OsHV-1 DNA quantification and for analyses of energetic reserves, key enzyme activities, fatty acid composition and prostaglandin level. These parameters may change at low pH and therefore modulate the host response to pathogens.

Energy metabolism plays a key role in organism's survival and function, as well as in stress adaptation and tolerance to environmental stressors (Sokolova 2011, Sokolova et al. 2012). Also, energetic reserves play a role in the outcome (death or recovery) of an infection by OsHV-1 (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014a).

The main cellular defence mechanism in bivalves relies on phagocytosis by haemocytes. This process ends by the internal destruction of pathogens through an increased production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) that are toxic to invaders (Pipe et al. 1993, Donaghy et al. 2015). Accumulation of ROS and RNS can result in oxidative stress in the host (Lesser 2006). Oxidative stress is normally prevented by several enzymes (Sies 1993, Hermes-Lima 2004) such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and nitric oxide synthase (iNOS).

Membrane fatty acid composition underlies the degree of oxidative stress and damage at the cellular level (Hulbert 2003). Also, twenty-carbon polyunsaturated fatty acids represent precursors of eicosanoids, a group of highly biologically active hormones such as prostaglandins, leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids (Smith & Murphy 2002). Eicosanoid production is associated with stressful or energetically expensive situations such as stimulation of immune function (Stanley & Howard 1998). Fatty acid composition of polar lipids (membrane) and the level of prostaglandin in oysters have never been investigated in previous pH studies.

Material and method

Animals

The oysters used in the experiment came from a single cohort produced in 2015 according to Petton et al. (2015a). In March 2015, adult oysters were held at 17°C in 500 l flow-through tanks for conditioning. Fertilization was achieved on 28 April 2015 by stripping the gonads. The embryos developed in 150 l tanks at 21°C for 48 h, and D-larvae were transferred to flow-through rearing systems at 25°C. After 15 days, competent larvae were collected and allowed to settle on clutches in downwellers. The entire rearing cycle was conducted in UV-sterilized, 1- μm -filtered seawater enriched with living phytoplankton (Petton et al. 2015a) at the Ifremer Marine Station (Argenton, France, 48° 48' 24.49" N, 3° 0' 22.84" W).

At the onset of the experiment (10 August) oysters were 4 months old, 0.6 ± 0.2 g wet weight and 18.8 ± 2.9 mm shell length (mean \pm SD). They were maintained at $21.1 \pm 0.17^\circ\text{C}$, 35.2‰ salinity, and fed with *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3) and *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) (1:1 in dry weight). Phytoplankton concentration was maintained at $800 \mu\text{m}^3 \mu\text{l}^{-1}$ algae. These environmental parameters were checked daily. A light bubbling was added to each tank to maintain the oxygen level between 85 and 100% of saturation.

Experimental design

From 10 to 17 August 2015, a subsample of the oyster cohort was transferred to a farming area of the Bay of Brest (Brittany, France, 48° 20' 06.19" N, 4° 19' 06.37" W) during a disease outbreak. After 7 days of field exposure, few individuals died. The remaining living oysters were moved back to the laboratory. These field infected oysters were then used as pathogen donors (Petton et al. 2015b). Level of OsHV-1 DNA in donors was $2.94 \times 10^9 \pm 1.56 \times 10^9$ OsHV-1 DNA copies mg^{-1} wet weight (mean \pm SD, n=3 pools of 10 oysters).

In the meantime, oysters kept in the laboratory were acclimated at two pH levels: 8.1 which is the current pH of ocean (control) or 7.8 which corresponds to the predicted value at the end of the 21st century (acidified seawater). Acidification of FSW was done prior to being pumped to oyster tanks by injection of pure CO₂ and pH was monitored with a pH-computer from the CO₂/pH control kit (JBL ProFlora

m1003, Germany). These oysters were placed in 47 l tanks (n=6 tanks per treatment) in a flow-through system supplied at 6-8 l h⁻¹. Each tank contained ca 150 oysters for a total biomass of 85.5 g. This combination of oyster density and water flow allowed limiting the acidification of seawater which naturally occurs because of animal respiration. These oysters were then used as pathogen recipients or controls.

On 17 August 2015 (day 0), pathogen donors were placed in a 60 l flow-through tank filled with seawater at pH 8.1. The seawater surrounding the donors was used as the source of infection (SI). The SI was left at pH 8.1 or acidified by injection of CO₂ to reach pH 7.8. Then the SI was pumped to tanks where pathogen recipients were held (n=3 tanks per pH × infection combination). Control tanks were not connected to the SI but supplemented with FSW at a pH 8.1 or 7.8, as previously described. At day 4, when recipients began to die, the donors were removed but the seawater distribution remained unchanged.

Survival of recipients and controls was followed every day for 15 days. Dead oysters were removed from tanks. Alive oysters were sampled at days 0, 2 and 4 for each treatment combination, before the onset of mortality. Whole tissues from 10 oysters per tank were removed from the shells, pooled together, flash frozen and stored in liquid nitrogen.

Laboratory analyses

The oyster tissues were ground in liquid nitrogen with a MM400 homogenizer (Retsch, Eragny, France). The resulting oyster powders were stored at -80°C until further analyses. Pathogen and biochemical analyses were conducted on oyster powder subsample as fully described in Supplementary File S1.

OsHV-1

Total DNA from oyster tissues was then extracted with a QIAamp tissue mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The extract was stored at -20°C before detection and quantification according to a real-time PCR protocol based on SYBR® Green chemistry (Pepin et al, 2008). Results were expressed as OsHV-1 DNA copy number per milligram of wet tissue. The

detection of μ var strain of OsVH-1 was done using specific DPFor/DPRev primers targeted the region of the OsHV-1 genome predicted to encode a DNA polymerase catalytic sub-unit (Webb et al. 2007).

Energetic reserves and membrane fatty acids

Carbohydrates concentration was determined according to Dubois (1956). Neutral lipid classes were analysed by high performance thin layer chromatography. Identified compounds were triacylglycerols (TAG $\mu\text{g mg}^{-1}$) and sterols (ST $\mu\text{g mg}^{-1}$). Since TAG are mainly reserve lipids and ST are structural constituents of cell membranes, we used the TAG-ST ratio as a proxy for the relative contribution of reserve to structure. Polar lipids were separated from neutral lipids using a silica gel micro column and their fatty acid were analysed by gas chromatography (Marty et al. 1992). Results are expressed as area % of polar lipids.

Proteins, antioxidant and immune related enzymes and prostaglandins

Proteins were quantified following Bradford (1976) and expressed as mg of proteins per g of dry weight. Total activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed using a SOD assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) according to a modified procedure (Le Bris et al. 2015). Catalase activity (CAT; EC 1.11.1.6) was measured according to Aebi et al. (1984). Total Glutathione Peroxidase activity (t-GPx, EC 1.11.1.9) and Glutathione-S-Transferase activity (GST, EC 2.5.1.18) were assayed according to McFarland et al. (1999). Glutathione Reductase activity (GR, EC 1, pH 8.1.7) was assessed following Cribb et al. (1989). The inducible Nitric Oxide Synthase activity (iNOS, EC 1.14.13.39) was measured according to the non-radioactive method developed by Richard et al. (2016). For SOD and CAT, results are expressed in U mg^{-1} protein whereas for the other enzymes, results are expressed in mU mg^{-1} protein. Assays were done in triplicate using 96-well micro-plates (Greiner Bio One, Les Ullis, France), a POLARstar Omega micro-plate reader and MARS data analysis software (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Catalase activity was measured in quartz Hellma cuve 110 (Dutscher, Brumath, France) using a Libra S12 spectrophotometer (Biochrom, Cambourn, UK).

In vivo, prostaglandin E₂ (PGE₂) is converted to Prostaglandin E₂ Metabolite (PGEM) assayed using the PG screening EIA Kit (Cayman Chemical No. 514531, Ann Arbor, MI, USA) according to a modified procedure from Seguineau et al. (2011).

Statistical analyses

Survival analysis

Nonparametric estimates of the survivor function were computed according to (Kaplan & Meier 1958). Survival time was measured as days from the onset of the experiment (day 0) when recipient oysters were exposed to the SI. The data were read as the number of dead animals within each tank on each day. Survival curves of recipient oysters were plotted and compared among the pH treatments.

The survival curves of recipient oysters were compared using the Cox regression model (Cox 1972). The survival of control oysters (not exposed to the SI) was not included in the statistical models because it was always 100%. The proportionality of hazards (PH) was checked and validated with Schoenfeld residuals.

Multivariate analyses

Time series of membrane fatty acids for each pH, infection status and time were associated using a hierarchical clustering method based on the Euclidian distance and Ward's linkage methods (Ward, 1963). The clustering and related time series were represented using heat map plots of the raw dataset (Eisen et al., 1998). Only fatty acids >1 mol% in at least one treatment combination were included in this analysis.

ANOVAs

Split plot ANOVAs were conducted to determine differences in all biochemical variables, according to pH, infection and sampling time and their interactions. The experimental unit was the tank in which pH and infection were applied. Main plots were pH and infection levels, subplots were sampling times.

Where significant differences were measured a Tukey test was computed to characterize which means were different.

All statistical analyses were conducted using R Software (www.R-project.org/). Only significant effects are shown.

Results

Survival

The survival of controls was 100% at the end of the experiment. In recipients, the onset of mortality began at days 2. Their final survival at pH 7.8 was lower (33.5%) than that of animals at pH 8.1 (44.8%, Fig. 1). Overall, the risk of mortality of recipients at pH 7.8 increased by 37% compared to that of oysters held at pH 8.1 (Supplementary Table S1).

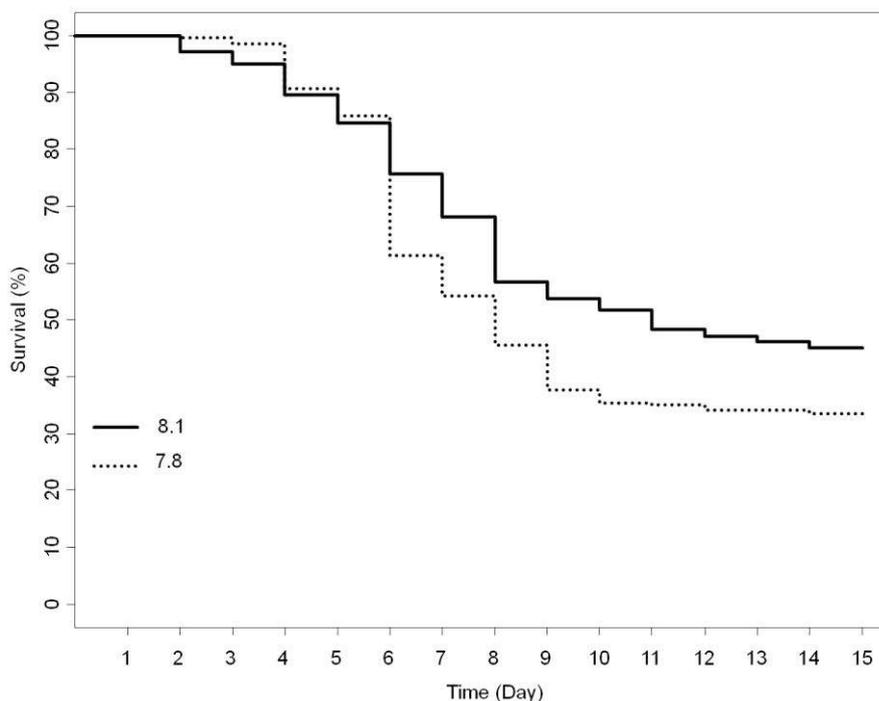


Fig.1: Survival of oysters held at 2 pH (7.8 vs 8.1) and exposed to the source of infection from which pathogens were previously exposed to 2 pH (7.8 vs 8.1). Survival time was measured as days from the onset of exposure to the source of infection.

OsHV-1

The levels of OsHV-1 DNA were not influenced by pH in all experimental treatments (Supplementary table S2). However, the levels of OsHV-1 DNA in recipient oysters was 4 to 5 orders of magnitude higher than in controls (Fig. 2, Supplementary Tables S2, S3). Overall, levels of OsHV-1 DNA increased by 1.4 order of magnitude between day 2 and 4 (Fig. 2A, Supplementary Table S3).

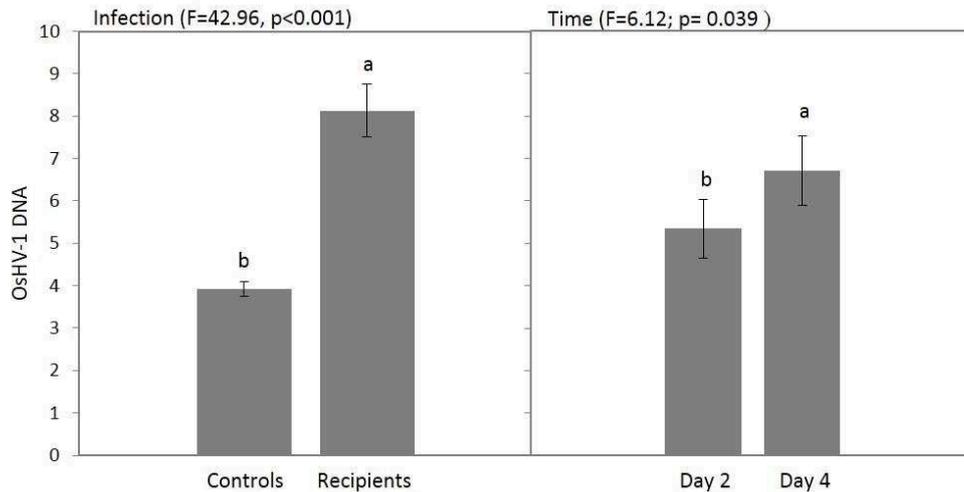


Fig.2: Quantification of the OsHV-1 DNA as a function of exposure to the source of infection and time, results are expressed as DNA copies number per mg of fresh weight and were $\log(x+1)$ transformed. Data are means \pm SE between replicates depending on combination of treatments. Letters indicate significant differences.

Proximate composition

Carbohydrate content in oysters at pH 7.8 was 26% higher than at pH 8.1 (Fig. 3a) but the level of TAG (relative to ST) and protein were similar between pH treatments (Supplementary Table S4, S5). The level of protein in recipient oysters was 15% lower than in controls (Fig. 3b).

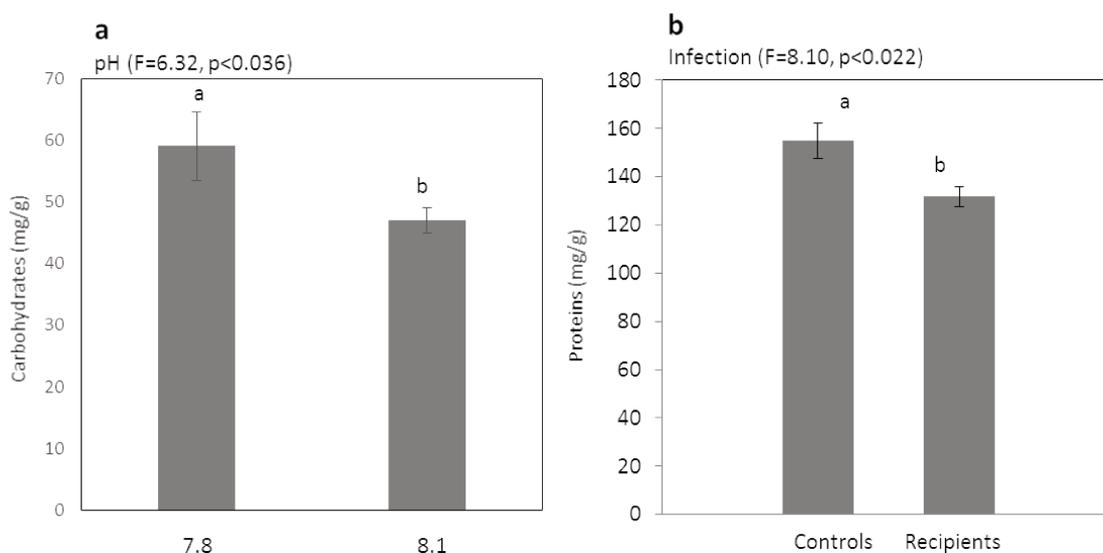


Fig.3: Proximate composition of oyster tissues giving the content of (a) carbohydrates as a function, of pH and (b) proteins as a function of exposure to the source of infection. Data are means \pm SE between replicates and are expressed in mg g⁻¹ of fresh weight. Letters indicate significant differences.

