



HAL
open science

Plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieux tempéré et tropical

Mathieu Lutier

► **To cite this version:**

Mathieu Lutier. Plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieux tempéré et tropical. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0011 . tel-04213535

HAL Id: tel-04213535

<https://theses.hal.science/tel-04213535>

Submitted on 21 Sep 2023

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 de doctorat de

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Ecole Doctorale n° 598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialité : « *Biologie Marine* »

Par

Mathieu LUTIER

Plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieu tempéré et tropical

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 24 février 2022

Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR ; UMR 6539)

Rapporteurs avant soutenance :

Sam DUPONT

Senior lecturer, University of Gothenburg

Yannick GUEGUEN

Chargé de recherches, Ifremer, UMR MARBEC

Composition du Jury :

Président du jury : Frédéric JEAN

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, UMR LEMAR

Sam DUPONT

Senior lecturer, University of Gothenburg

Yannick GUEGUEN

Chargé de recherches, Ifremer, UMR MARBEC

Guy CLAIREAUX

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, UMR LEMAR

Sylvie TAMBUTTE

Directrice de recherche, Centre Scientifique de Monaco

Fanny NOISETTE

Professeure, Université du Québec à Rimouski

Directeur de thèse : Fabrice PERNET

Chargé de recherches, Ifremer, UMR LEMAR

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Sam Dupont et Yannick Gueguen pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et de prendre le temps d'évaluer mon travail. Je remercie également Frédéric Jean, Guy Claireaux, Sylvie Tambutté et Fanny Noisette pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et pour l'intérêt porté à mon travail.

Je remercie également Sophie Martin, Frédéric Gazeau, Arnaud Huvet et Bruno Petton pour m'avoir suivi pendant ces trois années en tant que membres du comité de thèse. Vos conseils ont toujours été très constructifs et bienveillants. Je remercie tout particulièrement Fred pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Villefranche afin de me former, et avoir toujours pris le temps de répondre à mes mails et mes appels. Merci Sophie d'avoir toujours été bienveillante et de m'avoir accompagné depuis mon stage de M1 à Roscoff.

Il est temps de remercier Fabrice Pernet, Carole Di Poi et Jérémy Le Luyer, mes encadrants, pour m'avoir toujours accordé leur confiance dans les bons moments comme dans les moments difficiles. Merci de m'avoir choisi pour mener à bien ce travail de thèse alors que je n'avais pas répondu dans les temps aux mails de sélection. Sans votre insistance (et l'intervention inopinée de ma mère) je serais passé à côté de ce magnifique projet de thèse. J'ai énormément appris à votre contact et vous m'avez fait grandir et gagner en maturité. Merci pour votre patience même face aux (trop) longs mails que j'avais l'habitude de vous envoyer. Grâce à vous, j'ai pu vivre l'une des expériences les plus enrichissantes de ma vie.

Je tiens à remercier l'ensemble du LPI pour son accueil, ses conseils et toutes les discussions constructives. Merci Valérian et Claudie d'être qui vous êtes (employé de l'année 2020 en l'occurrence pour Valérian), pour le soutien, pour l'aide, et les bons moments. Je tiens à remercier tout particulièrement les membres de la station d'Argenton : Stéphane, Isa, Jacqueline, Matthias, Moussa, Sébastien, Bruno, Marianne. J'avais eu l'occasion de faire mon stage d'IUT en 2014 à la station et cette expérience m'a donné envie de poursuivre ma carrière en biologie marine. Argenton restera toujours un endroit particulier pour moi. Merci aussi d'avoir toujours cru les nombreux « fun-facts » que j'ai pu vous distiller lors des pauses cafés malgré l'absence de sources fiables. Votre confiance m'honore.

Merci tout particulièrement à Jérémy et à Vincent pour m'avoir accueilli à Tahiti et m'avoir aidé à surmonter les nombreuses embûches administratives, matérielles, techniques et COVIDiennes qui semblaient vouloir nous empêcher de faire la manip *Pinctada*. Merci Jérémy pour m'avoir fait découvrir les bons (surf, fléchettes, bière pong) et les mauvais côtés (la Hinano) de Tahiti. Merci à mes « collocs » Polynésiens Ific, Jean, Thibault, Guillaume, Tony, Margaux, Amélie et Léo pour toutes les nuits blanches, les barbecues plus ou moins qualitatifs, les parties de dé, de pétanque et de fléchette, les tournois de bière pong et globalement pour toutes les activités extra-scolaires. Le temps est passé bien vite à vos côtés. Merci à Thomas « la totole » et Lucas « la grande tige » pour m'avoir aidé à pêcher le Mahi Mahi et m'avoir offert mon premier trophée de pêche. Je n'ai rien appris à vos côtés à part peut-être l'humilité et le respect. J'ai apprécié écouter les nombreuses histoires de Jean-Yves à vos côtés. J'ai eu énormément de chance de pouvoir vivre cette expérience en Polynésie qui me marquera pendant longtemps. Mauruuru !

Je tiens particulièrement à remercier mes collègues thésards qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse. Tout d'abord merci Céline, je n'aurais pas pu faire meilleure rencontre le jour où je suis arrivé en thèse. C'était réconfortant de découvrir les bons et les moins bons côtés de la recherche à tes côtés. Ma première année de thèse aurait été difficile si tu n'avais pas été là. Je tiens également à remercier Elyne Dugény « Ambassadrice de l'océan Atlantique » pour m'avoir pris sous son aile et m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Merci d'avoir supporté mes blagues « un peu lourdes » sur Serge et les personnes de petite taille. Merci d'être qui vous êtes !

Je ne remercie pas en revanche Coline Caillon dit « Graillon » pour ses performances vocales dans le bureau. Cela a été à la fois un supplice et une joie de travailler à tes côtés. Plus sérieusement, je tiens à remercier les membres de la communauté de Beauvoir sur Mer pour t'avoir laissé venir à Brest et avoir mis leurs gênes en commun pour faire de toi qui tu es (une belle personne). Merci pour avoir supporté mes crises de folies, mes imitations de dindon, mes chansons et mes blagues un peu répétitives dans le bureau. Peu de gens ont une aussi grande force morale que celle dont tu as fait preuve. Merci pour ta bienveillance tant sur le terrain de volley (boh ... en fait non) qu'en dehors. Merci pour le soutien psychologique. C'était vraiment une chance te rencontrer et passer cette dernière année avec toi. Ne change pas !

Je tiens à remercier les parents de Hugo Koechlin pour l'avoir mis au monde et le ciel pour l'avoir mis sur ma route. Grâce au destin, j'ai rencontré à la fois un modèle et un mentor en la personne d'Hugo. J'espère pouvoir marcher sur tes traces et réussir une brillante carrière. Le monde et l'Ifremer ont de la chance de t'avoir, merci à toi !

Merci à Audrey Mandonnet pour m'avoir appris tout ce que je sais.

Plus généralement, merci à toutes les belles personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces trois années à l'Ifremer : Lara, Alexis, Maxime, Julie, Klervi, Pierre, Coline, Hugo, Moussa, Clémentine, Camille, Thomas, Kévin, Alexandre, Lucie et l'équipe de volley. Clémentine et Camille vous êtes ce que les années 80 ont produit de mieux avec Michael Jackson et le disco. Merci d'être restées jeunes ! Kévin, merci d'avoir été littéralement un modèle open-source pour moi.