Antioxidant and immune related enzymes

Among the six tested enzymes, only SOD and iNOS activities were influenced by pH. Indeed, the activity of SOD in both recipients and controls at pH 7.8 was 19% lower than at pH 8.1 (Fig. 4a, Supplementary Table S6, S7). For iNOS, the effect of pH interacted with infection and time (Fig. 4b, Supplementary Tables S6, S7). The activity of iNOS in recipients at pH 8.1 was on average double than in other factor combinations.

Activities of SOD, GST or GR varied as a function of the interaction of infection and time (Supplementary Table S6, S7). Activities of SOD and GST were respectively 69% and 141% higher in recipients at day 4 than in other factor combinations (Fig 4a, c) whereas no consistent pattern was found for GR.

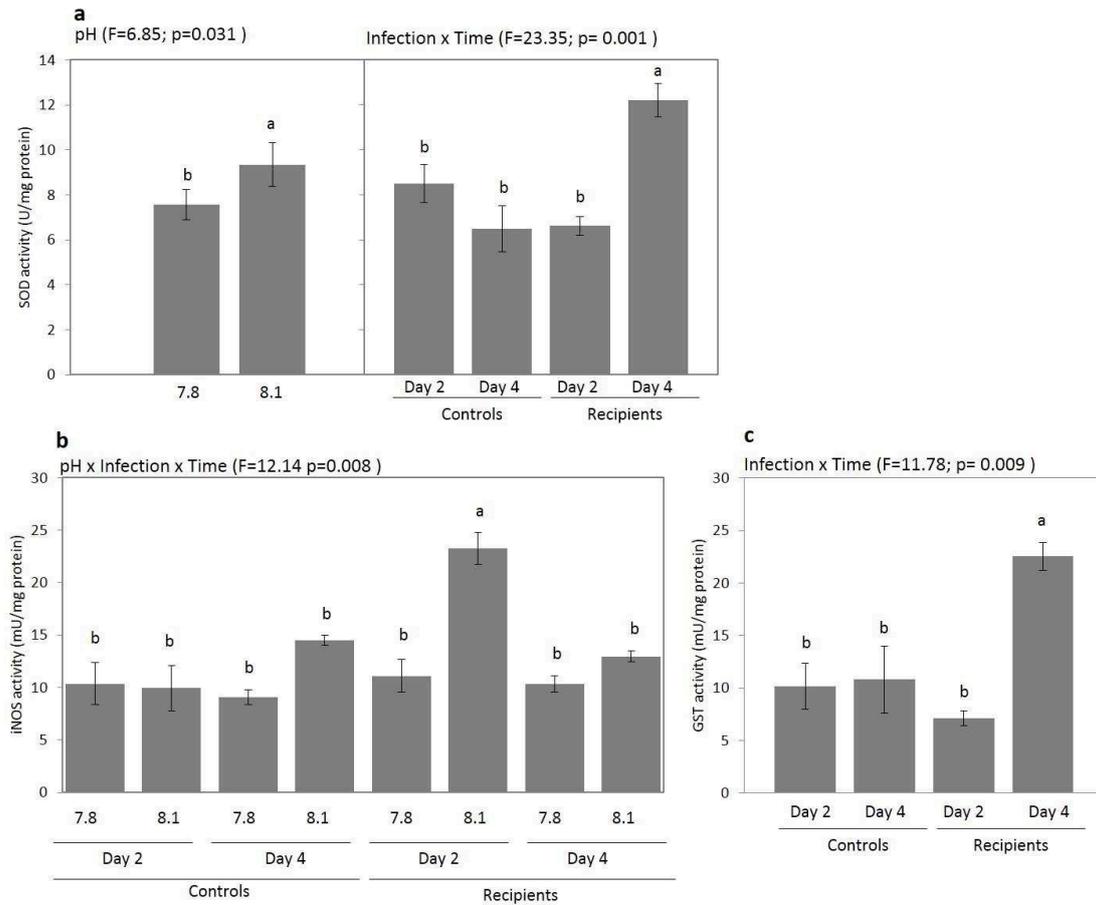


Fig.4: (a) SOD activity as a function of pH and infection x time separately, (b) iNOS activity as a function of pH x infection x time, (c) GST activities as a function of infection x time. Data are means \pm SE between replicates depending on combination of treatments. Letters indicate significant differences. Abbreviations: SOD, total superoxide dismutase; iNOS, inducible nitric oxide synthase GST, glutathione S-transferase.

Membrane fatty acids

The major fatty acids found in oyster tissues were 22:6n-3, 16:0, 18:0 dimethylacetal (DMA), 20:5n-3 and 20:4n-6, which together accounted for more than 50% of the total fatty acids (Tab.S8). Hierarchical clustering identified four distinct groups of fatty acids (Fig.5). Groups 1 and 2 included plasmalogen-related fatty acids, such as non-methylene-interrupted (20:2 and 22:2), 20:1n-11 and DMA (18:0 and 20:1) (Kraffe et al. 2004) and 20:4n-6, a precursor of eicosanoids (Smith & Murphy 2002). Group 3

contained the short chain fatty acids (14:0, 16:0, 16:1n-7), and branched fatty acids typical of bacteria. The group 4 included all the major polyunsaturated fatty acids: 18:2n-7, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-6, and 22:6n-3. Overall, there was no consistent clustering of pH, infection status and time on these fatty acids (Fig.5, Tab.S8, S9). The pH only had a significant effect on the levels of 22:6n-3 and the unsaturation index of polar lipids, which were slightly greater at low pH (Tab S9).

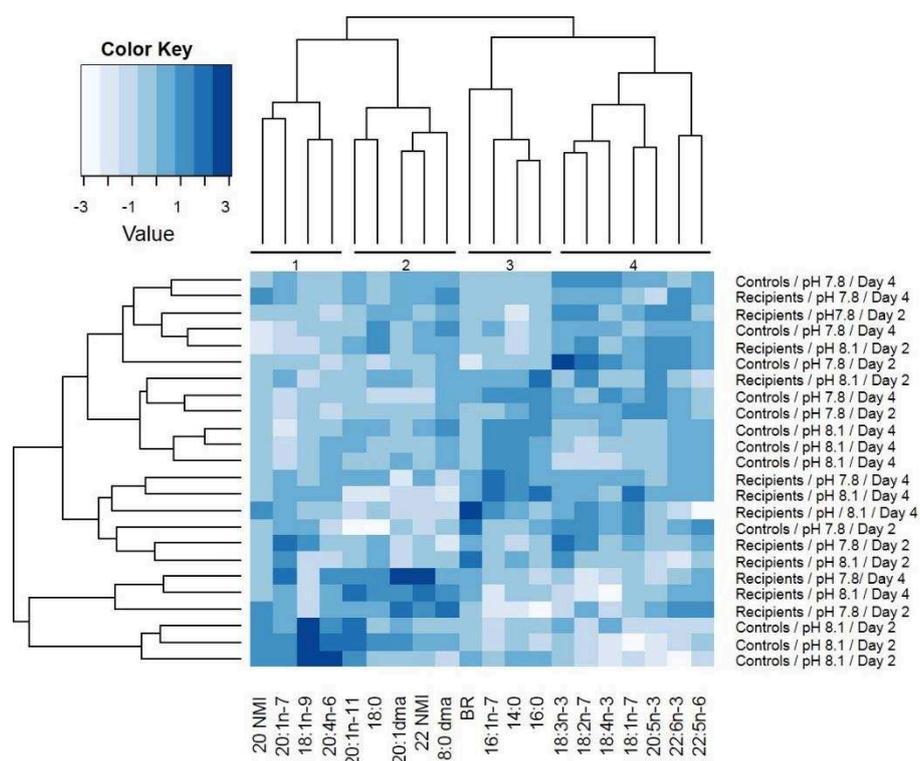


Fig.5: Heat map showing lipids contributing >1 mol% of total fatty acids and dimethylacetals. Fatty acids were reordered according to the hierarchical clustering result given by the dendrogram at the top. The dendrogram on the left shows how the lipid profiles cluster by individuals. Abbreviations: BR, branched; 20 and 22 NMI, total of C₂₀ and C₂₂ non-methylene interrupted; DMA dimethylacetal fatty acids.

Prostaglandins

The level of Prostaglandin E₂ Metabolite (PGEM) was influenced by the interaction of pH, infection and time (Supplementary Table S10, S11). The level of PGEM in controls at pH 8.1 (4.1 pg mg⁻¹ dry mass) was on average double than in other factor combinations (2.0-2.4 pg mg⁻¹ dry mass), except for recipients at pH 8.1 day 2 and pH 7.8 day 4 where values were similar (2.8-3.1 pg mg⁻¹ dry mass).

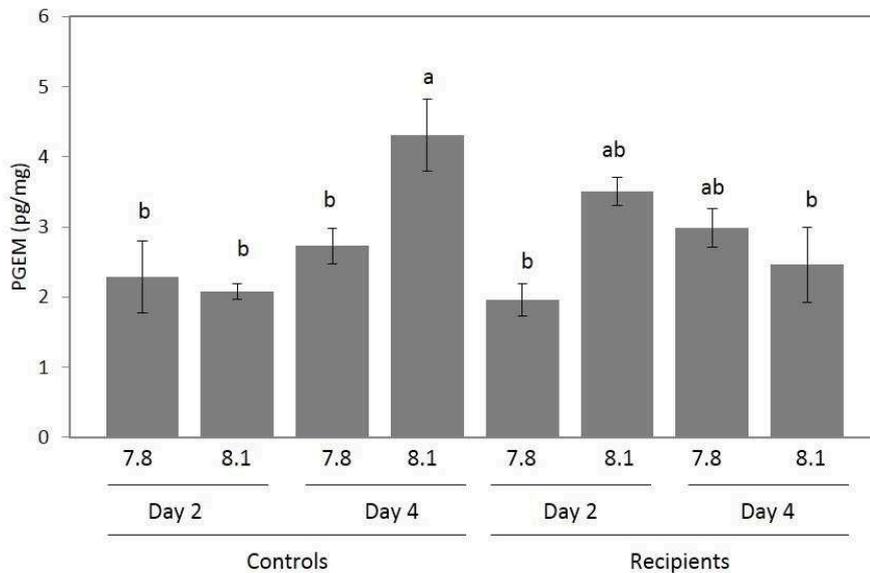


Fig.6: Prostaglandin E₂ as a function of pH x infection x time. Data are means \pm SE between replicates and are expressed in pg mg⁻¹ of fresh weight. Letters indicate significant differences.

Discussion

This study is the first to show that pH modulates the interaction between a marine bivalve and a virus. The survival of oysters exposed to OsHV-1 at pH 7.8 was lower (33.5%) than that of their counterparts at pH 8.1 (44.8%). Our results are in agreement with the hypothesis that at low pH bivalves have a reduced capacity to fight pathogens (Matozzo et al. 2012, Wang et al. 2016).

Levels of OsHV-1 DNA were similar in oysters infected at both pH treatments, suggesting that pH had no effect on virus infectivity. Although some viruses are inactivated when pH is below 7 (Børshheim

1993, Chang et al. 1998, Traving et al. 2014), the direct effects of pH on marine viruses require further investigations (Mojica & Brussaard 2014). It is suggested that the effect of pH on host-virus interactions mostly reflect the effect on the host organisms rather than effects on the virus (Danovaro et al. 2011). We therefore hypothesize that the difference in oyster survival between pH may reflect changes in the host.

There was no consistent difference in energetic reserves of oysters at both pH treatments. Low pH increased carbohydrates content whereas TAG/ST remained similar at both pH. The unsaturation index of membrane lipids, which is an index of basal metabolic rate (Hulbert & Else 1999), increased only marginally at low pH. This agrees well with the fact that oysters maintain their carbohydrate and lipid reserves at low pH by restructuring the proteome (Timmins-Schiffman et al. 2014). Maintain homeostasis is essential to adapt and tolerate stress but this can put strains on mechanisms involved in energy acquisition, conversion and conservation (Sokolova 2011, Sokolova et al. 2012). Maintenance of energetic reserves in oysters does not rule out the possibility of energetic cost of pH acclimation.

More interestingly, activity of SOD, which increased at day 4 in response to OsHV-1, was lower in oysters at pH 7.8 than at pH 8.1, regardless of infection status. This may reflect a lower production of reactive oxygen species (ROS) and consequently a lower capacity to neutralize pathogens at pH 7.8. Infected oysters at pH 8.1 showed an early increased in iNOS activity, but this was not observed in infected oysters at pH 7.8. Given that increasing iNOS activity generally coincides with increasing RNS production to neutralize pathogens (Donaghy et al. 2015), maintenance of iNOS activity at a basal level at pH 7.8 may reflect absence of this type of immune response. These two results suggest that low pH may have impaired the defence against pathogens.

Activities of SOD and GST in oysters exposed to OsHV-1 increased during the time course of infection, as previously reported for other bivalve species and diseases (Canesi et al. 2010, Genard et al. 2013), suggesting that oysters responded to infection by producing ROS.

Activities of SOD and GST were modulated by pH and infection, suggesting that these factors influenced the production of ROS. These ROS can peroxidise membrane lipids (Hermes-Lima 2004, Manduzio et al. 2005). However, the unsaturation index of membrane lipids, which is also viewed as a peroxidation index (Hulbert 2003), remained similar in oysters regardless of pH and infection. This suggests that oysters were able to cope with low pH and OsHV-1 to maintain membrane lipids.

Although eicosanoids are produced from twenty carbons polyunsaturated fatty acids to control inflammation or immunity during pathogen exposure in mammals and invertebrates (Stanley & Howard 1998), there was no consistent effect of pH or infection on Prostaglandin E₂ Metabolite and 20:4n-6 in oysters. It is likely that the level of stress induced in our experiment was not sufficient to enhance prostaglandin production in oysters.

In our study, the lower survival of oysters infected by OsHV-1 at pH 7.8 compared to pH 8.1 reflect antioxidant and immune responses of the host instead of a change in the virus. Low pH induced only subtle changes in the host physiology and its survival to pathogen. However, these effects may be exacerbated by elevated temperatures representative of climate change and interaction between pH and temperature on disease susceptibility of marine animals needs further investigations.

Acknowledgement

We are grateful to Marin Protat and Anaïs Guyon for their technical assistance, Pierrick le Souchu for assistance with the experimental set-up, the Ifremer staff involved in oyster and algae production at Argenton, Valérian Le Roy for biochemical analyses and Flavia Nunes for comments on the manuscript. This work was supported by the GIGASSAT project funded by ANR-AGROBIOSPHERE No. ANR-12-AGRO-0001-01 (www.gigassat.org).