Merci à mes amis Brestois d'avoir toujours été là et de m'avoir aidé à m'évader de cette thèse. Merci Maiwen d'être qui tu es et de m'avoir fait grandir. Merci Guillaume, je vais m'efforcer de continuer à copier ton parcours professionnel, comme je le fais depuis l'IUT. Merci particulièrement aux « petits pédestres » GuiBrit & Guillaume Coachalley pour m'avoir toujours soutenu pendant ce long stage de 3 ans, chaque moment passé avec vous est essentiel à mon équilibre.

Enfin mes derniers remerciements sont pour ma famille. Un immense merci à ma mère pour toutes les corrections orthographiques et pour son soutien indéfectible, depuis le tout tout début, même dans les moments difficiles. Merci de m'avoir toujours fait confiance et accompagné dans mes choix, sans toi je n'aurais littéralement pas pu faire cette thèse. Merci papa pour toutes ces discussions philosophiques et pour avoir éveillé ma curiosité pour le monde qui m'entoure. Merci papy et mamy de vous être intéressés à mon travail de thèse alors qu'il devait vous sembler bien farfelu. Votre intérêt et votre soutien ont été une de mes plus grandes forces. Merci à toi papy pour avoir éveillé ma curiosité pour la nature et le monde qui

m'entoure et ainsi, avoir en grande partie déterminé ce que je fais aujourd'hui. Merci Thomas pour être là depuis le tout début. Merci d'être qui vous êtes, c'est une grande force et une grande fierté de vous avoir tous à mes côtés.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE.....	8
INTRODUCTION GENERALE	15
I. Le phénotype dans l’anthropocène.....	16
I.1. L’anthropocène : des changements environnementaux sans précédent.....	16
I.2. Survivre à long-terme dans l’anthropocène : phénotype & adaptation	19
II. S’acclimater via la plasticité phénotypique : survivre à des changements environnementaux rapides	23
II.1. Historique, définition et importance évolutive de la plasticité phénotypique	23
II.2. Plasticité phénotypique et acclimatation.....	24
II.3. Comment la plasticité conditionne-t-elle la sélection ? Les limites de la plasticité	25
II.4. Pourquoi la plasticité n’est-elle pas infinie ? Le coût de la plasticité	28
III. S’adapter via la plasticité phénotypique : normes de réaction et points de bascule	30
III.1. Historique, définition et importance évolutive des normes de réaction	30
III.2. Sur quelles bases s’exerce la sélection des normes de réaction ? pentes et points de bascule	31
III.4. Comment déterminer des normes de réaction ? Points clés, zones d’ombre et approches méthodologiques.....	37
IV. Acidification des océans et plasticité phénotypique	44
IV.1. L’acidification des océans : un changement sans précédent.....	44
IV.2. Quels sont les impacts généraux de l’acidification des océans sur la physiologie des mollusques coquilliers ?	50
IV.3. Approches méthodologiques dans l’étude de l’acidification des océans.....	54
V. Les huîtres et l’acidification des océans : modèles biologiques.....	60
V.1. L’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	60
V.2. L’huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i>	62
V.3. Impacts de l’acidification des océans sur l’huître creuse et l’huître perlière	64
V.4. Objectifs de la thèse et hypothèses de travail	67
CHAPITRE 1 Normes de réaction de l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> au pH.....	70
Abstract.....	72
Introduction	73

Material and methods	75
Animals and maintenance.....	75
Experimental design	76
Seawater carbonate chemistry	77
Biometry	78
Physiological rates.....	79
Biochemistry	81
Transcriptomics	81
Statistical analysis	82
Results	84
Acclimation of oysters to 15 different pH conditions.....	84
Most macro-physiological traits tip at low pH values between 7.1-6.9.....	85
Shell parameters and respiration rate are impacted above tipping point	85
A major remodeling of membrane lipids occurs at pH 6.9.....	85
Expression of most genes shows tipping points at pH 7.3-6.9	88
Expression of genes related to biomineralization shows tipping point at pH 7.1-6.9.....	90
Discussion	93
Supplementary information	100
Note S1	100
Figure S1	101
Figure S2	101
Figure S3	102
Figure S4	102
Table S1.....	103
Table S2.....	104
Table S3.....	105
Table S4.....	106
CHAPITRE 2 Capacité de récupération de l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> en dessous du	
point de bascule	107
Abstract	109
Introduction	110
Material and methods	112
Experimental design	112
Seawater carbonate chemistry	113
Biometry	113

Statistical analysis	114
Results & discussion.....	116
Supplementary information	120
Table S1.....	120
Table S2.....	121
CHAPITRE 3 Normes de réaction de l’huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> au pH.....	122
Abstract.....	124
Introduction	125
Material and methods	128
Animals and maintenance.....	128
Experimental design	129
Seawater carbonate chemistry	130
Biometry, counting & shell analysis.....	131
Physiological rates.....	132
Biochemistry	133
Transcriptomics	135
Statistical analysis	136
Results	138
Acclimation of oysters to 15 pH conditions	138
Pearl oyster’s physiology tips at low pH values between 7.2-6.9.....	138
Membrane lipids are remodeled around pH 7.3	139
Expression of most genes tips at low pH values between 7.1-6.8	142
Expression of most genes tips with calcification rate	143
Discussion.....	151
Tolerance threshold in juvenile <i>P. margaritifera</i> is below near-future OA projections	151
Potential sensitivity of shell structure to OA	153
Maintenance costs of calcification and acid/base homeostasis could explain the rapid mortalities occurring below the tolerance threshold	154
Endocytosis/exocytosis, membranes fatty acids and protein ubiquitination are likely involved in the maintenance of calcification.....	156
Conclusion.....	160
Supplementary information	161
Figure S1	161
Figure S2	161
Figure S3	162

Table S1.....	163
Table S2.....	164
Table S3.....	165
Table S4.....	166
DISCUSSION GENERALE.....	167
I. Objectif de la thèse : décrire la plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieux tempéré et tropical.....	168
II. Quels sont les points de bascule et le seuil de tolérance global à l'AO chez l'huître creuse et l'huître perlière ?	170
II.1. L'huître creuse	170
II.2. L'huître perlière	174
II.3. Quelles implications pour le futur de ces deux espèces ?	176
III. La réduction de fitness subie en dessous des points de bascule est-elle réversible ?	177
IV. La plasticité adaptative des espèces aux milieux intertidal tempéré et subtidal tropical conditionne-t-elle leur capacité de réponse et leur potentiel adaptatif à l'AO ?.....	179
IV.1. L'huître creuse.....	179
IV.2. L'huître perlière.....	182
V. Quels sont les mécanismes régulant la plasticité phénotypique au niveau moléculaire ?	183
V.1. Identification de gènes associés à la régulation de la plasticité phénotypique.....	183
V.2. Rôle des acides gras membranaires dans la réponse à l'acidification des océans.....	185
V.3. Rôle de l'endocytose/exocytose, de l'ubiquitination des protéines et des acides gras membranaires dans le maintien de la calcification.....	185
VI. Zones d'ombre & perspectives.....	187
VI.1. Quels sont les mécanismes de réponse à l'AO au niveau de l'organe et du tissu ?.....	187
VI.2. Quel est l'impact de l'ontogénie sur la plasticité phénotypique des huîtres ?	188
VI.3. La plasticité phénotypique est-elle différente chez d'autres populations d'huîtres ?	191
VI.4. Les normes de réaction peuvent-elles évoluer sur plusieurs générations ?.....	191
VI.5. Quels seraient les effets de stress additionnels sur les normes de réaction ?.....	192
VII. Réflexions personnelles	194
BILAN DE LA THESE.....	197
I. Publications	198
Publié (1)	198
En préparation (3).....	198

II. Présentations orales à des conférences nationales	198
III. Enseignements.....	199
IV. Encadrement de stages	199
V. Sciences et sociétés.....	200
REFERENCES.....	201
-A-	202
-B-	203
-C-	206
-D-	210
-E-	212
-F-.....	213
-G-.....	214
-H-.....	216
-I-	218
-J-.....	220
-K-.....	220
-L-	222
-M-	226
-N-	228
-O-.....	229
-P-.....	230
-R-	232
-S-.....	233
-T-	236

-V-	237
-W-	238
-X-	240
-Y-	240
-Z-	241

INTRODUCTION GENERALE

I. Le phénotype dans l'anthropocène

I.1. L'anthropocène : des changements environnementaux sans précédent

« Nous vivons désormais dans un monde sans-précédent (à l'échelle des temps géologiques) ».

Steffen et al., 2015

La terre entre actuellement dans l'anthropocène, une ère où les activités humaines sont devenues une force géologique prépondérante provoquant des changements environnementaux majeurs affectant tous les écosystèmes et tous les milieux terrestres et océaniques (Crutzen, 2006; Crutzen & Stoermer, 2000; Davis, 2011; Lewis & Maslin, 2015). Ces changements environnementaux sont d'une part biotique avec des phénomènes telles que l'introduction d'espèces invasives, la disparition d'espèces « clé de voûte » pour le fonctionnement des écosystèmes et des réseaux trophiques, et l'introduction de pathogènes (Figure 1). Ils sont aussi abiotiques avec l'avènement de phénomènes tels que les changements climatiques, l'acidification des océans, la pollution et la dégradation des écosystèmes (Figure 1).

Depuis 1950, la grande accélération correspond à l'augmentation exponentielle des activités humaines, au sein même de l'anthropocène, précipitant les changements environnementaux qui surviennent maintenant à une rapidité sans précédent à l'échelle des temps géologiques (Steffen et al., 2015). Ces changements ne sont pas linéaires et se caractérisent avant tout par une augmentation de la fréquence et de l'intensité des événements extrêmes, e.g. ouragans, vagues de chaleur, et des zones géographiques concernées par ces phénomènes (Collins et al., 2013). De ce fait, la terre entre à présent dans une période d'inconnu où le futur des écosystèmes dépend de la capacité de réponse des espèces à des changements

environnementaux sans précédents. Ces changements environnementaux sont pour le moment atténués par l'effet « tampon » du système terre qui répartit par exemple l'augmentation de la chaleur atmosphérique dans les océans et absorbe une grande partie des gaz à effet de serre émis dans l'atmosphère (Steffen et al., 2018). Il est toutefois prévu qu'un « point de bascule » soit atteint dans les décennies à venir, à partir duquel l'effet « tampon » du système terre sera excédé par l'intensification des activités humaines résultant en une augmentation massive et potentiellement irréversible des changements environnementaux et de leur impact.

« Aujourd'hui, le taux d'extinction des espèces est des centaines à milliers de fois plus rapide que le taux « normal » qui prévalait au cours des dernières dizaines de millions d'années ».

Ceballos et al., 2020

La capacité de réponse des espèces face à la rapidité des changements environnementaux est limitée et lorsqu'elle est excédée, résulte en leur disparition. Ainsi, nous nous trouvons aujourd'hui dans la sixième crise d'extinction massive des espèces depuis l'apparition de la vie sur terre (Ceballos et al., 2020). Ce taux de disparition s'accélère à mesure que les activités humaines s'intensifient. Le dernier rapport de l'IPBES (2019) estime ainsi qu'un quart des populations des espèces constituant la biosphère pourrait disparaître dans les décennies à venir. Cela induit un cercle vicieux, la disparition d'espèces déstabilisant le fonctionnement des écosystèmes, e.g. disparition d'espèces « ingénieures » structurant les habitats, et entraînant la disparition d'autres espèces qui leur sont associées, e.g. via les réseaux trophiques (Ceballos et al., 2020). Ce phénomène d'extinction « en cascade » pourrait s'emballer et devenir incontrôlable (Brodie et al., 2014).

Dans ce contexte, cette première partie introductive a pour objectif de définir les paramètres physiologiques et évolutifs qui déterminent les « limites » dans la capacité de

réponse des organismes aux changements globaux. Ces concepts clés définissent la capacité des espèces à persister dans l'anthropocène et seront étudié et développé tout au long de cette thèse.