Author contributions

M.F, F.P, B.P designed the experiment and M.F and B.P carried out the experiment. G.R and C.Q carried out the biochemical analyses. M.F and F.P. carried out the statistical analyses. M.F and F.P wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M-A (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2-10
- Beesley A, Lowe DM, Pascoe CK, Widdicombe S (2008) Effects of CO₂-induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. *Clim Res* 37:215-225
- Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J, Pipe R (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biol* 2:67-74
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Børshiem KY (1993) Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* 11:141-159
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365-365
- Canesi L, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P, Gallo G (2010) Effects of *Vibrio* challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152:399-406
- Chang P-S, Chen L-J, Wang Y-C (1998) The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166:1-17
- Cox DR (1972) Regression Models and Life Tables. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 20:187-220
- Cribb AE, Leeder JS, Spielberg SP (1989) Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 183:195-196
- Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT, Suttle CA (2011) Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol Rev* 35:993-1034
- Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C, Choi K-S (2015) The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 42:91-97
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Ellis RP, Widdicombe S, Parry H, Hutchinson TH, Spicer JI (2015) Pathogenic challenge reveals immune trade-off in mussels exposed to reduced seawater pH and increased temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 462:83-89
- Gazeau F, Parker LM, Comeau S, Gattuso JP, O'Connor WA, Martin S, Portner HO, Ross PM (2013) Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Mar Biol* 160:2207-2245
- Genard B, Miner P, Nicolas JL, Moraga D, Boudry P, Pernet F, Tremblay R (2013) Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *Plos One* 8
- Hermes-Lima M (2004) *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Inc.

- Hu MH, Li LS, Sui YM, Li J, Wang YJ, Lu WQ, Dupont S (2015) Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology* 46:573-583
- Hulbert AJ (2003) Life, death and membrane bilayers. *J Exp Biol* 206:2303-2311
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol* 199:257-274
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481
- Kraffe E, Soudant P, Marty Y (2004) Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39:59-66
- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, Hendriks IE, Ramajo L, Singh GS, Duarte CM, Gattuso J-P (2013) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob Change Biol* 19:1884-1896
- Le Bris C, Richard G, Paillard C, Lambert C, Segueineau C, Gauthier O, Pernet F, Guerard F (2015) Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*-Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol* 42:16-24
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253-278
- Li SG, Liu YJ, Liu C, Huang JL, Zheng GL, Xie LP, Zhang RQ (2015) Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. *Fish Shellfish Immunol* 45:194-202
- MacLeod CD, Poulin R (2016) Parasitic infection: a buffer against ocean acidification? *Biol Lett* 12
- Malagoli D, Ottaviani E (2005) Cytotoxicity as a marker of mussel health status. *J Mar Biol Assoc UK* 85
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2:91-104
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Ecol* 163:221-234
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG (2012) First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *Plos One* 7
- McFarland VA, Inouye LS, Lutz CH, Jarvis AS, Clarke JU, McCant DD (1999) Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:236-241
- Mojica KDA, Brussaard CPD (2014) Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiol Ecol* 89:495-515
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, Portner HO, Scanes E, Wright JM (2013) Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology* 2:651-692
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269-276
- Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Degremont L, Lagarde F, Pepin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact* 2:215-237

- Pernet F, Lagarde F, Jeanne N, Daigle G, Barret J, Le Gall P, Quere C, D'Orbcastel ER (2014) Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *Plos One* 9
- Pernet F, Lupo C, Bacher C, Whittington RJ (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Phil Trans R Soc Lon B Biol Sci*
- Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015a) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* 6:205-222
- Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015b) *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* 6
- Pipe RK, Porte C, Livingstone DR (1993) Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 3:221-233
- Range P, Chicharo MA, Ben-Hamadou R, Pilo D, Fernandez-Reiriz MJ, Labarta U, Marin MG, Bressan M, Matozzo V, Chinellato A, Munari M, El Menif NT, Dellali M, Chicharo L (2014) Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Reg Environ Change* 14:S19-S30
- Richard G, Guerard F, Corporeau C, Lambert C, Paillard C, Pernet F (2016) Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Dev Comp Immunol* 60:96-107
- Segarra A, Pepin JF, 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
- Seguineau C, Racotta IS, Palacios E, Delaporte M, Moal J, Soudant P (2011) The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 160:87-93
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219
- Smith WL, Murphy RC (2002) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoyxygenase, and epoxygenase pathways. *New Comprehensive Biochemistry*, Book 36. Elsevier
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* 79:1-15
- Sokolova IM, Sukhotin, A. A. and Lannig, G. (2011) Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*
- Stanley D, Howard R (1998) The biology of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates: Cellular, organismal and ecological actions. *Am Zool* 38:369-381
- Timmins-Schiffman E, Coffey WD, Hua W, Nunn BL, Dickinson GH, Roberts SB (2014) Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics* 15:1-18
- Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina AV, Beniash E, Sokolova IM (2011) Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J Exp Biol* 214:1836-1844
- Traving SJ, Clokie MR, Middelboe M (2014) Increased acidification has a profound effect on the interactions between the cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803 and its viruses. *FEMS Microbiol Ecol* 87:133-141

Wang Q, Cao RW, Ning XX, You LP, Mu CK, Wang CL, Wei L, Cong M, Wu HF, Zhao JM (2016) Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 49:24-33

Webb SC, Fidler A, Renault T (2007) Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272:126-139

2.2 Informations supplémentaires

Table S1: Odds of oyster mortality as a function of pH. Custom hazard ratios were produced with exponentiated contrasts. The table also contains the standard error (SE) of the hazard ratio estimate and the confidence interval (CI) of the hazard ratio, the Wald χ^2 statistic and the resulting p-value. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Contrast variables	Odds ratio	SE	95% CI	Wald χ^2	p
8.1 vs 7.8	1.37	0.10	1.12-1.68	3.08	0.002

Table S2: Split-plot ANOVA investigating the effect of pH, exposure to the source of infection, time and their interactions on the level of OsHV-1 DNA in oyster tissues. Data were log (x+1) transformed. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	F	p
Mainplot			
pH	1	0.42	0.537
Infection	1	42.96	< 0.001
pH x Infection	1	0.53	0.488
Error a: Tank x pH x Infection	8		
Subplot			
Time	1	6.12	0.039
pH x Time	1	0.03	0.858
Infection x Time	1	4.07	0.078
pH x Infection x Time	1	0.10	0.764
Error b: Tank x pH x Infection x Time	8		

Table S3: Amount of OsHV-1 DNA (number of copies per mg of dry weight) in oyster tissues. Values are the mean of triplicate analyses expressed as mean \pm SE.

	Controls 7.8		Controls 8.1		Recipients 7.8		Recipients 8.1	
	Day 2	Day 4						
	6.2×10^3	4.8×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	5.9×10^9	5.0×10^9	7.9×10^8	2.5×10^9
OsHV-1	±	±	±	±	±	±	±	±
	2.2×10^3	4.4×10^4	1.6×10^4	1.0×10^4	5.9×10^9	9.9×10^8	7.9×10^8	1.6×10^9

Table S4: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of pH, exposure to the source of infection and their interactions on the proximate composition of oysters. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold. Abbreviation: TAG-ST, ratio between triglycerides and sterols.

Source of variation	d.f	Carbohydrate		TAG-ST		Proteins	
		F	p	F	p	F	p
Mainplot							
pH	1	6.32	0.036	1.75	0.222	0.13	0.725
Infection	1	0.02	0.884	0.14	0.720	8.10	0.022
pH x Infection	1	0.37	0.560	1.82	0.214	1.23	0.300
Error a: Tank x pH x Infection	8						
Subplot							
Time	1	0.56	0.477	0.02	0.902	0.03	0.877
pH x Time	1	0.03	0.875	1.10	0.325	0.21	0.663
Infection x Time	1	0.50	0.500	1.75	0.222	3.81	0.087
pH:Infection x Time	1	4.93	0.057	0.72	0.422	0.54	0.485
Error b: Tank x pH x Infection x Time	8						

Table S5: Content of carbohydrates (mg g⁻¹ of dry weight), TAG (relative to ST) and proteins (mg g⁻¹ of dry weight). Values are the mean of triplicate analyses expressed as mean ± SE.

	Controls 7.8		Controls 8.1		Recipients 7.8		Recipients 8.1	
	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4
Carbohydrates	45.9 ± 11.5	68.5 ± 9.5	50.0 ± 2.1	46.1 ± 3.4	68.4 ± 15.9	53.3 ± 3.8	38.1 ± 2.1	53.7 ± 2.8
TAG-ST	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.0	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.3
Proteins	152.9 ± 4.5	144.8 ± 17.5	175.3 ± 4.2	146.4 ± 23.7	128.1 ± 9.7	141.4 ± 9.0	119.7 ± 5.6	137.8 ± 5.3

Table S6: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of pH, exposure to the source of infection, time and their interactions on the antioxidant and immune related enzymes in oyster tissues. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold. Abbreviations: SOD, total superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, total glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione S-transferase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

Source of variation	d.f	SOD		CAT		GPx		GR		GST		iNOS		
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	
Mainplot														
pH	1	6.85	0.031	1.48	0.258	0.92	0.365	1.15	0.315	0.35	0.573	37.59	<	0.001
Infection	1	7.94	0.023	0.87	0.379	2.51	0.152	5.10	0.054	5.08	0.054	18.29		0.003
pH x Infection	1	0.01	0.935	0.11	0.754	0.52	0.491	2.25	0.172	0.04	0.844	9.18		0.016
Error a: Tank x pH x Infection	8													
Subplot														
Time	1	5.16	0.053	0.01	0.914	0.96	0.355	0.03	0.868	13.87	0.006	3.12		0.115
pH x Time	1	0.01	0.913	0.08	0.787	0.20	0.663	1.10	0.325	1.65	0.235	0.68		0.433
Infection x Time	1	23.35	0.001	1.36	0.277	0.80	0.396	5.98	0.040	11.78	0.009	10.49		0.012
pH x Infection x Time	1	1.28	0.290	3.33	0.106	1.73	0.225	4.21	0.074	2.49	0.154	12.14		0.008
Error b: Tank x pH x Infection x Time	8													

Table S7: Activities of antioxidant and immune related enzymes. Values are the mean of triplicate analyses expressed as mean \pm SE. Abbreviations: SOD, total superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, total glutathion peroxidase; GR, glutathion reductase; GST, glutathione-S-transferase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

Enzymes	Controls 7.8		Controls 8.1		Recipients 7.8		Recipients 8.1	
	Day 2	Day 4						
SOD (U/mg)	7.0 \pm 0.8	6.1 \pm 0.6	9.9 \pm 1.0	6.9 \pm 2.2	6.2 \pm 0.6	10.9 \pm 0.7	7.1 \pm 0.5	13.5 \pm 0.9
CAT (U/mg)	48.9 \pm 5.0	41.6 \pm 3.2	39.8 \pm 1.0	42.2 \pm 7.0	38.5 \pm 1.4	45.1 \pm 2.6	39.6 \pm 2.6	39.0 \pm 1.9
GPx (mU/mg)	1.1 \pm 0.0	2.0 \pm 0.2	1.31 \pm 0.3	1.6 \pm 0.9	1.6 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3	1.1 \pm 0.6
GR (mU/mg)	6.9 \pm 0.7	8.1 \pm 0.9	5.7 \pm 0.8	8.6 \pm 1.4	7.8 \pm 1.1	8.4 \pm 1.4	12.2 \pm 1.1	7.9 \pm 1.3
GST (mU/mg)	12.9 \pm 4.1	7.4 \pm 0.5	7.5 \pm 0.3	14.3 \pm 6.3	6.0 \pm 0.5	22.1 \pm 3.0	8.2 \pm 1.0	23.0 \pm 0.5
iNOS (mU/mg)	10.4 \pm 2.0	9.1 \pm 0.7	9.9 \pm 2.1	14.5 \pm 0.5	11.1 \pm 1.6	10.3 \pm 0.8	23.2 \pm 1.5	13.0 \pm 0.5

Table S8: Composition of fatty acids from polar lipids in oysters, expressed as the percentage of total fatty acids content. Values are the mean of triplicate analyses expressed as mean % \pm SE. Abbreviation: DMA, diméthyl acetal; NMI, non-methylene-interrupted fatty acids, UI; unsaturation index.

FA	Controls 7.8		Controls 8.1		Recipients 7.8		Recipients 8.1	
	Day 2	Day 4						
14:0	1.93 \pm 0.09	1.97 \pm 0.18	1.93 \pm 0.03	2.23 \pm 0.03	1.5 \pm 0.06	2 \pm 0.1	1.93 \pm 0.12	2.1 \pm 0.12
16:00	10.3 \pm 0.12	10.13 \pm 0.15	10.03 \pm 0.15	10.3 \pm 0.06	9.73 \pm 0.22	10 \pm 0.15	10.27 \pm 0.22	10.3 \pm 0.25
16:1n-7	1.87 \pm 0.03	2.03 \pm 0.09	1.73 \pm 0.03	2.13 \pm 0.03	1.77 \pm 0.09	2 \pm 0.15	1.9 \pm 0.06	2.03 \pm 0.22
18:0 DMA	10.2 \pm 0.26	10.63 \pm 0.15	9.83 \pm 0.3	10.63 \pm 0.09	10.4 \pm 0.79	10.37 \pm 0.44	10.13 \pm 0.22	9.67 \pm 0.62
18:0	3.23 \pm 0.12	3.53 \pm 0.19	3.57 \pm 0.12	3.5 \pm 0.06	3.67 \pm 0.03	3.63 \pm 0.09	3.7 \pm 0.06	3.5 \pm 0.23
18:1n-9	5.93 \pm 0.07	5.83 \pm 0.07	5.17 \pm 0.13	5.63 \pm 0.03	5.77 \pm 0.03	5.7 \pm 0.12	5.7 \pm 0.12	6 \pm 0.21
18:2n-7	2.03 \pm 0.09	1.9 \pm 0.06	1.7 \pm 0	1.73 \pm 0.03	1.97 \pm 0.03	1.8 \pm 0.1	1.93 \pm 0.07	1.8 \pm 0.15
18:3n-3	1.43 \pm 0.09	1.33 \pm 0.03	1.23 \pm 0.03	1.17 \pm 0.03	1.33 \pm 0.12	1.27 \pm 0.03	1.3 \pm 0.06	1.23 \pm 0.07
18:4n-3	1.53 \pm 0.03	1.57 \pm 0.03	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.06	1.37 \pm 0.03	1.43 \pm 0.07	1.4 \pm 0	1.33 \pm 0.12
20 NMI	0.60 \pm 0.00	0.57 \pm 0.03	0.70 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	0.63 \pm 0.03	0.63 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03	0.63 \pm 0.03
20:1 DMA	3.17 \pm 0.03	3.17 \pm 0.09	3.37 \pm 0.09	3.2 \pm 0.06	3.27 \pm 0.2	3.3 \pm 0.29	3.17 \pm 0.09	3.13 \pm 0.19
20:1n-11	2.1 \pm 0.1	2.23 \pm 0.03	2.23 \pm 0.03	2.33 \pm 0.03	2.47 \pm 0.03	2.27 \pm 0.03	2.23 \pm 0.03	2.2 \pm 0.15
20:1n-7	4.47 \pm 0.09	4.43 \pm 0.09	4.77 \pm 0.03	4.3 \pm 0.06	4.7 \pm 0.12	4.7 \pm 0.1	4.6 \pm 0.12	4.67 \pm 0.03
20:4n-6	7.53 \pm 0.07	7.83 \pm 0.09	9.07 \pm 0.18	8.1 \pm 0.17	7.73 \pm 0.2	8.2 \pm 0.23	7.7 \pm 0.1	8.17 \pm 0.15
20:5n-3	7.27 \pm 0.19	7.17 \pm 0.09	6.27 \pm 0.07	6.87 \pm 0.03	7.07 \pm 0.18	6.57 \pm 0.09	7.17 \pm 0.28	6.93 \pm 0.09
22 NMI	6.37 \pm 0.09	6.53 \pm 0.12	6.50 \pm 0.06	6.53 \pm 0.03	6.60 \pm 0.10	6.87 \pm 0.22	6.50 \pm 0.06	6.50 \pm 0.25
22:5n-6	3.7 \pm 0.06	3.67 \pm 0.03	3.53 \pm 0.03	3.7 \pm 0	3.7 \pm 0.06	3.7 \pm 0	3.6 \pm 0.06	3.6 \pm 0.1
22:6n-3	16.4 \pm 0.12	16.3 \pm 0.15	15.23 \pm 0.37	16.1 \pm 0	16.43 \pm 0.37	16.33 \pm 0.18	15.87 \pm 0.44	15.97 \pm 0.23
UI	271.30 \pm 1.59	270.23 \pm 0.52	265.77 \pm 2.28	267.50 \pm 0.17	270.67 \pm 4.01	269.40 \pm 1.55	265.90 \pm 4.43	265.27 \pm 1.30

Table S9: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of pH, exposure to the source of infection, time and their interactions on the membrane fatty acids.

Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold. Abbreviations: NMI; non-methyl interrupted, DMA; dimethyl acetate.

		14:0		16:0		16:1n-7		18:0 DMA		18:0		18:1n-9		18:1n-7		18:2n-7	
Source of variation	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Mainplot																	
pH	1	8.86	0.018	1.53	0.251	0.20	0.668	1.66	0.233	0.39	0.549	9.09	0.017	4.07	0.079	4.92	0.057
Infection	1	3.94	0.083	0.62	0.454	0.05	0.830	0.50	0.498	4.35	0.071	36.36	< 0.001	2.72	0.138	0.31	0.594
pH x Infection	1	0.99	0.350	2.48	0.154	0.44	0.524	0.34	0.578	1.57	0.246	29.46	0.001	10.89	0.011	3.77	0.088
Error a: Tank x pH x Infection	8																
Subplot																	
Time	1	10.84	0.011	1.22	0.301	9.01	0.017	0.30	0.601	0.00	1.000	12.19	0.008	5.49	0.047	3.60	0.094
pH x Time	1	0.05	0.832	0.31	0.596	0.18	0.679	0.00	0.962	1.75	0.222	4.76	0.061	13.29	0.007	0.90	0.371
Infection x Time	1	1.21	0.304	0.31	0.596	0.41	0.538	1.65	0.234	1.34	0.280	12.19	0.008	0.27	0.617	0.90	0.371
pH x Infection x Time	1	3.90	0.084	3.39	0.103	1.15	0.315	0.35	0.569	0.25	0.633	15.43	0.004	0.61	0.457	0.40	0.545
Error b: Tank x pH x Infection x Time	8																
		18:3n-3		18:4n-3		20:1 DMA		20:1n-11		20:1n-7		20:4n-6		20:5n-3		22:5n-6	
Source of variation	d.f	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Mainplot																	
pH	1	9.94	0.014	4.90	0.058	0.01	0.907	1.73	0.225	0.02	0.902	15.72	0.004	2.48	0.154	9.09	0.017
Infection	1	0.06	0.815	1.60	0.242	0.01	0.907	0.11	0.751	7.11	0.029	2.81	0.132	0.10	0.761	0.00	1.000
pH x Infection	1	4.77	0.061	2.50	0.153	3.26	0.109	6.92	0.030	1.31	0.286	18.23	0.003	11.15	0.010	0.36	0.563
Error a: Tank x pH x Infection	8																
Subplot																	
Time	1	1.80	0.217	0.67	0.438	0.09	0.767	0.00	1.000	4.02	0.080	0.34	0.574	0.77	0.407	0.55	0.479
pH x Time	1	0.02	0.885	0.17	0.694	0.18	0.680	5.60	0.046	2.88	0.128	7.76	0.024	13.14	0.007	1.24	0.298
Infection x Time	1	0.02	0.885	0.67	0.438	0.09	0.767	0.46	0.518	6.88	0.031	12.39	0.008	21.39	0.002	0.55	0.479

pH x Infection x Time	1	0.02	0.885	1.50	0.256	0.03	0.859	1.03	0.340	5.36	0.049	7.76	0.024	2.64	0.143	1.24	0.298
Error: Tank x pH x Infection x Time	8																

Source of variation	d.f	22:6n-3		Banched		20 NMI		22 NMI		UI	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Mainplot											
pH	1	10.17	0.013	1.78	0.219	0.80	0.397	1.12	0.320	6.47	0.035
Infection	1	0.62	0.455	7.11	0.029	0.00	1.000	2.88	0.128	0.28	0.612
pH:Infection	1	0.36	0.565	4.00	0.081	7.20	0.028	3.64	0.093	0.01	0.928
Error a: Tank x pH x Infection	8										
Subplot											
Time	1	0.90	0.370	0.15	0.710	0.80	0.397	1.07	0.331	0.03	0.866
pH x Time	1	2.09	0.186	0.00	1.000	0.00	1.000	0.79	0.401	0.24	0.641
Infection x Time	1	0.90	0.370	0.59	0.464	7.20	0.028	0.02	0.886	0.13	0.726
pH:Infection x Time	1	0.90	0.370	0.15	0.710	3.20	0.111	0.09	0.775	0.09	0.767
Error b: Tank x pH x Infection x Time	8										

Table S10: Results of the split-plot ANOVA investigating the effect of pH, exposure to the source of infection and their interactions on prostaglandin E2 in oyster tissues. Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

Source of variation	d.f	F	p
Mainplot			
pH	1	3.87	0.085
Infection	1	0.16	0.700
pH x Infection	1	0.08	0.783
Error: Tank x pH x Infection	8		
Subplot			
Time	1	11.05	0.010
pH x Time	1	0.12	0.741
Infection x Time	1	11.62	0.009
pH x Infection x Time	1	23.39	0.001
Error: Tank x pH x Infection x Time	8		

Table S11: Amount of prostaglandin E2 metabolite (pg mg⁻¹ of fresh weight) in oyster tissues. Values are the mean of triplicate analyses expressed as mean \pm SE.

	Controls 7.8		Controls 8.1		Recipients 7.8		Recipients 8.1	
	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4	Day 2	Day 4
PGEM	2.3 \pm 0.5	2.7 \pm 0.3	2.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.5	2.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3	3.5 \pm 0.2	2.5 \pm 0.5

File S1

Carbohydrates

Samples of 300 mg of powder were homogenized in 3 ml of Milli-Q water using a Polytron® PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland) and diluted 10 times. Carbohydrates concentrations were determined according to Dubois (1956). Samples (250 µl) were mixed with phenol (500 µl; 5% m/v), and sulfuric acid (2500 µl; 98%). After incubation at room temperature, absorbance was measured at 490 nm with a UV 941 spectrophotometer (Kontron instruments, San Diego, California, USA). Carbohydrates concentrations of samples were determined using a standard calibration curve of glucose ranging from 0.01 to 0.4 mg ml⁻¹. Results were expressed as mg of carbohydrates per g of dry weight.

Lipids and Fatty acids

Neutral lipid class determination

Oyster powder aliquots (300 mg) were homogenized in 6 ml chloroform-methanol (2:1, v/v) according to Folch et al. (1957), then sonicated and stored at -20°C until analyses. For determination of neutral lipid classes, samples were spotted on activated silica plates using a CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland) and plates were eluted in hexane-diethylether acetic acid (20:5:0.5 v/v/v) followed by hexane-diethylether (97:3, v/v). Lipid classes appeared as black spots after plates were dipped in a CuSO₄-H₃PO₄ solution and heated. Plates were read by scanning at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG, Switzerland). Five neutral lipid classes (free fatty acids [FFA], alcohols [AL], mono-diacylglycerols [DG-MG], triacylglycerols [TAG], and sterols [ST]). Since TAG are mainly reserve lipids and ST are structural constituents of cell membranes, we used the TAG-ST ratio as an index of the relative contribution of reserve to structure.

Fatty acid composition of polar lipids

Polar lipids were extracted using a silica gel micro column (Marty et al. 1992). Aliquots of samples were evaporated until dryness and were recovered with three 500 μ l washings of chloroform:methanol (98:2, v/v). Samples were then placed on the top of a silica gel micro column (30 \times 5 mm internal diameter; Kieselgel; 70–230 mesh [Merck, Lyon, France]; previously heated to 450 °C and deactivated with 5% water). The neutral lipids were removed with 10 ml of chloroform:methanol (98:2, v/v) and the polar lipids were recovered with 15 ml of methanol. A known amount of tricosanoic acid (23:0) was added to polar fraction as an internal standard. Fatty acids were transesterified with 10% of boron trifluoride–methanol at 100°C (Metcalf & Schmitz 1961). Then, 1 ml of hexane and 1 ml of Milli-Q water were added, and the organic phase containing fatty acid methyl esters was washed with 1 ml of water. The fatty acids were analyzed with a HP6890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA) by comparing their retention times with those of standards. Results are expressed as mole % of polar lipids.

Proteins and enzymes

Protein concentrations and enzyme activities were measured in triplicate (except for CAT and iNOS done in duplicate) using 96-well micro-plates (Greiner Bio One, Les Ullis, France), a POLARstar Omega micro-plate reader and MARS data analysis software (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). However, catalase activity was measured using quartz Hellma cuve 110 (Dominique Dutscher, Brumath, France) and a Libra S12 spectrophotometer (Biochrom, Cambourn, UK).

Proteins

Proteins were extracted from oyster powder in two different ice-cold lysis buffers to exclude the risk of interferences with assays buffers and with enzymatic activities, as described in (Richard et al. 2016). A ratio of 0.2 mg μ l⁻¹ of oyster powder was homogenized in extraction buffers with a Polytron® PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland). The extraction buffer used prior to study SOD, and GPx

consisted in a mix of 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.5 % Igepal, 1 tablet of complete EDTA free protease inhibitor cocktail in 25 ml of buffer and the phosphatase inhibitor cocktail III, all at a pH 7.4 (Corporeau et al. 2012). The extraction buffer used prior to study CAT, GR, GST, iNOS consisted in Phosphate buffered saline (PBS 10 mM; Sigma-Aldrich), EDTA (1 mM) and Triton® X-100 (0.1%; Sigma-Aldrich) (Richard et al. 2016). Homogenates were centrifuged twice at 4000 rpm for 1 h at 4°C and at 11700 rpm for 45 min at 4°C to eliminate the lipid fraction of the samples, using GR412 and MR22 Jouan centrifuges, respectively (Corporeau et al. 2014). The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analyses. Protein concentrations were then quantified following according to Bradford (1976) with the Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France). Absorbance was read at 595 nm and protein concentrations were determined by comparison with a calibration curve of Bovine Serum Albumin. Results are expressed as mg of proteins per g of dry weight.

Antioxidant and immune related enzymes

Total activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed using a SOD assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) according to a modified procedure (Le Bris et al. 2015). Protein supernatants (20 µl) were mixed with Water-Soluble Tetrazolium salt (200 µl; WST-1) and with xanthine oxidase (20 µl; XO) and xanthine mix, to initiate the reaction.

After a 20 min incubation at 25 °C, absorbance was read at 450 nm. The activity of SOD was determined by comparison with a standard inhibition curve performed using SOD from bovine erythrocytes. Results are expressed in U mg⁻¹ protein, where one unit is the amount of enzyme necessary to inhibit 50% of the xanthine/ XO complex.

The activity of catalase (CAT; EC 1.11.1.6) was assayed according to Aebi (1984). Protein supernatants (8 µl) were mixed with a 10 mM hydrogen peroxide solution (792 µl). The kinetic of CAT activity was assayed monitoring the decrease in H₂O₂ concentration every 9 s for 90 s at 240 nm. Results

are expressed in U mg⁻¹ protein, where one unit is the amount of enzyme necessary to catalyze 1 μmole of H₂O₂ per minute.

The activity of the total Glutathione Peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) was assayed according to (McFarland et al. 1999). Protein supernatants (50 μl) were mixed with assay buffer (200 μl; 62.5 mM Phosphate Buffer, 6.25 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 2.5 U/mL GR, 0.5mM NADPH and 1.875 mM Cumene Hydroperoxide) to trigger the reaction. Kinetic of GPx activity was assayed monitoring the NADPH decrease for 3 min at 25°C at 340 nm. The blank consisted of extraction buffer instead of sample and its absorbance was subtracted from that of the samples. Results are reported in mU mg⁻¹ protein, where one unit is the amount of enzyme necessary for oxidizing 1 μmole of NADPH per min.

Glutathione Reductase (GR, EC 1.8.1.7) was assessed following (Cribb et al. 1989). Protein supernatants (20 μl) were mixed with assay buffer (170 μl; 100mM Sodium Phosphate Buffer, 0.7mM NADPH, 0.09 mM DTNB, 0.2 mM GSSG). Kinetics of GR activity was assayed monitoring the production of TNB during 3 min at 412 nm. The blank consisted of extraction buffer instead of sample and its absorbance was subtracted from that of the samples. Results are expressed in mU mg⁻¹ protein, where one unit is the amount of enzyme catalyzing 1 μmole of DTNB per min.

Glutathione-S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18) was measured following (McFarland et al. 1999). Protein supernatants or extraction buffer (15 μl) were mixed with assay buffer (200 μl; 200 mM Phosphate Buffer, 1 mM CDNB, 1 mM GSH) to trigger the reaction. Kinetics of GST activity was assayed monitoring the production of the conjugate between GSH and CDNB for 3 min at 340 nm. Absorbance of the blank was subtracted from that of the samples. Results are reported in mU mg⁻¹ protein where one unit being defined as the amount of enzyme catalyzing 1 μmole of CDNB per min.

The inducible Nitric Oxide Synthase activity (iNOS, EC 1.14.13.39) was assayed according to the non-radioactive method developed by Richard et al. (2016). Protein supernatants (55 μl) were mixed with assay buffer (5 μl; 20 mM Tris buffer at pH 7.4, 1 mM NADPH, 1 mM L-Arginine, 10 μM 5,6,7,8-

tetrahydrobiopterin , 5 μ M FAD⁺) and incubated for 30 min at 37°C. To assess iNOS activity alone, samples and blanks were also incubated with assay buffer containing L-NMMA (200 μ M), a specific inhibitor of iNOS. Reactions were stopped by addition of a color developing reagent (200 μ l; COLDER) and samples, standards and blanks were incubated at 95°C for 15 min. The activity of iNOS was assayed looking at the production of L-citrulline after a 10 min incubation at room temperature by reading absorbance at 530 nm. Absorbance of the blank and of samples incubated with L-NMMA was subtracted from that of the samples. The activity of iNOS was finally determined by comparison with a standard curve performed using iNOS from mouse. Results are expressed in mU mg⁻¹ protein where a unit is the amount of enzyme necessary to produce 1 μ mole of L-citrulline per min.

Prostaglandins

In vivo, PGE₂ is converted to Prostaglandin E₂ Metabolite (PGEM). PGEM was assayed using the PG screening EIA Kit (Cayman Chemical No. 514531, Ann Arbor, MI, USA) according to a modified procedure (Seguineau et al. 2011). The assay is based on the competition between PGEM and PGEM-acetylcholinesterase (AChE) conjugate (tracer) for a limited amount of PGEM-specific rabbit antiserum binding sites. The tracer concentration is held constant but not the free PGEM concentration from sample. The amount of PGEM from the tracer bound is inversely proportional to free PGEM. Firstly, samples were purified on C-18 SPE cartridges (Waters, Milford, MA, USA). A tissue aliquot (20 mg) was mixed in water (500 μ l) and incubated at 4 °C for 5 min with ethanol (2 ml), and centrifuged at 1000 g for 10 min to precipitate proteins. Supernatants and standards were put in wells coated with mouse monoclonal antibodies against rabbit antibodies. Specific rabbit antibodies against PGEM and tracers consisting of acetylcholinesterase (AChE) coupled to PGEM were added, and plates were incubated for 18 h. After washings, Ellman's reagent (substrate and chromogen) was added to measure AChE activity by reading absorbance at 415 nm with a microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, Bio-Tek Instrument, USA).