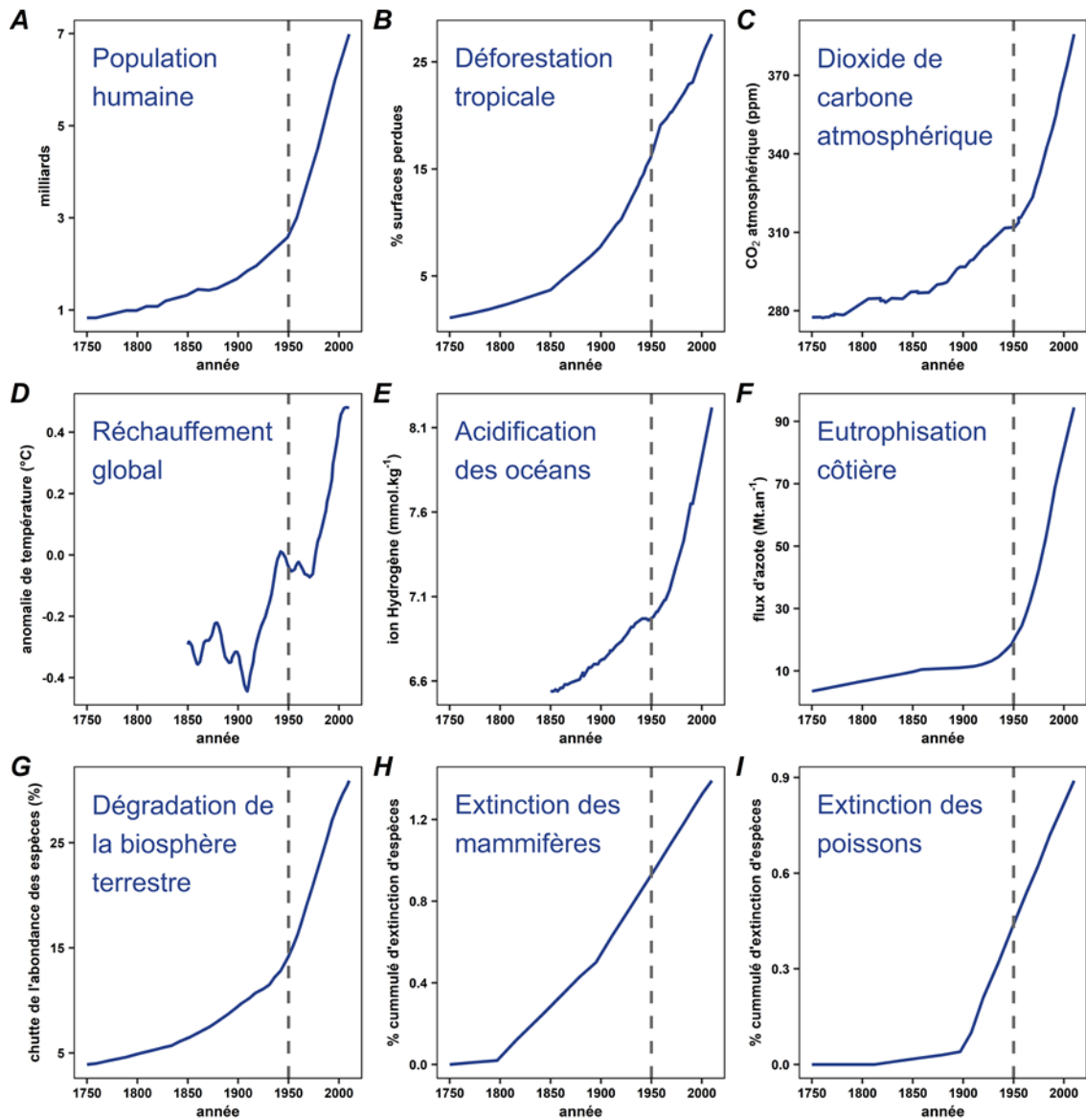


Figure 1. Anthropocène et changements environnementaux. Evolution de plusieurs paramètres biotiques et abiotiques relatifs aux changements environnementaux induits par l'augmentation des activités humaines entre 1750 et 2010. La « grande accélération » dans l'augmentation de ces paramètres est visible à partir de 1950 (pointillés). Données compilées depuis Steffen et al. (2015) et le rapport de l'IPBES (2019).

I.2. Survivre à long-terme dans l'anthropocène : phénotype & adaptation

« L'impact de l'homme a augmenté si rapidement dans les dernières décennies qu'il est devenu la force évolutive dominante à l'échelle globale ».

Palumbi, 2021

Pour comprendre les enjeux relatifs à la survie des espèces dans l'anthropocène il est nécessaire de définir ce qu'est le phénotype des organismes et son adaptation à l'environnement. C'est l'objet de cette partie qui définit ces concepts clés en se basant sur la « *théorie de l'évolution* » proposée par Charles Darwin en 1859, sur le concept de « *phénotype-génotype* » proposé par Wilhelm Johannsen en 1909 et sur le concept de « *phénotype étendu* » proposé par Richard Dawkins en 1982. Une synthèse de ces théories est présentée ici (voir Churchill, 1974; Darwin, 1859; Dawkins, 1982; DeWitt & Scheiner, 2004; Johannsen, 1909).

Le phénotype est l'ensemble des traits exprimés pour les caractères phénotypiques d'un individu et observables à un instant donné. Le phénotype est donc l'état d'un organisme à un moment précis et les caractères phénotypiques se répartissent de l'échelle macroscopique, i.e. caractères morphologiques (e.g. taille, poils, cornes), physiologiques (e.g. respiration, croissance) et comportementaux (e.g. nage, alimentation), à l'échelle moléculaire (e.g. expression des gènes, activité enzymatique). Le phénotype est à la fois inné, car il dépend des gènes portés par l'individu et acquis car il dépend de l'environnement auquel est exposé l'individu et qui détermine notamment l'expression de ces gènes. Cela est symbolisé par l'équation :

$$\mathbf{Phénotype} = f(\mathbf{Génotype}, \mathbf{Environnement})$$

Exemple : Une longueur de 10 cm serait le trait exprimé par une souris pour le caractère taille au moment où celle-ci est mesurée. Ce caractère est à la fois inné, étant codé par le génotype de l'individu, et acquis, dépendant des conditions environnementales rencontrées lors de la croissance (e.g. nourriture, température) (exemple inspiré de Falconer & Latyszewski, 1952).

La diversité phénotypique est l'ensemble des phénotypes exprimés dans une population. Dans un environnement stable, chaque trait exprimé tend à être le plus adapté à l'environnement de l'individu afin de maximiser ses performances en termes d'exploitation du milieu (e.g. ressources alimentaires, espace), de survie (e.g. résistance à la prédation, aux maladies) et de reproduction (e.g. compétition sexuelle d'accès au partenaire). La valeur moyenne de la diversité phénotypique dans une population pour un caractère donné tendra donc vers une valeur optimale selon l'adaptation locale d'une espèce à son environnement. La valeur optimale d'un trait résulte la plupart du temps d'un compromis évolutif, entre plusieurs facteurs externes, i.e. environnementaux, et internes, i.e. physiologiques, permettant de maximiser la valeur sélective globale de l'individu, i.e. capacité à transmettre ses gènes, aussi appelée fitness.

Exemple : Il est possible qu'une épaisseur de coquille de 400 μm soit optimale pour assurer la survie d'une huître face à la prédation et aux dommages physiques (e.g. vagues). Une coquille de plus de 400 μm d'épaisseur serait une défense plus efficace mais deviendrait trop coûteuse à produire pour l'organisme détournant de l'énergie d'autres fonctions physiologiques majeures telles que la croissance ou la reproduction. Il s'agit donc d'un compromis évolutif, une coquille épaisse de 400 μm ayant la meilleure fitness pour survivre dans cet environnement particulier. Dans ce cas la valeur moyenne pour le caractère « épaisseur de la coquille » tendra à être 400 μm dans la population d'huîtres (Figure 2) (exemple fictif inspiré des données présentées dans Lord & Whitlatch, 2012 et Palmer, 1992).

(sauf si des migrations et mutations interviennent sur le long-terme). Il est à noter que la transmission du phénotype ne dépend pas uniquement du génotype mais aussi de phénomènes épigénétiques (e.g. méthylation de l'ADN) et non génétiques (e.g. effets maternels). Le rôle de ces phénomènes dans l'évolution des espèces reste aujourd'hui méconnu chez un grand nombre de taxons et ne sera pas évoqué plus en détail dans ce mémoire.

Exemple : Il est possible que la pression de sélection change dans l'environnement de l'huître avec l'introduction d'un nouveau prédateur consommant préférentiellement les huîtres pour laquelle l'épaisseur de la coquille est inférieure à 430 μm . Dans ce cas, l'épaisseur optimale de la coquille dans cet environnement donné devient 430 μm au lieu de 400 μm auparavant afin « d'échapper » au risque de prédation. Sur plusieurs générations, la valeur moyenne du caractère « épaisseur de la coquille » se rapprochera de 430 μm dans la population (Figure 2) (exemple fictif inspiré des données présentées dans Telesca et al., 2021).

A long-terme, c'est la capacité des populations à s'adapter qui déterminera la persistance des espèces face aux changements environnementaux. Toutefois, le processus d'adaptation est long (i.e. dizaines voire centaines de générations), particulièrement pour les espèces à long temps de génération, et ne permet pas de répondre à des changements environnementaux rapides, à l'échelle du cycle de vie. Cela est particulièrement problématique dans le contexte de l'anthropocène où les changements globaux agissent à l'échelle de décennies au lieu de milliers d'années (Seebacher et al., 2015; Steffen et al., 2015). Pour survivre et se reproduire, les individus devront migrer vers des environnements plus favorables ou alors ajuster leur phénotype rapidement au sein de leur cycle de vie. Cette modification réversible du phénotype, i.e. sans modification du génotype, est le phénomène d'acclimatation via la plasticité phénotypique qui constitue le premier rempart des organismes face aux changements globaux (Figure 2) (Bonamour et al., 2019; DeWitt & Scheiner, 2004; Gibert et al., 2019). Cette

plasticité phénotypique est particulièrement importante pour les espèces sessiles aux capacités de migration limitées (e.g. plantes, mollusques coquilliers) (Padilla & Savedo, 2013).

II. S'acclimater via la plasticité phénotypique : survivre à des changements environnementaux rapides

II.1. Historique, définition et importance évolutive de la plasticité phénotypique

Le concept de « plasticité phénotypique » a été défini en 1949 par Ivan Schmalhausen. En revanche, bien que proposé dès 1959 par Anthony Bradshaw, le rôle de la plasticité phénotypique dans l'évolution des espèces a longtemps été ignoré et a même été considéré comme ralentissant l'évolution des caractères phénotypiques (Nicoglou, 2015). Le rôle clé joué par la plasticité phénotypique dans l'évolution a seulement été reconnu au début des années 1990 provoquant une augmentation exponentielle de la production d'articles dédiés (Hutchings, 2011; Nicoglou, 2015). Il est aujourd'hui admis que la plasticité phénotypique permet aux organismes de tamponner les effets négatifs d'un changement environnemental brutal sur leur fitness et ainsi de survivre jusqu'à transmettre leurs gènes (Gibert et al., 2019). Le phénotype n'est en effet pas « rigide » mais « plastique » permettant à un individu de s'acclimater à l'environnement afin d'exprimer des traits phénotypiques optimaux tout au long de son cycle de vie (Figure 2) (DeWitt & Scheiner, 2004). La plasticité d'un trait pourrait donc avoir une valeur adaptative et être sélectionnée au cours de l'évolution (Gienapp & Merilä, 2018). Il est donc primordial de définir le concept de plasticité phénotypique et les processus physiologiques et adaptatifs sous-jacents pour comprendre le potentiel de résilience des espèces aux changements globaux.

II.2. Plasticité phénotypique et acclimatation

« La plasticité phénotypique représente la première ligne de défense face aux changements climatiques ».

Gienapp & Merilä, 2018

La plasticité phénotypique représente la capacité pour un génotype à exprimer des phénotypes différents en réponse à des stimuli environnementaux. On distingue la plasticité de développement qui est irréversible (DeWitt & Scheiner, 2004), e.g. détermination du sexe par la température chez les reptiles (voir exemple dans Noble et al., 2018), et la plasticité réversible (DeWitt & Scheiner, 2004), e.g. gonflement-dégonflement chez les poissons du genre *Diodon* pour faire fuir les prédateurs (voir exemple dans Brainerd, 1994). Un organisme au phénotype réversible peut s'acclimater à un environnement changeant en ajustant son phénotype afin d'exprimer la nouvelle valeur optimale pour un trait et maximiser sa fitness. La valeur moyenne de la plasticité phénotypique d'une population tendra ainsi à englober toutes les valeurs optimales du trait phénotypique pour un environnement variable donné (Gotthard & Nylin, 1995). C'est la plasticité adaptative. Il est à noter que la plasticité peut également être maladaptative si elle échoue à interpréter les stimuli environnementaux et produit une valeur de trait éloignée de l'optimum, e.g. une otarie exprime une fourrure blanche en hiver une année où il n'y a pas de neige (Gotthard & Nylin, 1995).

Exemple : Un exemple de plasticité phénotypique réversible est la teneur en tanin dans les feuilles que les arbres peuvent faire varier selon la présence ou non d'insectes afin d'optimiser leur fitness au fil des saisons. Dans un environnement donné, la teneur en tanin optimale d'une feuille pour survivre pourra être de 5 % la saison où il y a le moins d'insectes et être de 10% la saison où il y a le plus d'insectes. Dans, ce cas une population exprimant une

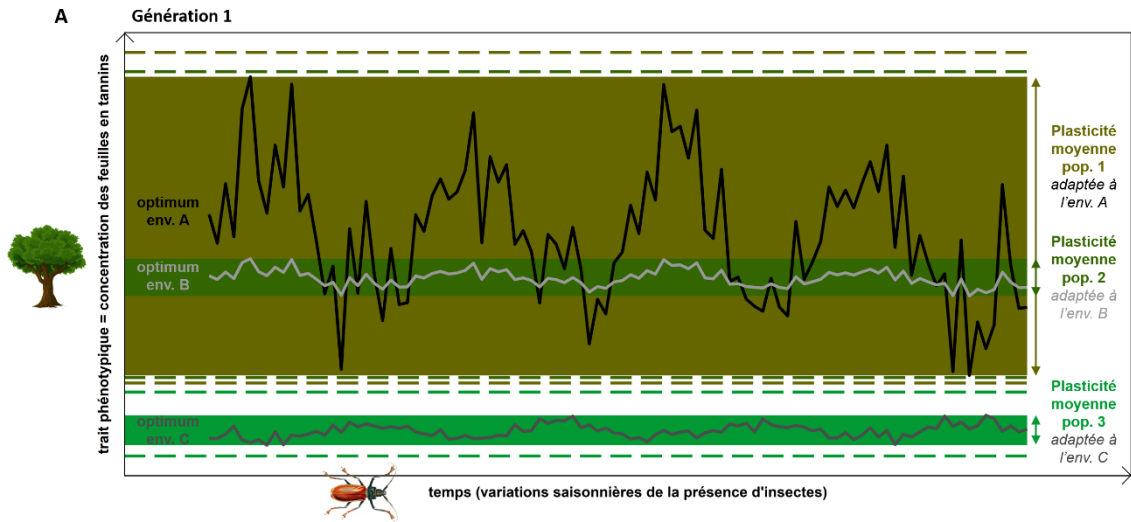
plasticité moyenne de 5 à 10 % pour ce trait a une plasticité adaptative à ce milieu de vie. Cet exemple fictif est inspiré de Holeski et al. (2012) et est présenté en Figure 3A.

II.3. Comment la plasticité conditionne-t-elle la sélection ? Les limites de la plasticité

Pour que la plasticité d'un caractère phénotypique constitue un avantage évolutif, il faut que l'intensité et la durée du changement environnemental soient conciliables avec l'ampleur et la rapidité du changement phénotypique (Gibert et al., 2019). En effet, la plasticité phénotypique d'un organisme est limitée par son génotype ne permet pas de coder une infinité de traits. Ces limites « bornant » la plasticité phénotypique d'un trait sont primordiales car elles conditionnent la relation de match / mismatch avec l'environnement (DeWitt et al., 1998; Murren et al., 2015). Ainsi, si la plasticité d'un trait ne permet pas de coder la majorité des valeurs optimales et de répondre rapidement à environnement changeant, i.e. mismatch, il tendra à disparaître au profit d'autres génotypes codant des traits dont la plasticité englobe la gamme de variations environnementales du milieu, i.e. match (Gibert et al., 2019) (Figure 3A).