Absorbance is proportional to the amount of PGEM from the tracer bound to the well, which is inversely proportional to free PGEM from sample. Results are expressed in pg mg^{-1} of tissue wet mass.

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Corporeau C, Tamayo D, Pernet F, Quere C, Madec S (2014) Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J. Proteomics* 109:176-187
- Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Huvet A, Madec S (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 75:5554-5563
- Cribb AE, Leeder JS, Spielberg SP (1989) Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 183:195-196
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509
- Le Bris C, Richard G, Paillard C, Lambert C, Segueineau C, Gauthier O, Pernet F, Guerard F (2015) Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*-Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol* 42:16-24
- McFarland VA, Inouye LS, Lutz CH, Jarvis AS, Clarke JU, McCant DD (1999) Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:236-241
- Richard G, Guerard F, Corporeau C, Lambert C, Paillard C, Pernet F (2016) Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Dev Comp Immunol* 60:96-107
- Segueineau C, Racotta IS, Palacios E, Delaporte M, Moal J, Soudant P (2011) The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Phys. A* 160:87-93

3 Complément d'étude

En complément de la quantification d'ADN d'OsHV-1 faite sur les échantillons d'huîtres lors de l'expérience 3, des mesures d'expression de 4 gènes d'OsHV-1 (ORF72, ORF75, ORF87 et ORF117, présenté dans l'article 1) ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1 et la Figure 21.

Tableau 1: ANOVA sur les effets du pH de l'infection et de leur interaction sur l'expression de 4 gènes d'OsHV-1 dans les tissus d'huîtres. Les p-values significatives ($p < 0.05$) sont en gras.

Source de variation	d.f	ORF72		ORF75		ORF87		ORF117	
		F	p	F	p	F	p	F	p
pH	1	0.41	0.542	0.95	0.359	0.47	0.514	0.78	0.404
Infection	1	13.40	0.006	14.54	0.005	14.20	0.005	17.86	0.003
pH x Infection	1	0.35	0.569	1.15	0.315	0.33	0.581	0.49	0.505
Error : Bac x pH x Infection	8								

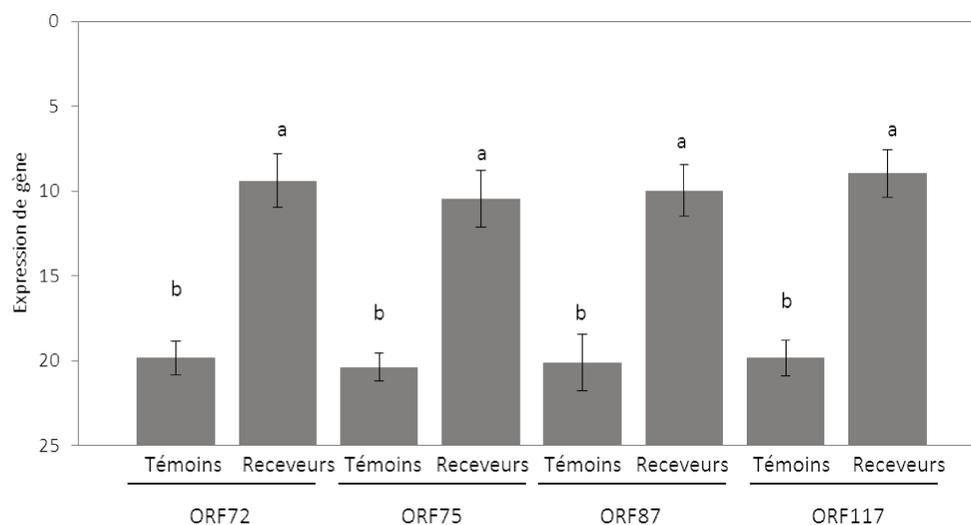


Figure 21: Expression de 4 gènes d'OsHV-1 dans les tissus d'huîtres en fonction de l'infection et du pH (8.1 vs 7.8)

L'expression des gènes d'OsHV-1, comme la quantification d'ADN viral (Article 3), ne dépend pas du pH, mais seulement du statut sanitaire des animaux (infectés ou non par la source infectieuse) (Tableau 1). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus pour la quantification d'ADN viral. Les

huîtres receveuses, qui sont connectées à la SI présentent plus de copies d'ADN viral (Article 3) et l'expression des gènes y est plus élevée que dans les huîtres témoins. Ce résultat renforce l'idée que le pH n'affecte pas l'infectiosité du virus OsHV-1.

Discussion générale et perspectives

1 La salinité et le pH modulent-ils la survie des huîtres à une infection par OsHV-1 ?

Nous avons vu que la salinité et le pH sont des facteurs de risque de la mortalité d'huîtres infectées par OsHV-1. La variabilité de la survie à l'infection est plus importante en fonction de la salinité qu'en fonction du pH où le différentiel de survie est subtil.

Dans l'environnement, les huîtres peuvent être soumises à de grandes variations de salinité, c'est pourquoi nous avons testé l'effet de 4 salinités sur l'infection de l'huître creuse par OsHV-1. Que les huîtres soient acclimatées à la salinité ou non préalablement à l'infection, leur survie (S) est classée de la manière suivante : $S_{15‰} > S_{35‰} > S_{25‰}$. En revanche, à 10‰ l'effet de l'acclimatation sur la survie des huîtres exposées à une source infectieuse est majeur. En effet, les huîtres acclimatées ont le plus fort taux de survie (95%) alors que les animaux non-acclimatés ont la plus faible survie (23%). Il y a donc un effet seuil de la salinité (entre 10 et 15‰) sur la physiologie de l'huître et sa réponse à un double stresser (choc osmotique et exposition à une source infectieuse).

Ce résultat peut être utile pour la profession ostréicole. Il montre en effet la nécessité d'une acclimatation aux conditions du milieu pour mieux survivre à une infection. **Ainsi, quelle que soit l'explication des différentiels de survie observés en fonction de la salinité, il n'est pas envisageable de traiter la mortalité de *C. gigas* par (i) l'application d'un choc hyposalin ou bien par (ii) le transfert des animaux dans des zones à plus faible salinité, comme cela est pratiqué pour gérer l'infection de l'huître *C. virginica* par ses parasites (Andrews & Wood 1967).**

Le pH est un paramètre qui fluctue dans les zones côtières et estuariennes en raison de l'activité biologique et de l'apport d'eau douce en provenance des bassins versants. Dans le contexte actuel de changement climatique, l'eau de mer s'acidifie, c'est pourquoi nous avons étudié les effets de deux pH (7.8 vs 8.1) sur l'infection de *C. gigas* par OsHV-1. Les huîtres infectées à pH 7.8 ont une survie finale 12%

plus faible que celles infectées à pH 8.1. Contrairement à la salinité, c'est dans la condition a priori stressante que les huîtres survivent le moins. Ce résultat suggère qu'à pH 7.8 l'infectiosité du virus a augmenté et/ou les huîtres sont plus sensibles à l'infection. La seule étude mesurant l'effet du pH sur la survie d'un bivalve à un agent pathogène, porte sur l'infection de la moule *M. edulis*, acclimatée pendant 90 jours à différentes conditions de pH (6.5 à 8.05), par la bactérie *V. tubiashii* (Ellis et al. 2015). L'exposition à la bactérie n'a pas provoqué de mortalité quelles que soient les conditions de pH. **Ainsi, il semble que les effets du pH sur les interactions hôte-pathogène soient subtils.**

L'étude de paramètres propres au virus ou à l'huître ont permis d'apporter des explications sur les différentiels de survie observés au cours des expériences.

2 La salinité et le pH ont-ils un effet sur l'infectiosité d'OsHV-1 ?

Nous avons clairement mis en évidence un effet de la salinité sur l'infectiosité d'OsHV-1, ce qui n'est pas le cas pour le pH.

Dans les tissus d'huîtres, qu'elles soient acclimatées ou non à la salinité, la quantité d'ADN viral et l'expression de gènes d'OsHV-1 à 10‰ sont inférieures à ce qui est observé dans les huîtres maintenues aux salinités supérieures. **Ainsi, l'infectiosité du virus OsHV-1 est réduite à 10%.** Ce qui est frappant, c'est **l'effet seuil de la salinité sur l'infectiosité du virus.** En effet, à 10‰ elle est réduite alors qu'à 15‰ l'infectiosité semble être la même qu'à 25 et 35‰. Bien qu'il ne s'agisse pas du même type d'agent pathogène, la prévalence de protozoaires (*Perkinsus* spp. et *Haplosporidium* spp.) est réduite par les faibles salinités (Soudant et al, 2013 et Arzul & Carnegie 2015, pour revues). Ces parasites ne sont pas capables de réguler leur volume cellulaire. Ainsi, le choc osmotique provoqué lors d'un changement de salinité endommage la structure même de la cellule.

Les effets de la salinité sur les virus marins portent surtout sur des bactériophages, peu d'études s'intéressent au virus d'eucaryotes (Mojica & Brussaard 2014, pour revue). Les capsides virales ont une perméabilité à l'eau et aux ions et d'importants changements osmotiques peuvent inactiver le virus ou provoquer la destruction de la particule virale (Mojica & Brussaard 2014, pour revue). Le virus OsHV-1 a une enveloppe lipidique et est donc potentiellement sensible aux modifications de forces ioniques (Mojica & Brussaard 2014, pour revue). De plus, les modifications de salinité peuvent affecter le succès d'infection de certains bactériophages en modulant la pression au sein de la capside, réduisant ainsi l'efficacité d'injection de l'ADN viral dans la cellule hôte (Mojica & Brussaard 2014, pour revue). Aussi, les différences de concentrations ioniques peuvent modifier l'adsorption du virus à son hôte. La salinité peut induire la mise en place d'un cycle lysogénique pouvant être le reflet d'une diminution du taux de croissance de l'hôte, mais qui peut aussi se produire indépendamment de celui-ci (Mojica & Brussaard 2014, pour revue). **Il peut alors être envisagé que le choc osmotique à 10‰ ait été tel qu'il ait altéré la structure de l'enveloppe ou de la capside d'OsHV-1, causant ainsi la réduction de son infectiosité.**

Le pH peut moduler la capacité des agents pathogènes à coloniser un hôte. La bactérie *V. tubiashii* infecte davantage les hémocytes de moules acclimatées à une eau de mer acidifiée que celles de moules à pH actuel (Asplund et al. 2014). Un pH réduit peut aussi limiter la transmission de plusieurs espèces de trématodes infectant des gastéropodes (MacLeod & Poulin 2015). Aussi, la diversité des microorganismes ainsi que leur abondance dans les tissus de moules dépendent du pH (Mackenzie et al. 2014).

Dans notre cas, les huîtres infectées à pH 7.8 et pH 8.1 ont la même quantité d'OsHV-1 et les mêmes expressions de gènes (Chapitre 3). Ainsi, nous n'avons pas mis en évidence d'effet du pH sur l'infectiosité du virus. Pour investiguer davantage l'effet du pH sur l'infectiosité du virus, une expérience complémentaire pourrait être envisagée. Elle consisterait à mettre des huîtres donneuses de virus dans un bassin dont le pH est de 8.1. L'eau de ce bassin servirait de source infectieuse (SI). La SI serait soit maintenue à pH 8.1, soit acidifiée à pH 7.8. Ensuite, le pH de la SI acidifiée serait augmenté à pH 8.1 par

l'ajout d'une base comme de la chaux éteinte. Il faudrait bien évidemment s'assurer de filtrer la solution de chaux afin d'éviter l'apport de particules sur lesquelles le virus OsHV-1 pourrait s'adsorber (Evans et al. 2014, Whittington et al. 2015b). La SI serait ensuite distribuée dans des bassins contenant des huîtres acclimatées à pH 8.1. Si un différentiel de survie d'huîtres est observé, cela s'expliquerait par l'effet du pH sur la SI. Au cours de l'expérience 3 (chapitre 3) nous avons testé ce dispositif. Toutefois le temps d'acidification de la SI était d'une à deux heures et cela nous a semblé insuffisant pour apporter des conclusions. De plus, il est nécessaire de contrôler les effets de la chaux sur les huîtres et sur la chimie des carbonates.

L'effet du pH sur les virus marins est peu connu (Cordova et al. 2003, Danovaro et al. 2011). L'hypothèse est que les effets du pH sur ces virus dépendent davantage des effets sur l'hôte (Danovaro et al. 2011).

Pour expliquer la cause de la perte d'infectiosité du virus OsHV-1 (ici à faible salinité) il aurait pu être envisagé d'utiliser une technique basée sur l'utilisation du monoazide de propidium (PMA), un intercalant de l'ADN (Ségarra 2014, Moreau et al. 2015). Cette technique permet de quantifier les capsides virales intègres. Le PMA pénètre seulement à l'intérieur des virus dont la capside est endommagée. Lorsque le PMA est exposé à une source lumineuse il se lie à l'ADN viral de manière covalente. Ainsi, l'ADN des virus ayant une capside intègre est amplifié par PCR en temps réel. Cette technique ne permet toutefois pas de connaître l'état de l'enveloppe virale. Un autre moyen d'observer l'état du virus dans les tissus d'huîtres aurait été l'observation de coupes de tissus par microscopie électronique à transmission.

3 La salinité et le pH modulent-ils la réponse métabolique de l'huître *Crassostrea gigas* à l'infection par OsHV-1 ?

Nous avons vu que certaines modifications du métabolisme de l'huître par la salinité et le pH pourraient expliquer les différentiels de survie, avec des spécificités pour chaque paramètre.

3.1 Métabolisme énergétique

Les niveaux des réserves glucidiques des huîtres acclimatées à 10-15‰ et à pH 7.8 sont respectivement plus élevés qu'à 25-35‰ et pH 8.1. Les réserves en triglycérides des huîtres sont quant à elles relativement constantes aux différentes salinités et au deux pH. La mobilisation des glucides aux faibles salinités s'explique par la réduction de l'activité de l'hexokinase, la première enzyme de la glycolyse.

Ainsi, à 10 et 15‰, les huîtres semblent utiliser moins d'énergie qu'à salinité faible. Or le risque de mortalité induite par OsHV-1 diminue lorsque les réserves énergétiques des huîtres sont plus élevées (Pernet et al, 2012, Pernet et al., 2014). **La moindre consommation des réserves en glucides par les huîtres à 10 et 15‰ pourrait expliquer le gain de survie lors d'une infection par OsHV-1 en comparaison à 25 et 35‰.**

La conservation des réserves glucidiques des huîtres aux salinités les plus faibles pourrait s'expliquer par la réduction de l'activité de filtration observée pendant la phase d'acclimatation. De plus, la diminution de l'activité de certaines enzymes à une faible salinité, comme ici l'hexokinase, pourrait permettre de maintenir une homéostasie métabolique et assurer le bon fonctionnement des organismes euryhalins (Ballantyne & Berges 1991). Le maintien d'une homéostasie énergétique à un pH réduit se fait par la mise en place de mécanismes de régulation (Timmins-Schiffman et al. 2014).

Le métabolisme des glucides semble être le premier modulé par des conditions sous-optimales, alors que le métabolisme des lipides apparaît plus résilient aux changements. Pour s'en assurer il faudrait étudier de manière plus précise le métabolisme des lipides en mesurant l'activité des enzymes impliquées dans la β -oxydation.

La réponse métabolique des organismes à une condition sous-optimale évolue dans le temps, il est alors nécessaire de prendre en compte la durée d'exposition aux facteurs environnementaux et ainsi de distinguer les effets des expositions à court terme de celles à plus long terme. De plus, les mécanismes mis en place lors d'un changement du milieu sont essentiels à la survie des organismes mais sont coûteux en énergie. La réallocation de l'énergie en faveur de la maintenance métabolique peut se faire au détriment d'autres fonctions physiologiques (Sokolova et al. 2012). Les processus impliqués dans la régulation du volume cellulaire et de l'équilibre acido-basique se résument à des mécanismes de régulation de concentrations ioniques qui peuvent augmenter le coût énergétique de la maintenance lors d'une acclimatation à des salinités ou pH sous-optimaux.