Le potentiel adaptatif d'une population dépend alors, en partie, de la présence de génotypes codant des phénotypes à la plasticité extrême dont les limites constituent les valeurs maximales vers lesquelles pourra tendre la plasticité moyenne exprimée par une population (Gienapp & Merilä, 2018). Cela repose sur la diversité phénotypique qui est la somme des phénotypes présents dans une population et dépend largement de la diversité génotypique, i.e. somme des génotypes (Gienapp & Merilä, 2018). Si une population ne possède pas de phénotypes suffisamment plastiques pour suivre un changement environnemental, elle ne pourra pas maintenir sa fitness en s'adaptant et risque peut-être, à terme, de disparaître. La transmission des traits plastiques repose donc sur la sélection des génotypes correspondants, i.e. l'adaptation. La plasticité peut toutefois également être transmise par des phénomènes non

génétiques (e.g. épigénétique, effet maternel) résultant en une plasticité transgénérationnelle



Translocation = les populations sont changées d'environnement

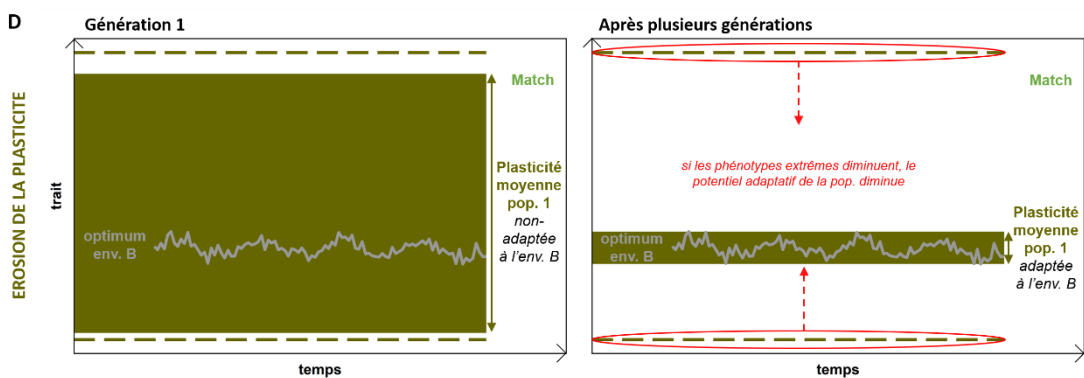
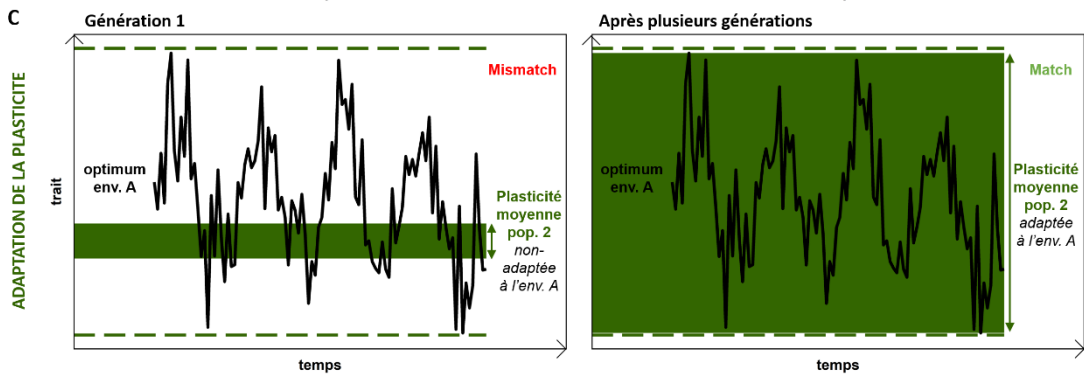
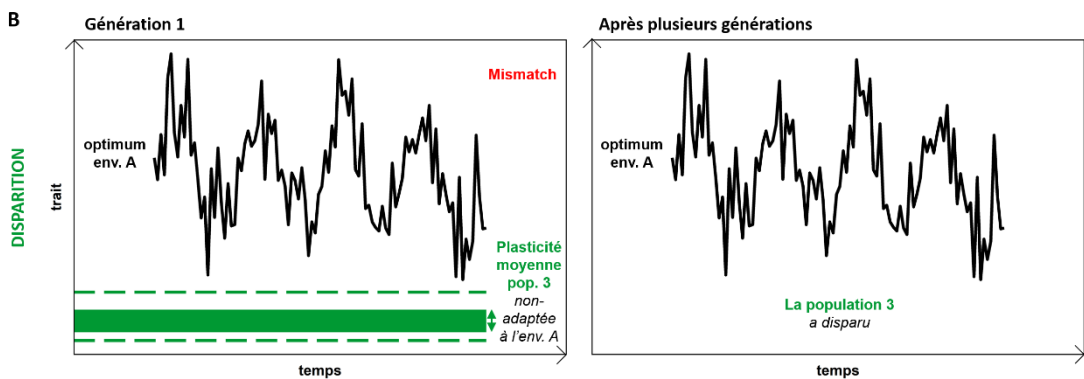


Figure 3. Plasticité phénotypique et adaptation. L'évolution de la teneur en tanin dans les feuilles qui est optimale pour la survie est représentée dans trois populations d'arbres (populations 1, 2 et 3), évoluant dans trois environnements différents (environnements A, B et C), au cours du temps. Cette valeur optimale de trait phénotypique varie saisonnièrement selon le type et la quantité d'insectes présents dans le milieu. La plasticité phénotypique moyenne exprimée par chaque population est représentée par les rectangles de couleur. (A) La plasticité d'une population est adaptative au milieu de vie lorsqu'elle exprime l'entièreté des valeurs optimales du trait dans un environnement donné. Pour chaque population, les tirets sont les valeurs les plus extrêmes de plasticité phénotypique codée par le génotype de certains individus. L'intervalle délimité par ces tirets représente donc le potentiel adaptatif de la population. Ce potentiel adaptatif de la plasticité phénotypique est représenté sur la partie inférieure de la figure où les populations sont transloquées dans un nouvel environnement et adaptent leur plasticité phénotypique sur plusieurs générations. Après translocations, trois situations peuvent être observés (B) disparition de la population dont le potentiel adaptatif est excédé, (C) adaptation de la plasticité phénotypique, ou (D) adaptation au nouveau milieu mais érosion de la plasticité phénotypique. Abréviations : env. = environnement, pop. = population. *Cet exemple est fictif, inspiré des données présentées dans Holeski et al. (2012) et est ici utilisé à des fins d'illustration.*

(Donelson et al., 2018; Sommer, 2020). Dans les deux cas, le résultat est le même et conduit à une adaptation locale de la population à un environnement donné.

Exemple : Une population d'arbre possède une plasticité adaptative lui permettant de faire varier en moyenne la teneur en tanin de ses feuilles de 5 à 10 %. Certains individus au phénotype extrêmement plastique peuvent faire varier cette teneur de 3 à 12 %. Cette population est transloquée vers un nouvel environnement où la valeur optimale de tanin pour maximiser la fitness est de 15 à 25 %. Le potentiel adaptatif de la population est excédé, elle ne pourra pas s'adapter à ce nouvel environnement. A l'inverse, une autre population possède une plasticité moyenne de la teneur en tanin de 13 à 19 % et des phénotypes extrêmes à 12 et 26 % et pourra s'adapter sur plusieurs générations. A terme, la plasticité moyenne exprimée par cette population sera de 15 à 25 % correspondant aux valeurs optimales pour le nouvel

environnement. Ces exemples fictifs sont inspirés de Holeski et al. (2012) et sont présentés en Figure 3B-C.

II.4. Pourquoi la plasticité n'est-elle pas infinie ? Le coût de la plasticité

La plasticité phénotypique est limitée car elle a un coût et résulte donc d'un compromis évolutif entre les avantages et les inconvénients d'un trait à être plastique pour la fitness d'un individu (DeWitt et al., 1998). D'une part, son maintien implique l'entretien d'un système physiologique de réception et d'analyse des signaux envoyés par l'environnement (e.g. récepteurs cellulaires, régulation hormonale, signalisation cellulaire). D'autre part, cela implique également l'entretien d'une machinerie cellulaire et génétique permettant à un trait de changer de forme au cours du cycle de vie (e.g. gènes structuraux, ribosomes, polymérase, réserves énergétiques). Ces coûts sont constitutifs c'est-à-dire qu'ils sont indissociables du maintien de la plasticité. Cela implique une dépense d'énergie constante tout au long du cycle de vie de l'individu sans assurance d'être utile si l'environnement reste stable et n'exige aucune plasticité. Il est à noter que l'adaptation à long-terme à un milieu variable peut aboutir à une réduction des coûts constitutifs de la plasticité phénotypique. Cela peut se faire par optimisation de la machinerie cellulaire et génétique, l'apparition de mutations génétiques favorables compensatoires ou la mise en place de nouveaux réseaux de gènes fonctionnant en symbiose (DeWitt et al., 1998; Murren et al., 2015).

Le coût constitutif du maintien de la plasticité peut éventuellement détourner de l'énergie qui ne peut pas être investie dans d'autres fonctions physiologiques importantes pour la fitness (e.g. croissance, reproduction). Dans ce cas la plasticité devient maladaptative résultant après plusieurs générations en une érosion de la plasticité et en une diminution du potentiel adaptatif d'une population lorsqu'il y a un relâchement de la pression de sélection (Murren et al., 2015). Cette érosion n'est pas irréversible et peut-être contrebalancée par des échanges de génotypes

avec d'autres populations à court-terme, i.e. migration, ou l'apparition de mutations génétiques à long-terme (Chevin et al., 2010; X.-S. Zhang, 2006). Il est à noter que la variabilité environnementale reste imprédictible et est en partie stochastique et qu'il est avantageux de maintenir des phénotypes à la plasticité extrême (Aubret & Shine, 2010; Murren et al., 2015). Cela explique que la plasticité phénotypique et le potentiel adaptatif d'une population ne s'érodent jamais totalement.

Exemple : Une population d'arbre possède une plasticité adaptative lui permettant de faire varier en moyenne la teneur en tanin de ses feuilles de 15 à 25 %. Certains individus au phénotype extrêmement plastique peuvent faire varier cette teneur de 14 à 27 %. Cette population est transloquée vers un nouvel environnement où la pression de sélection exercée par les insectes est relâchée et où les teneurs optimales en tanins sont de 17 à 22 %. Après plusieurs générations, la valeur moyenne de plasticité exprimée par la population sera de 17 à 22 %. Il est possible que les phénotypes à plasticité extrême à 14 et 27 % deviennent trop coûteux énergétiquement à maintenir par rapport aux bénéfices apportés à la fitness individuelle et soient par conséquent contresélectionnés. A terme, cela résultera en une érosion de la plasticité de la population et en une diminution de son potentiel adaptatif. Cet exemple fictif est inspiré de Holeski et al. (2012) et est présenté en Figure 3D.

Pour déterminer l'avenir des espèces soumises à des changements environnementaux, il est donc primordial de définir les limites de leur plasticité phénotypique. Pour cela, il est nécessaire de déterminer les normes de réaction qui sont une représentation graphique de la plasticité phénotypique des espèces et de leur fitness en fonction de la variation des facteurs environnementaux (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995).

III. S'adapter via la plasticité phénotypique : normes de réaction et points de bascule

III.1. Historique, définition et importance évolutive des normes de réaction

« Dans la mesure où les normes de réaction sont hérissables, elles constituent la base de l'évolution de la plasticité phénotypique ».

Gotthard & Nylin, 1995

Le terme et le concept de « norme de réaction » ont été définis dès 1909 par Richard Woltereck, soit un demi-siècle avant que le terme de « plasticité phénotypique » ne soit introduit par Anthony Bradshaw (1959). Woltereck (1909) décrit la norme de réaction correspondant à la variation de la taille du casque des daphnies en fonction de l'abondance de nourriture dans le milieu. Dès 1911, Wilhelm Johannsen (inventeur du concept de « phénotype-génotype », voir parties précédentes) souligna le rôle potentiellement important joué par les normes de réaction dans l'évolution des espèces (Schlichting & Pigliucci, 1998). Pourtant, le concept de norme de réaction resta par la suite relativement ignoré tout au long du XXe siècle faisant écho aux débats sur le rôle effectif joué par la plasticité phénotypique dans l'évolution (Schlichting & Pigliucci, 1998). L'importance des normes de réaction qui constituent l'une des « pierres angulaires » de l'évolution des espèces n'a été réhabilitée que dans les années 1990 donnant lieu à une explosion de la production littéraire sur le sujet. Cela a particulièrement été le cas dans le domaine de l'étude des changements globaux (Hutchings, 2011; Sommer, 2020).

La norme de réaction est le pattern d'évolution de la valeur d'un trait phénotypique (e.g. respiration) sur une gamme de variation d'un facteur environnemental (e.g. température de 0 à

20°C) (Gotthard & Nylin, 1995; Schlichting & Pigliucci, 1998). La norme de réaction peut prendre tous les types de forme, e.g. linéaire, polynomiale. On emploie souvent le terme « normes de réaction » au pluriel car il existe autant de normes de réaction qu'il y a de caractères phénotypiques. Elle est spécifique à chaque génotype, et son allure représente ainsi la plasticité phénotypique d'un individu ou d'une population (i.e. courbe de performance) et la manière dont elle réagit aux changements environnementaux. Elle est étroitement liée à l'évolution de l'expression des gènes qui codent différents traits phénotypiques en fonction des variations environnementales (Schlichting & Pigliucci, 1998). Les normes de réaction sont ainsi transmises ou modifiées au fil des générations par adaptation des génotypes et/ou par des phénomènes épigénétiques ou non-génétiques (Schlichting & Pigliucci, 1998; Sommer, 2020). La norme de réaction définit en effet les conditions environnementales où la plasticité phénotypique est avantageuse, i.e. produit un trait optimal, et les limites au-delà desquelles les capacités adaptatives des espèces vont être excédées résultant en leur déclin ou leur extinction (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010). La détermination des normes de réaction constitue donc la méthode privilégiée pour prédire et étudier le potentiel évolutif et la persistance des espèces exposées à des changements environnementaux (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Hutchings, 2011).

III.2. Sur quelles bases s'exerce la sélection des normes de réaction ? pentes et points de bascule

« Il existe des points de bascule évolutifs au-delà desquels des changements environnementaux, même mineurs, auront des conséquences dramatiques et disproportionnées sur la persistance des populations ».

Botero et al., 2015

Une norme de réaction est représentée par les paramètres mathématiques la modélisant. Ce sont ces paramètres qui sont soumis à la sélection par l'environnement et adaptés en conséquence au fil des générations (Chevin et al., 2010). Une norme de réaction peut avoir tout type de forme. Toutefois, les auteurs s'intéressent le plus souvent aux normes de réactions linéaires qui sont très répandues dans le domaine du vivant et permettent l'évaluation simple et efficace du potentiel adaptatif des organismes (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Hutchings, 2011). Dans ce travail de thèse, nous allons donc nous focaliser sur les normes de réactions linéaires et voir quels sont les paramètres mathématiques qui les caractérisent.

Une norme de réaction linéaire est caractérisée en premier lieu par sa pente. Cette pente est le degré de plasticité d'un trait phénotypique et donc la capacité de réaction d'un génotype face aux changements environnementaux (Chevin et al., 2010). Le degré de plasticité moyen exprimé par une population tend à être adapté aux variations du milieu de vie selon le principe de la plasticité adaptative (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Hutchings, 2011). La pente résulte d'un compromis entre les différentes fonctions physiologiques, le gain de fitness et le coût de la plasticité et représente ainsi la stratégie d'une population pour exploiter un environnement donné (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995).