Un modèle bioénergétique de type DEB (Dynamic Energy Budget) décrit les taux auxquels un organisme assimile et utilise son énergie pour les fonctions de maintenance, de croissance et de reproduction (Kooijman 2009). L'utilisation d'un tel modèle permettrait de mieux comprendre les mécanismes de réallocation énergétique, et d'évaluer le coût de maintenance de l'acclimatation à la salinité et au pH.

3.2 Réponses antioxydante et immunitaire

L'activité de la catalase est réduite dans les huîtres acclimatées à 10 et 15‰ en comparaison à 25‰ et 35‰. L'activité de la superoxyde dismutase est plus faible dans des huîtres maintenues à pH 7.8 en comparaison à pH 8.1. L'activité de ces enzymes est modulée par la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les insaturations des acides gras membranaires peuvent être le siège d'attaque par les ERO et la sensibilité des membranes au dommage oxydatif est estimée par l'indice d'insaturation (Hulbert

2003). Dans notre cas, cet indice est relativement constant quelles que soient les conditions de salinité ou de pH. **Ainsi, une exposition des huîtres aux faibles salinités et un pH de l'eau de mer réduit ne semble pas avoir produit de stress oxydatif chez les animaux.** Cela mériterait toutefois d'être confirmé en quantifiant le malondialdéhyde (MDA) qui est un produit de la peroxydation lipidique. **La plus faible activité des enzymes CAT et SOD respectivement à faibles salinités et pH réduit semble être due à une moindre production d'ERO en comparaison aux conditions optimales. Le dosage de ces espèces permettrait de mieux comprendre l'effet des deux paramètres environnementaux sur la réponse des huîtres.**

Un enrichissement en 20:4n-6 des membranes est observé dans les huîtres à 25 et 35‰. L'enrichissement cellulaire en 20:4n-6 peut provoquer une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Mazière et al. 1999), ce qui expliquerait une activation supérieure de la CAT dans les huîtres à 25 et 35‰. Les huîtres à 10‰ contiennent davantage d'acides gras en lien avec les plasmalogènes, qui sont des antioxydants membranaires. A 10‰, les ERO auraient pu être neutralisées par ces acides gras sans nécessiter l'intervention de la catalase. De telles modifications de la composition en acides gras n'ont pas été observées aux différents pH.

La réponse antioxydante de l'huître est modulée par l'infection par OsHV-1 (Corporeau et al. 2014, Normand et al. 2014b). Dans notre cas l'infection a provoqué une réduction de l'activité de la CAT (Article 2) ou une augmentation des activités de la SOD et de la GST (Expérience 3). Ainsi, le dérèglement de la production d'ERO et des activités des enzymes associées en réponse à la salinité ou le pH a pu moduler la réponse des huîtres à l'infection. **La réduction de l'activité de la SOD dans les huîtres à pH 7.8 suggère que la production d'ERO est moindre qu'à pH 8.1. Cela aurait pu limiter la capacité de défense des huîtres contre OsHV-1 et pourrait expliquer la diminution de survie des huîtres infectées en comparaison à ce qui est observé à pH 8.1.**

Dans le cas du pH nous avons aussi suivi l'activité de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) qui produit des espèces réactives de l'azote (ERN) toxiques pour les agents pathogènes. **L'activité de cette enzyme au 4^{ème} jour post-infection est augmentée dans les huîtres infectées par OsHV-1 et maintenues à pH 8.1, ce qui n'est pas le cas dans les huîtres infectées à pH 7.8. Cela suggère un maintien de production basale des ERN chez les huîtres infectées à pH 7.8, ce qui pourrait avoir réduit leur capacité de défense et expliquerait la moindre survie à l'infection en comparaison à ce qui est observé à pH 8.1.**

4 D'autres facteurs explicatifs des différences de survie ?

4.1 Réponse immunitaire

Nous avons étudié l'expression du gène IFI44 qui semble impliqué dans la réponse antivirale (Renault et al. 2011). L'expression de ce gène dans les tissus d'huîtres a augmenté uniquement dans les conditions où OsHV-1 est infectieux, soit quand les animaux sont infectés à 25‰ (Expérience 1) ou quand la SI est à 25‰ (Expérience 2) en comparaison à 10‰. Ce résultat est en accord avec une étude qui a montré que ce gène est surexprimé lors d'une infection par OsHV-1 (Renault et al. 2011). Pour mieux comprendre le différentiel de survie des huîtres à 15, 25 et 35‰ il serait nécessaire de regarder l'expression du gène IFI44 dans les huîtres maintenues à 15 et 35‰. Une modulation de son expression par la salinité pourrait apporter une explication supplémentaire aux contrastes de survie observés.

4.2 Bactéries

Dans l'expérience 1 nous avons mis en évidence que le virus OsHV-1 perd son infectiosité à 10‰. Toutefois, lorsque les huîtres sont simultanément exposées à une source infectieuse et à un choc hyposalin elles meurent massivement. Cela peut refléter un affaiblissement physiologique, mais peut aussi suggérer qu'un élément de la SI (autre que le virus OsHV-1) soit responsable de la réduction de survie des huîtres

non-acclimatées à 10‰. Les bivalves sont des organismes filtreurs, ils filtrent une diversité de particules qui se trouvent dans la colonne d'eau, dont des microorganismes tels que des virus, mais aussi des bactéries (Ben-Horin et al. 2015, Burge et al. 2016). Pendant les épisodes de mortalité massive, la détection du virus OsHV-1 peut être associée à la détection de bactéries de genre *Vibrio*. Des études ont montré le rôle de ces bactéries dans le phénomène de mortalité massive et notamment la colonisation des huîtres par certaines espèces de *Vibrio* (Petton et al. 2015b) pouvant être virulentes (Lemire et al. 2015). Ainsi, la forte mortalité des huîtres non-acclimatées à 10‰ pourrait s'expliquer par l'implication de bactéries.

Si la réponse métabolique des huîtres à la salinité et au pH apporte des explications aux différentiels de survie à l'infection observés à 15, 25, 35‰ ou à pH 7.8 et pH 8.1, une explication supplémentaire pourrait être la nature de la communauté microbienne aux différentes conditions de salinité et de pH (Dupont et al. 2014, Mackenzie et al. 2014). Par communauté microbienne on entend (i) celle apportée par la SI ou (ii) le microbiote de l'hôte qui peut influencer la sensibilité des organismes aux maladies et qui est lui-même affecté par les conditions environnementales (Pierce et al. 2016).

5 Perspectives

Ce travail de thèse a mis en évidence qu'à 10‰ OsHV-1 n'est plus infectieux et que la survie des huîtres à une infection par ce virus est améliorée uniquement si elles sont préalablement acclimatées à cette salinité. Il pourrait alors être envisagé de tester l'effet d'une acclimatation progressive à 10‰ sur le traitement d'une infection par OsHV-1. L'acclimatation progressive à 10‰ permettrait de réduire l'infectiosité du virus tout en préservant l'huître d'un choc osmotique. Cela consisterait à infecter des huîtres *in natura* et à les ramener en laboratoire pour être acclimatées à une faible salinité. Après cette phase d'acclimatation, ces huîtres (donneuses) seraient mises en cohabitation avec des huîtres saines (receveuses) et la salinité du milieu serait progressivement augmentée. Un suivi de la survie et de la quantité d'ADN

viral dans les tissus des huîtres receveuses et donneuses permettrait alors de savoir s'il est possible de traiter des huîtres infectées par OsHV-1 par l'application d'une salinité de 10‰.

Les estuaires et zones côtières sont caractérisés par des fluctuations de salinité et de pH. Or dans les expériences réalisées au cours de cette thèse seuls des régimes constants de salinité et de pH ont été testés. Ainsi, pour se rapprocher de la réalité il faudrait tester l'effet de fluctuations de ces deux paramètres sur la réponse des huîtres à une infection. Cela a tout son sens à la vue de l'effet de l'acclimatation préalable des huîtres à la salinité 10‰ sur la réponse à l'exposition à la source infectieuse. De telles expériences ont été faites pour évaluer les effets de fluctuations de salinité (La Peyre et al. 2009) et de pH (Keppel et al. 2015) sur l'infection de *C. virginica* par *Perkinsus* spp. Pour tester l'effet de la salinité en conditions environnementales il pourrait être envisagé de déposer des huîtres produites en laboratoire le long d'un gradient de salinité et de suivre leur survie durant un épisode de mortalité.

L'acidification est concomitante au réchauffement des océans. Ainsi, bien que nous ayons constaté des effets subtils du pH sur la survie et sur la réponse métabolique de l'huître, ces effets pourraient être exacerbés dans un contexte de réchauffement des océans, comme cela a été observé dans d'autres études (Ellis et al. 2015, Matozzo et al. 2012). Il est aujourd'hui nécessaire de réaliser des expériences prenant en compte plusieurs facteurs environnementaux (Riebesell & Gattuso 2015). Dans notre étude, les huîtres ont été exposées à une eau de mer acidifiée pendant 6 jours avant d'être infectées. L'acidification des océans est un phénomène à long terme et des études transgénérationnelles seraient plus appropriées pour anticiper les effets de tels changements environnementaux sur la résistance des huîtres à des agents pathogènes.

Pour analyser la réponse métabolique de l'huître à la salinité, au pH et à l'infection nous avons eu une approche fonctionnelle en ciblant des variables biochimiques comme les réserves énergétiques, l'activité d'enzymes impliquées dans les métabolismes catabolique et oxydatif et la composition en acides gras des membranes. Ces variables nous ont permis d'expliquer en partie les différentiels de survie observés entre les traitements. Toutefois, une approche sans a priori par l'utilisation d'outils plus intégrateurs comme

la protéomique ou encore la métabolomique aurait peut-être permis d'être plus précis dans l'explication des modifications des voies métaboliques. C'est pourquoi, les échantillons de l'expérience 3 en lien avec le pH vont être analysés en métabolomique en collaboration avec des chercheurs de l'institut allemand Alfred Wagner rencontrés lors du congrès « The ocean in a high-CO₂ world » à Hobart en mai 2016.

Bibliographie

- Abele D, Puntarulo S (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 138:405-415
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- An MI, Choi CY (2010) Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol* 155:34-42
- Andrews JD (1983) *Minchinia nelsoni* (MSX) infections in the James River seed-oyster area and their expulsion in spring. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16:255-269
- Andrews JD, Wood JL (1967) Oyster mortality studies in Virginia. VI. History and distribution of *Minchinia nelsoni*, a pathogen of oysters, in Virginia. *Chesapeake Science* 8:1-13
- Arzul I, Carnegie RB (2015) New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *J Invertebr Pathol* 131:32-42
- Arzul I, Miosses L, Blanchet E, Garcia C, François C, Joly J-P (2006) *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France ? XI International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Queensland
- Arzul I, Renault T, Lipart C (2001) Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis Aquat Organ* 46:1-6
- Asplund ME, Baden SP, Russ S, Ellis RP, Gong NP, Hernroth BE (2014) Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environ Microbiol* 16:1029-1039
- Azéma P, Travers M-A, De Lorgeril J, Tourbiez D, Dégremont L (2015) Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Veterinary Research* 46:139
- Bacca H (2007) Etude des voies metaboliques des sucres chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalites estivales. PhD Biologie, Université de Rennes 1, Rennes
- Bagusche F (2013) Environmental effects on physiology of calcification in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1973). PhD, University of Southampton,
- Ballantyne JS, Berges JA (1991) Enzyme activities of gill, hepatopancreas, mantle, and adductor muscle of the oyster (*Crassostrea virginica*) after changes in diet and salinity. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1117-1123
- Ballantyne JS, Moyes CD (1987) Osmotic effects on fatty acid, pyruvate, and ketone body oxidation in oyster gill mitochondria. *Physiol Zool* 60:713-721
- Barber BJ, Blake NJ (1981) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). Book 52. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*
- Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M-A (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2-10
- Batista FM, López-Sanmartín M, Grade A, Morgado I, Valente M, Navas JI, Power DM, 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
- Beesley A, Lowe DM, Pascoe CK, Widdicombe S (2008) Effects of CO₂-induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. *Clim Res* 37:215-225
- Ben-Horin T, Bidegain G, Powell EN, Bushek D (2015) Overfiltration of marine diseases I: Experimental evidence and notes from the field. *Journal of Shellfish Research* 34:610-610
- Beniash E, Ivanina A, Lieb NS, Kurochkin I, Sokolova IM (2010) Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 419:95-108
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol* 125:359-369
- Bibby R, Cleall-Harding P, Rundle S, Widdicombe S, Spicer J (2007) Ocean acidification disrupts induced defences in the intertidal gastropod *Littorina littorea*. *Biology Letters* 3:699-701
- Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J, Pipe R (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biol* 2:67-74
- Binias C, Van T, Jude-Lemeilleur F, Plus M, Froidefond J, de Montaudouin X (2013) Environmental factors contributing to the development of brown muscle disease and perkinsosis in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and trematodiasis in cockles (*Cerastoderma edule*) of Arcachon Bay. *Marine ecology*:1-11
- Bowlus RD, Somero GN (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J Exp Zool* 208:137-151
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Burge CA, Closek CJ, Friedman CS, Groner ML, Jenkins CM, Shore-Maggio A, Welsh JE (2016) The Use of Filter-feeders to Manage Disease in a Changing World. *Integr Comp Biol*
- Burge CA, Eakin CM, Friedman CS, Froelich B, Hershberger PK, Hofmann EE, Petes LE, Prager KC, Weil E, Willis BL, Ford SE, Harvell CD (2014) Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Ann Rev Mar Sci* 6:249-277
- Burreson EM, Calvo LMR, Lapeyre JF, Counts F, Paynter KT (1994) Acute osmotic tolerance of cultured-cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa, Perkinsida). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology* 109:575-582
- Burreson EM, Ford SE (2004) A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat Living Resour* 17:499-517
- Bushek D, Ford SE, Burt I (2012) Long-term patterns of an estuarine pathogen along a salinity gradient. *Journal of Marine Research* 70:225-251
- Bussell JA, Gidman EA, Causton DR, Gwynn-Jones D, Malham SK, Jones MLM, Reynolds B, Seed R (2008) Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 358:78-85

- Butt D, Shaddick K, Raftos D (2006) The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 251:159-166
- Børshheim KY (1993) Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* 11:141-159
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365-365
- Calder PC (2001) N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutrition Research* 21:309-341
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Bureson EM (1999) Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 18:465-473
- Canesi L, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P, Gallo G (2010) Effects of *Vibrio* challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152:399-406
- Carregosa V, Figueira E, Gil AM, Pereira S, Pinto J, Soares A, Freitas R (2014a) Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 171:36-43
- Carregosa V, Velez C, Soares A, Figueira E, Freitas R (2014b) Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol* 177:1-9
- Chang P-S, Chen L-J, Wang Y-C (1998) The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166:1-17
- Childress JJ, Somero GN (1979) Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar Biol* 52:273-283
- Chu F-LE (2000) Defense mechanisms of marine bivalves. *Recent advances in marine biotechnology* 5:1e42
- Clegg TA, Morrissey T, Geoghegan F, Martin SW, Lyons K, Ashe S, More SJ (2014) Risk factors associated with increased mortality of farmed Pacific oysters in Ireland during 2011. *Preventive Veterinary Medicine* 113:257-267
- Comps M, Bonami JR, Vago C, Campillo A (1976) Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C R Hebd Séanc Acad Sci* 282
- Comps M, Cochenec N (1993) A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *J Invertebr Pathol* 62
- Cordova A, Deserno M, Gelbart WM, Ben-Shaul A (2003) Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophysical Journal* 85:70-74
- Corporeau C, Tamayo D, Pernet F, Quere C, Madec S (2014) Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J Proteomics* 109:176-187
- Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Huvet A, Madec S (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 75:5554-5563
- Cox DR (1972) Regression Models and Life Tables. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 20:187-220

- Cribb AE, Leeder JS, Spielberg SP (1989) Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 183:195-196
- Dahlhoff EP (2004) Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annu Rev Physiol* 66:183-207
- Dahlhoff EP, Stillman JH, Menge BA (2002) Physiological community ecology: variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal invertebrates along environmental gradients. *Integr Comp Biol* 42:862-871
- Dalsgaard J, St John M, Kattner G, Muller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, Vol 46 46:225-340
- Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT, Suttle CA (2011) Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol Rev* 35:993-1034
- Davenport J, Gruffydd D, Beaumont AR (1975) An apparatus to supply water of fluctuating salinity and its use in a study of the salinity tolerances of larvae of the scallop *Pecten maximus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55:391-409
- Davison AJ, Trus BL, Cheng NQ, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86:41-53
- de Kantzow M, Hick P, Becker JA, Whittington RJ (2016a) Effect of water temperature on mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with microvariant ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 μ Var). *Aquaculture Environment Interactions* 8:419-428
- de Kantzow MC, Hick PM, Dhand NK, Whittington RJ (2016b) Risk factors for mortality during the first occurrence of Pacific oyster mortality syndrome due to Ostreid herpesvirus – 1 in Tasmania. *Aquaculture*
- Degremont L (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317:94-98
- Degremont L (2013) Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 416:129-134
- Degremont L, Bedier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299:21-29
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254:571-582
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species- *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Biol* 206:3053-3064
- Dickinson GH, Ivanina AV, Matoo OB, Portner HO, Lannig G, Bock C, Beniash E, Sokolova IM (2012) Interactive effects of salinity and elevated CO₂ levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J Exp Biol* 215:29-43
- Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, Rosani U, Stauder M, Pretto T, Pezzati E, Arcangeli G, Turolla E, Pallavicini A, Venier P (2014) Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish & Shellfish Immunology* 41:37-44

- Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C, Choi K-S (2015) The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 42:91-97
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Ann Rev Mar Sci* 1:169-192
- Duarte CM, Hendriks IE, Moore TS, Olsen YS, Steckbauer A, Ramajo L, Carstensen J, Trotter JA, McCulloch M (2013) Is Ocean Acidification an Open-Ocean Syndrome? Understanding Anthropogenic Impacts on Seawater pH. *Estuaries and Coasts* 36:221-236
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Dundon WG, Arzul I, Omnes E, Robert M, Magnabosco C, Zambon M, Gennari L, Toffan A, Terregino C, Capua I, Arcangeli G (2011) Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 mu var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314:49-52
- Dupont CL, Larsson J, Yooseph S, Ininbergs K, Goll J, Asplund-Samuelsson J, McCrow JP, Celepli N, Allen LZ, Ekman M, Lucas AJ, Hagström Å, Thiagarajan M, Brindefalk B, Richter AR, Andersson AF, Tenney A, Lundin D, Tovchigrechko A, Nylander JAA, Bami D, Badger JH, Allen AE, Rusch DB, Hoffman J, Norrby E, Friedman R, Pinhassi J, Venter JC, Bergman B (2014) Functional Tradeoffs Underpin Salinity-Driven Divergence in Microbial Community Composition. *PLoS ONE* 9:e89549
- Dupont S, Dorey N, Thorndyke M (2010) What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 89:182-185
- Dégremont L, Garcia C, Allen Jr SK (2015a) Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 131:226-241
- Dégremont L, Nourry M, Maurouard E (2015b) Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture* 446:111-121
- EFSA (2015) Oyster mortality. *EFSA Journal* 13:59
- Ellis RP (2012) The impact of ocean acidification, increased seawater temperature and a bacterial challenge on the immune response and physiology of the blue mussel, *Mytilus edulis*. PhD, University of Plymouth,
- Ellis RP, Widdicombe S, Parry H, Hutchinson TH, Spicer JI (2015) Pathogenic challenge reveals immune trade-off in mussels exposed to reduced seawater pH and increased temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 462:83-89
- Evans O, Paul-Pont I, Hick P, Whittington RJ (2014) A simple centrifugation method for improving the detection of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in natural seawater samples with an assessment of the potential for particulate attachment. *Journal of Virological Methods* 210:59-66
- FAO (2014) Fisheries Statistics - Aquaculture [WWW Document]. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- Ford SE (1985) Chronic infections of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 45:94-107

- Ford SE, Haskin HH (1988) Comparison of in vitro salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology* 90:183-187
- Ford SE, Scarpa E, Bushek D (2012) Spatial and temporal variability of disease refuges in an estuary: Implications for the development of resistance. *Journal of Marine Research* 70:253-277
- Freitas R, Almeida A, Calisto V, Velez C, Moreira A, Schneider RJ, Esteves VI, Wrona FJ, Soares A, Figueira E (2015) How life history influences the responses of the clam *Scrobicularia plana* to the combined impacts of carbamazepine and pH decrease. *Environmental Pollution* 202:205-214
- Fuhrmann M, Petton B, Quillien V, Faury N, Morga B, Pernet F (2016) Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquac Environ Interact* 8:543-552
- Gabbot PA (1975) Storage cycle in marine bivalve molluscs a hypothesis concerning glycogen metabolism and gametogenesis. *Proceeding in the 9th European Marine Biology Symposium*
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T (2006) Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20:536-547
- Gazeau F, Parker LM, Comeau S, Gattuso JP, O'Connor WA, Martin S, Portner HO, Ross PM (2013) Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Mar Biol* 160:2207-2245
- Gazeau F, Quiblier C, Jansen JM, Gattuso J-P, Middelburg JJ, Heip CHR (2007) Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters* 34:L07603
- Genard B, Miner P, Nicolas JL, Moraga D, Boudry P, Pernet F, Tremblay R (2013) Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *Plos One* 8
- Gilles R (1972) Osmoregulation in Three Molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). *Biol Bull* 142:25-35
- Gittenberger A, Voorbergen-Laarman MA, Engelsma MY (2016) Ostreid herpesvirus OsHV-1 muVar in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *J Fish Dis* 39:105-109
- Glémet HC, Ballantyne JS (1995) Influences of environmental salinity on the structure and function of gill mitochondrial membranes of an osmoconforming invertebrate, *Crassostrea virginica*. *Mar Biol* 121:673-683
- Goedken M, Morsey B, Sunila I, Dungan C, De Guise S (2005) The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 24:177-183
- Gosling E (2003) *Bivalve mollusc*. Wiley-Blackwell
- Greenway SC, Storey KB (1999) The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J Exp Marine Biol* 242:259-272
- Grizel H (1983) Impact de *Marteilia refringens* et de *Bonamia Ostreae* sur l'ostréiculture bretonne. *Conseil international pour l'exploration de la mer*
- Groner ML, Maynard J, Breyta R, Carnegie RB, Dobson A, Friedman CS, Froelich B, Garren M, Gulland FMD, Heron SF, Noble RT, Revie CW, Shields JD, Vanderstichel R, Weil E, Wyllie-Echeverria

- S, Harvell CD (2016) Managing marine disease emergencies in an era of rapid change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371
- Hall JM, Parrish CC, Thompson RJ (2002) Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. *Biol Bull* 202:201-203
- Hanquet A (2009) Approches cellulaires et moléculaires de la gestion des réserves chez l'huître, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Suivi saisonnier du métabolisme énergétique et effet du niveau trophique sur la mise en réserve. PhD Biologie, Université de Caen, Caen
- Harland H, MacLeod CD, Poulin R (2015) Non-linear effects of ocean acidification on the transmission of a marine intertidal parasite. *Marine Ecology Progress Series* 536:55-64
- Harvell D (2004) Ecology and evolution of host-pathogen interactions in nature. *Am Nat* 164:S1-S5
- Harvell D, Aronson R, Baron N, Connell J, Dobson A, Ellner S, Gerber L, Kim K, Kuris A, McCallum H, Lafferty K, McKay B, Porter J, Pascual M, Smith G, Sutherland K, Ward J (2004) The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. *Front Ecol Environ* 2:375-382
- Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S (1998) The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 119:619-623
- Hawkins AJS, Hilbish TJ (1992) The cost of cell-volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *J Mar Biolog Assoc UK* 72:569-578
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19-42
- Herlemann DP, Labrenz M, Jurgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5:1571-1579
- Hermes-Lima M (2004) *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism.* John Wiley & Sons, Inc.
- Hick P, Evans O, Looi R, English C, Whittington RJ (2016) Stability of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) and assessment of disinfection of seawater and oyster tissues using a bioassay. *Aquaculture* 450:412-421
- Hine PM, Thorne T (1997) Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby 1871): an ultrastructural study. *Dis Aquat Organ* 29
- Hine PM, Wesley B, Besant P (1998) Replication of herpes-like viruses in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis Aquat Organ* 32
- Hofmann E, Bushek D, Ford S, Guo XM, Haidvogel D, Hedgecock D, Klinck J, Milbury C, Narvaez D, Powell E, Wang YP, Wang ZR, Wilkin J, Zhang L (2009) Understanding how disease and environment combine to structure resistance in estuarine bivalve populations. *Oceanography* 22:212-231
- Hulbert AJ (2003) Life, death and membrane bilayers. *J Exp Biol* 206:2303-2311
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol* 199:257-274
- Hulbert AJ, Kelly MA, Abbott SK (2014) Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J Comp Physiol B* 184:149-166

- Héral M (1985) Evaluation of the carrying capacity of molluscan shellfish ecosystems. International seminar for research on planning and development aids to the shellfish industry
- IPCC (2007) The physical science basis. In: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change In: Press CU (ed)
- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu XN, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, Kirkland PD, Frances J (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 105:109-126
- Jiang J, Borisenko GG, Osipov A, Martin I, Chen R, Shvedova AA, Sorokin A, Tyurina YY, Potapovich A, Tyurin VA, Graham SH, Kagan VE (2004) Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. *J Neurochem* 90:1036-1049
- Jouaux A, Lafont M, Blin JL, Houssin M, Mathieu M, Lelong C (2013) Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *Bmc Genomics* 14
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481
- Keeling SE, Brosnahan CL, Williams R, Gias E, Hannah M, Bueno R, McDonald WL, Johnston C (2014) New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1-an opportunistic longitudinal study. *Diseases of Aquatic Organisms* 109:231-239
- Keppel AG, Breitbart DL, Wikfors GH, Burrell RB, Clark VM (2015) Effects of co-varying diel-cycling hypoxia and pH on disease susceptibility in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 538:169-183
- Kim SW, Huh TH, Huh SH, Lee WT (2001) Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar Biol* 138:157-162
- Knowles G, Handler J, Jones B, Moltschaniwskyj N (2014) Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. *Journal of Invertebrate Pathology* 121:78-84
- Kooijman B (2009) Basic concepts. *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kraffe E (2003) Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves; apport des méthodes chromatographiques PhD, Université de Bretagne occidentale, Brest,
- Kraffe E, Soudant P, Marty Y (2004) Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39:59-66
- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, Hendriks IE, Ramajo L, Singh GS, Duarte CM, Gattuso J-P (2013) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob Change Biol* 19:1884-1896
- Kuchel RP, Raftos DA, Nair S (2010) Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. *Fish & Shellfish Immunology* 29:930-936

- Kukkaro P, Bamford DH (2009) Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environ Microbiol Rep* 1:71-77
- La Peyre MK, Gossman B, La Peyre JF (2009) Defining optimal freshwater flow for oyster production: Effects of freshet rate and magnitude of change and duration on eastern oysters and *Perkinsus marinus* infection. *Estuaries and Coasts* 32:522-534
- La Peyre MK, Nickens AD, Volety AK, Tolley GS, La Peyre JF (2003) Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Marine Ecology Progress Series* 248:165-176
- Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Powell EN, Rondeau D, Saksida SM (2015) Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci* 7:471-496
- Lafferty KD, Holt RD (2003) How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecol Lett* 6:654-664
- Lannig G, Eilers S, Portner HO, Sokolova IM, Bock C (2010) Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* - Changes in metabolic pathways and thermal Response. *Marine Drugs* 8:2318-2339
- Larmarange J (2003) Introduction à l'analyse d'enquêtes avec R.
- Lassudrie M, Soudant P, Nicolas J-L, Fabioux C, Lambert C, Miner P, Le Grand J, Petton B, Hégaret H (2015) Interaction between toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* exposure and disease associated with herpesvirus OsHV-1 μ Var in Pacific oyster spat *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 45:53-61
- Le Bris C, Richard G, Paillard C, Lambert C, Seguineau C, Gauthier O, Pernet F, Guerard F (2015) Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*-Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol* 42:16-24
- Le Grand F (2010) Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires: Cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée. PhD, Université de Bretagne Occidentale,
- Lemire A, Goudenege D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y, Le Roux F (2015) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* 9:1523-1531
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253-278
- Li SG, Liu YJ, Liu C, Huang JL, Zheng GL, Xie LP, Zhang RQ (2015) Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. *Fish Shellfish Immunol* 45:194-202
- Lin DY, Wei LJ, Ying Z (1993) Checking the Cox Model with Cumulative Sums of Martingale-Based Residuals. *Biometrika* 80:557-572
- Liu B, Yu ZM, Song XX, Guan YQ, Jian XF, He JF (2006) The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 253:163-170
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

- Lynch SA, Carlsson J, Reilly AO, Cotter E, Culloty SC (2012) A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139:1526-1532
- Mackenzie CL, Lynch SA, Culloty SC, Malham SK (2014) Future oceanic warming and acidification alter immune response and disease status in a commercial shellfish species, *Mytilus edulis* L. *Plos One* 9
- MacLeod CD, Poulin R (2015) Differential tolerances to ocean acidification by parasites that share the same host. *Int J Parasitol* 45:485-493
- MacLeod CD, Poulin R (2016) Parasitic infection: a buffer against ocean acidification? *Biol Lett* 12
- Malagoli D, Ottaviani E (2005) Cytotoxicity as a marker of mussel health status. *J Mar Biol Assoc UK* 85
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F (2005) The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2:91-104
- Martenot C (2013) Les variants du virus herpétique ostreid herpesvirus-1 chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Book 17. *Virologie*
- Martenot C, Denechere L, Hubert P, Metayer L, Oden E, Trancart S, Travaillee E, Houssin M (2015) Virulence of Ostreid herpesvirus 1 mu Var in sea water at 16 degrees C and 25 degrees C. *Aquaculture* 439:1-6
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain JF (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Ecol* 163:221-234
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG (2012) First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *Plos One* 7
- Matozzo V, Marin MG (2011) Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *Invertebrate survival* 8:70-77
- Matozzo V, Monari M, Foschi J, Serrazanetti GP, Cattani O, Marin MG (2007) Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Marine Biology* 151:1051-1058
- Mazière C, Conte M-A, Degonville J, Ali D, Mazière J-C (1999) Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NFκB. *BBRC* 265:116-122
- McCallum HI, Kuris A, Harvell CD, Lafferty KD, Smith GW, Porter J (2004) Does terrestrial epidemiology apply to marine systems? *Trends Ecol Evol* 19:585-591
- McFarland VA, Inouye LS, Lutz CH, Jarvis AS, Clarke JU, McCant DD (1999) Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:236-241
- Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, Dupont S, Lucassen M, Thorndyke MC, Bleich M, Pörtner HO (2009) Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6:2313-2331
- Metcalfe LD, Schmitz AA (1961) The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry* 33:363-364

- Michaelidis B, Ouzounis C, Palaras A, O. Portner H (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 293:109-118
- Mojica KDA, Brussaard CPD (2014) Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology* 89:495-515
- Monari M, Serrazanetti GP, Foschi J, Matozzo V, Marin MG, Cattani O (2007) Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina* haemocytes. Part II: Superoxide dismutase response. *Marine Biology* 151:1059-1068
- Moran AL, Manahan DT (2004) Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 306:17-36
- Moreau P, Faury N, Burgeot T, Renault T (2015) Pesticides and Ostreid Herpesvirus 1 Infection in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* 10:e0130628
- Moreira A, Figueira E, Soares AM, Freitas R (2016) The effects of arsenic and seawater acidification on antioxidant and biomineralization responses in two closely related *Crassostrea* species. *Sci Total Environ* 545-546:569-581
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5:600-608
- Morrissey T, McCleary S, Collins E, Henshilwood K, Cheslett D (2015) An investigation of ostreid herpes virus microvariants found in *Crassostrea gigas* oyster producing bays in Ireland. *Aquaculture* 442:86-92
- Mortensen S, Strand A, Bodvin T, Alfjorden A, Skar CK, Jelmert A, Aspan A, Saelemyr L, Naustvoll LJ, Albretsen J (2016) Summer mortalities and detection of ostreid herpesvirus microvariant in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway. *Dis Aquat Organ* 117:171-176
- Munari M, Chinellato A, Matozzo V, Bressan M, Marin MG (2010) Combined effects of temperature, salinity and pH on immune parameters in the clam *Chamelea gallina*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 157:S19-S19
- Munro PD, Murray AG, Fraser DI, Peeler EJ (2003) An evaluation of the relative risks of infectious salmon anaemia transmission associated with different salmon harvesting methods in Scotland. *Ocean & Coastal Management* 46:157-174
- Murray AG (2013) Epidemiology of the spread of viral diseases under aquaculture. *Curr Opin Virol* 3:74-78
- Neufeld DS, Wright SH (1996) Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *J Exp Biol* 199:473-484
- NOAA (2017) Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/weekly.html>
- Normand J, Blin JL, Jouaux A (2014a) Rearing practices identified as risk factors for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection in Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Diseases of Aquatic Organisms* 110:201-211
- Normand J, Li RH, Quillien V, Nicolas JL, Boudry P, Pernet F, Huvet A (2014b) Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Contrasted survival under

- field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Genomics* 15:95-102
- Oden E, Martenot C, Berthaux M, Travaille E, Malas JP, Houssin M (2011) Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities. *Aquaculture* 317:27-31
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GK, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437:681-686
- Osada M, Nomura T (1989) Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 93:349-353
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, Portner HO, Scanes E, Wright JM (2013) Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology* 2:651-692
- Paul-Pont I, Dhand NK, Whittington RJ (2013a) Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 412:202-214
- Paul-Pont I, Dhand NK, Whittington RJ (2013b) Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* 105:127-138
- Paul-Pont I, Evans O, Dhand NK, Rubio A, Coad P, Whittington RJ (2014) Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture* 422:146-159
- Pazos AJ, Ruíz C, García-Martín O, Abad M, Sánchez JL (1996) Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 114:171-179
- Peeler EJ, Reese RA, Cheslett DL, Geoghegan F, Power A, Thrush MA (2012) Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 mu Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* 105:136-143
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269-276
- Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Degremont L, Lagarde F, Pepin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact* 2:215-237
- Pernet F, Lagarde F, Jeanne N, Daigle G, Barret J, Le Gall P, Quere C, D'Orbcastel ER (2014a) Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *Plos One* 9
- Pernet F, Lagarde F, Le Gall P, D'Orbcastel ER (2014b) Associations between farming practices and disease mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a Mediterranean lagoon. *Aquac Environ Interact* 5:99-106

- Pernet F, Lupo C, Bacher C, Whittington RJ (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Phil Trans R Soc Lon B Biol Sci*
- Pernet F, Tamayo D, Petton B (2015) Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* 445:57-62
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210:2999
- Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015a) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* 6:205-222
- Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015b) *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* 6
- Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* 3:257-273
- Pierce ML, Ward JE, Holohan BA, Zhao X, Hicks RE (2016) The influence of site and season on the gut and pallial fluid microbial communities of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae): community-level physiological profiling and genetic structure. *Hydrobiologia* 765:97-113
- Pierce SK (1971) Volume regulation and valve movements by marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 39:103-117
- Pipe RK, Porte C, Livingstone DR (1993) Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 3:221-233
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography* 60:705-718
- Ramos-Carreño S, Valencia-Yáñez R, Correa-Sandoval F, Ruíz-García N, Díaz-Herrera F, Giffard-Mena I (2014) White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. *Archives of Virology* 159:2213-2222
- Range P, Chicharo MA, Ben-Hamadou R, Pilo D, Fernandez-Reiriz MJ, Labarta U, Marin MG, Bressan M, Matozzo V, Chinellato A, Munari M, El Menif NT, Dellali M, Chicharo L (2014) Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Reg Environ Change* 14:S19-S30
- Raven J, Caldeira K, Elderfield H, Hoegh-Guldberg O, Liss P, Riebessell U, Sheperd J, Turley C, Watson A (2005) Ocean acidification due to increasing carbon dioxide. Royal Society, London, UK
- Rawn JD (1989) *Traité de biochimie*.
- Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH (2003) Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* 56:249-258
- Renault T, Bouquet AL, Maurice JT, Lupo C, Blachier P (2014) Ostreid Herpesvirus 1 Infection among Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: Relevance of Water Temperature to Virus Replication and Circulation Prior to the Onset of Mortality. *Applied and Environmental Microbiology* 80:5419-5426

- Renault T, Faury N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K (2011) Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Developmental and Comparative Immunology* 35:725-735
- Renault T, Lipart C, Arzul I (2001) A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis Aquat Organ* 45
- Richard G, Guerard F, Corporeau C, Lambert C, Paillard C, Pernet F (2016) Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Dev Comp Immunol* 60:96-107
- Riebesell U, Fabry VJ, Hansson L, Gattuso JP (2011) Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting.
- Riebesell U, Gattuso J-P (2015) Lessons learned from ocean acidification research. *Nature Clim Change* 5:12-14
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Elandaloussi L, Gairin I, Rodgers CJ, Furones MD (2012) First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324:303-306
- Rosani U, Varotto L, Domeneghetti S, Arcangeli G, Pallavicini A, Venier P (2015) Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* 17:4200-4212
- Roth O, Keller I, Landis SH, Salzburger W, Reusch TB (2012) Hosts are ahead in a marine host-parasite coevolutionary arms race: innate immune system adaptation in pipefish *Syngnathus typhle* against *Vibrio* phylotypes. *Evolution* 66:2528-2539
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R, Wong CS, Wallace DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng T-H, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004) The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂. *Science* 305:367-371
- Samain JF, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Quae (ed) *The Morest project*
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T (2011a) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* 155:28-34
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pepin JF (2011b) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* 42
- Schmidt-Nielsen K (1997) *Animal physiology: Adaptation and environment*
- Segarra A, Baillon L, Tourbiez D, Benabdelmouna A, Faury N, Bourgoignon N, Renault T (2014a) Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* 45
- Segarra A, Faury N, Pépin JF, Renault T (2014b) Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 119:5-11
- Segarra A, Mauduit F, Faury N, Trancart S, Degremont L, Tourbiez D, Haffner P, Barbosa-Solomieu V, Pepin JF, Travers MA, Renault T (2014c) Dual transcriptomics of virus-host interactions:

- comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *Bmc Genomics* 15
- Segarra A, Pepin JF, 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
- Seguineau C, Racotta IS, Palacios E, Delaporte M, Moal J, Soudant P (2011) The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 160:87-93
- Shumway SE (1977a) Effect of fluctuating salinity on tissue water-content of 8 species of bivalve mollusks. *J Comp Physiol* 116:269-285
- Shumway SE (1977b) Effect of salinity fluctuation on osmotic-pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in hemolymph of bivalve mollusks. *Mar Biol* 41:153-177
- Shumway SE, Gabbott PA, Youngson A (1977) Effect of fluctuating salinity on concentrations of free amino-acids ninhydrin substances or muscles of 8 species of bivalve mollusks. *J Exp Mar Biol Ecol* 29:131-150
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219
- Smith WL, Murphy RC (2002) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. *New Comprehensive Biochemistry*, Book 36. Elsevier
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* 79:1-15
- Sokolova IM, Sukhotin, A. A. and Lannig, G. (2011) Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*
- Solomon S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K, Tignor M, Miler H (20017) Contribution of working group I to the fourth assessment report of the
- Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press
- Soudant P, Chu FLE, Volety A (2013) Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J Invertebr Pathol* 114:196-216
- Soudant P, Leite R, Chu FLE, Villalba A, Cancela L (2008) Bivalves-*Perkinsus* spp. interactions Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry Vilanova de Arousa, Spain
- Soudant P, Van Ryckeghem K, Marty Y, Moal J, Samain JF, Sorgeloos P (1999) Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 123:209-222
- Stanley D, Howard R (1998) The biology of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates: Cellular, organismal and ecological actions. *Am Zool* 38:369-381
- Stanley-Samuelson DW (1994) The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *American Zoologist* 34:589-598
- Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29:1715-1733

- Suttle CA, Chen F (1992) Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl Environ Microbiol* 58:3721-3729
- Ségarra A (2014) Etude des interactions hôte/virus chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et son virus Ostreid herpesvirus 1. PhD, Université de Bretagne-Sud,
- Tamayo D, Corporeau C, Petton B, Quere C, Pernet F (2014) Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 μ Var. *Aquaculture* 432:304-310
- Timmins-Schiffman E, Coffey WD, Hua W, Nunn BL, Dickinson GH, Roberts SB (2014) Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics* 15:1-18
- Tomanek L, Zuzow MJ, Hitt L, Serafini L, Valenzuela JJ (2012) Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus *Mytilus*): implications for biogeographic range limits in response to climate change. *Journal of Experimental Biology* 215:3905-3916
- Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina AV, Beniash E, Sokolova IM (2011) Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J Exp Biol* 214:1836-1844
- Travers MA, Basuyaux O, Le Goic N, Huchette S, Nicolas JL, Koken M, Paillard C (2009) Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob Change Biol* 15:1365-1376
- Travers MA, Basuyaux O, Nicolas JL, Friedman C, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008) Temperature dependent vibriosis of the European abalone, *Haliotis tuberculata*. *J shellfish res* 27:1058-1058
- Traving SJ, Clokie MR, Middelboe M (2014) Increased acidification has a profound effect on the interactions between the cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803 and its viruses. *FEMS Microbiol Ecol* 87:133-141
- Van Thuong K, Van Tuan V, Li W, Sorgeloos P, Bossier P, Nauwynck H (2016) Effects of acute change in salinity and moulting on the infection of white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) with white spot syndrome virus upon immersion challenge. *J Fish Dis*
- Volety AK, Vignier J, Fuhrmann M, Cuesta M, Chouzenoux H, Doering P, Gorman P, Welch B, Scotto L (2013) Effects of salinity on early lifestages of oysters *Crassostrea virginica*: implication for freshwater inflow management in southwest Florida estuaries. World Aquaculture Society, Nashville
- Wang Q, Cao RW, Ning XX, You LP, Mu CK, Wang CL, Wei L, Cong M, Wu HF, Zhao JM (2016) Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 49:24-33
- Ward JR, Lafferty KD (2004) The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing? *Plos Biology* 2:542-547
- Webb SC, Fidler A, Renault T (2007) Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272:126-139
- Whittington RJ, Dhand NK, Evans O, Paul-Pont I (2015a) Further observations on the influence of husbandry practices on OsHV-1 μ Var mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Age, cultivation structures and growing height. *Aquaculture* 438:82-97

- Whittington RJ, Hick P, Evans O, Rubio A, Alford B, Dhand N, Paul-Pont I (2015b) Protection of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat from mortality due to ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 mu Var) using simple treatments of incoming seawater in land-based upwellers. *Aquaculture* 437:10-20
- Wootton JT, Pfister CA, Forester JD (2008) Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:18848-18853
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water-stress - Evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222

Interaction entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'Ostréid herpesvirus OsHV-1 : Influence de la salinité et du pH

Résumé : *Crassostrea gigas* est l'espèce d'huître la plus cultivée au monde. Depuis 2008, des événements de mortalité massive touchent les huîtres âgées de moins d'un an en Europe et en Océanie et ont été associés à l'émergence d'un nouveau variant de l'Ostréid herpesvirus type 1, OsHV-1 μ var. Les huîtres sont naturellement présentes dans les écosystèmes estuariens et côtiers, caractérisés par des fluctuations de salinité et de pH. Dans le cadre de ce travail, l'effet de la salinité (10, 15, 25, 35‰) et du pH (7.8, 8.1) sur la réponse de l'huître à une infection par OsHV-1 a été étudié. La survie d'huîtres acclimatées à une salinité de 10‰ préalablement à l'exposition à une source infectieuse est de 95% et s'explique par une diminution de l'infectiosité d'OsHV-1. En revanche, la survie d'huîtres non-acclimatées simultanément soumises à un choc de salinité à 10‰ et exposées à une source infectieuse n'est que de 23%, ce qui reflète un affaiblissement physiologique. La survie (S) des huîtres aux autres salinités est classée de la manière suivante : $S_{15‰} > S_{35‰} > S_{25‰}$ et selon le pH comme suit : $S_{pH\ 7.8} < S_{pH\ 8.1}$. Dans les deux études ces contrastes de survie ne sont pas expliqués par un différentiel d'infectiosité du virus mais par celui de la réponse métabolique de l'hôte. Le métabolisme des sucres et l'activité antioxydante d'huîtres acclimatées à 25 et 35‰ sont supérieurs à celui d'huîtres à 10-15‰ et pourraient expliquer leur moindre survie. La plus faible activité antioxydante observée chez des huîtres maintenues à pH 7.8 suggère une production réduite d'espèces réactives de l'oxygène et le maintien d'une production basale d'espèces réactives de l'azote malgré l'infection, ce qui aurait pu réduire la capacité de défense des huîtres face au virus et expliquer leur moindre survie en comparaison à ce qui est observé à pH 8.1.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, herpesvirus, OsHV-1, salinité, pH, mortalité, infectiosité, métabolisme, énergétique

Interaction between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Ostreid herpesvirus OsHV-1: Influence of salinity and pH

Abstract: *Crassostrea gigas* is the most cultivated oyster species around the world. Since 2008, mass mortality events have been affecting oysters aged less than one year old in Europe, and Oceania and have been associated with a new variant of the ostreid herpesvirus type 1, OsHV-1 μ var. Oysters live in estuaries and bays where they are exposed to fluctuations of salinity and pH. In the present work, the effect of salinity (10, 15, 25, 35 ‰) and pH (7.8, 8.1) on the response of oysters to infection by OsHV-1 was investigated. The survival of oysters acclimated to 10 ‰ prior to be exposed to a source of infection is 95% and is explained by a reduction of OsHV-1 infectivity. In contrast, the survival of non-acclimated oysters simultaneously submitted to a salinity stress at 10 ‰ and exposed to a source of infectious is only 23%, likely reflecting physiological impairment. The survival (S) of oysters in other salinity treatment is ranked as follow: $S_{15‰} > S_{35‰} > S_{25‰}$ and according to pH as follows: $S_{pH\ 7.8} < S_{pH\ 8.1}$. In both studies these contrasts of survival are not explained by differences in OsHV-1 infectivity but in host metabolic response. The carbohydrate metabolism and antioxidant activity of oysters acclimated to 25 and 35‰ is higher than in oysters at 10-15 ‰ and could explain the lower survival. Lower antioxidant activity is observed in oysters maintained at pH 7.8 likely reflecting a reduced production of reactive oxygen species and the maintenance of a basal production of nitrogen reactive species despite infection. This might impair the defense ability of oysters to OsHV-1 explaining the reduced survival at pH 7.8 in comparison to what observed at pH 8.1.

Key words : *Crassostrea gigas*, herpesvirus, OsHV-1, salinity, pH, mortality, infectivity, metabolism, energetic