Les limites de la capacité de la plasticité phénotypique à maintenir la fitness individuelle en réponse aux changements environnementaux se retrouvent dans certaines normes de réaction linéaires qui sont alors discontinues. Ces limites se caractérisent par un point de bascule

(plusieurs dans certains cas) qui est une valeur d'intensité de variation environnementale au-delà de laquelle il y a une rupture de pente et un changement drastique dans la norme de réaction (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010). Cette rupture s'exprime généralement par une augmentation, une diminution, ou un changement du signe de la pente (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010; Hutchings, 2011). Ces normes de réactions discontinues sont difficiles à identifier dans la littérature où elles sont présentées sous une grande variété de noms dont les plus fréquents sont *piecewise linear regresssion*, *segmented linear regression* et *discontinuous reaction norm* que l'on pourrait traduire par régression linéaire segmentée (Hutchings, 2011; Muggeo, 2020; Proum et al., 2017). De la même manière, la littérature se réfère aux points de bascule sous une multitude de noms qui compliquent leur conceptualisation et leur identification, dont, entre autres, *evolutionary point*, *tipping point*, *switch point*, *breaking point*, *breeding value* et aussi des termes à la signification plus ambiguë tels que *limit* et *threshold* (Bednaršek et al., 2019, 2021; Botero et al., 2015; Calosi et al., 2019; Chevin et al., 2010; Hutchings, 2011; Sommer, 2020).

Toute modification du phénotype a un coût et il n'est donc pas avantageux pour un organisme de dépasser le point de bascule au-delà duquel la norme de réaction change brusquement (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995). Bien souvent ce point correspond à l'intensité de variation environnementale maximale rencontrée par une population dans son environnement et résulte ainsi directement d'une plasticité adaptative (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010). Au-delà, la population entre dans une zone d'inconnu environnemental, i.e. conditions jamais rencontrées dans son histoire évolutive récente, où sa stratégie d'exploitation du milieu n'est plus adaptée. La plasticité phénotypique « sature » alors, résultant en une brusque modification de la pente de la norme de réaction (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010). Au-delà du point de bascule, la réaction de la plasticité phénotypique est

difficilement prédictible et peut par exemple devenir maladaptative et éloigner la valeur du trait de la valeur optimale pour la fitness (Gibert et al., 2019). Dans ce cas, l'organisme échoue à interpréter les signaux extrêmes envoyés par son environnement et qui sont inédits dans son histoire évolutive. La fitness est ainsi compromise altérant les chances de survie et de persistance de la population face aux changements environnementaux. De plus, la modification extrême du phénotype au-delà du point de bascule résulte le plus souvent en une altération critique de l'homéostasie, i.e. équilibre des fonctions vitales de l'organisme, résultant, bien souvent, en une mort rapide (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010).

*Exemple : Différentes normes de réaction présentant un point de bascule en fonction de la température chez l'ombre commun *Thymallus thymallus* sont présentées dans la revue de Hutchings (2011) et reproduites en Figure 4 en guise d'illustration. Il est à noter que ces normes de réaction sont différentes dans leurs pentes pour trois populations différenciées génétiquement et reflètent ainsi différentes stratégies d'adaptation à différents milieux de vie.*

Les pentes et points de bascule des normes de réaction jouent un rôle clé dans le maintien de la fitness des individus exposés à des changements environnementaux. Ces paramètres sont codés génétiquement, héréditaires, et soumis à la sélection conditionnant donc en grande partie l'évolution des espèces (Bitter et al., 2021; Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). La pente résulte ainsi d'un compromis afin de minimiser les coûts induits par la plasticité et de rester compétitif selon la variabilité de l'environnement (Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995). Quant au point de bascule, s'il est excédé, l'adaptation est nécessaire pour maintenir la fitness des organismes ou alors la population déclinera et s'éteindra sous l'effet des changements environnementaux (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010). Ce point de bascule détermine donc la limite environnementale au-delà de laquelle l'adaptation génétique, mais aussi les phénomènes d'adaptation non-génétiques et

épigénétiques, entrent en jeu pour maintenir la fitness et limiter le risque d'extinction de la population (Botero et al., 2015; Donelson et al., 2018). Ces différents concepts et la manière dont le point de bascule peut être soumis à la sélection, sont illustrés en Figure 5. Il est toutefois important de noter que certains traits phénotypiques sont sélectionnés sur la base de leur valeur moyenne exprimée et non sur leur norme de réaction (Gotthard & Nylin, 1995).

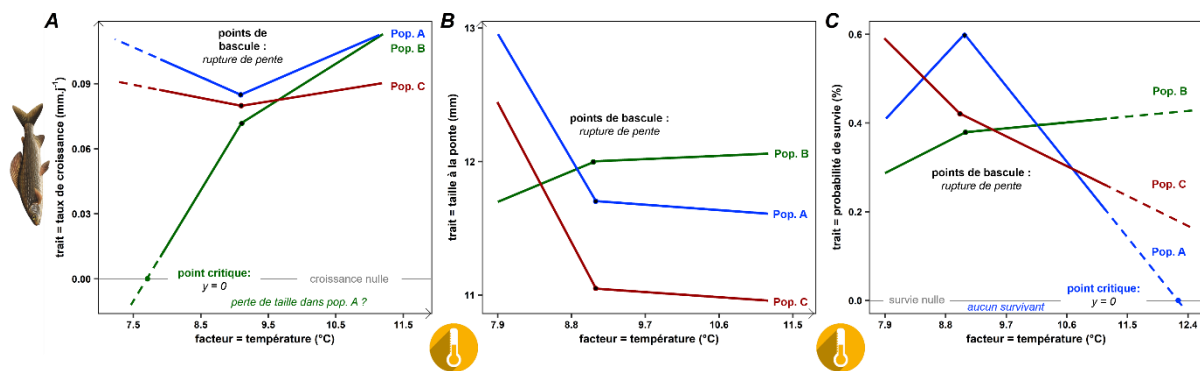
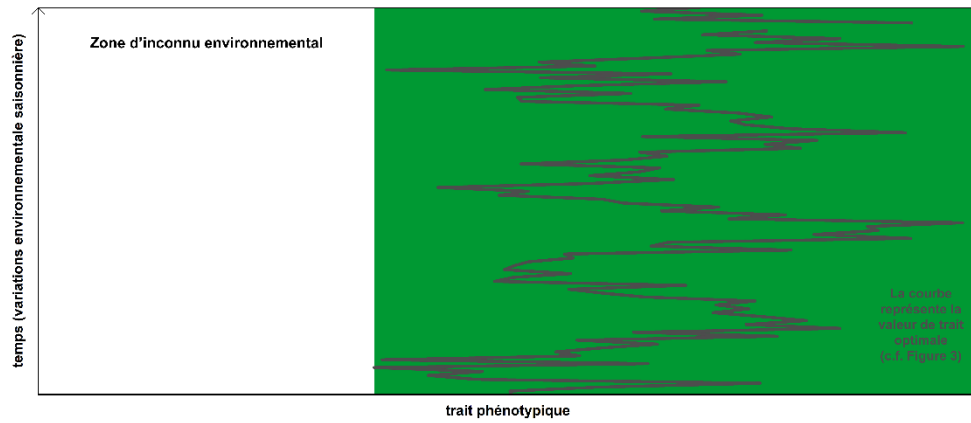
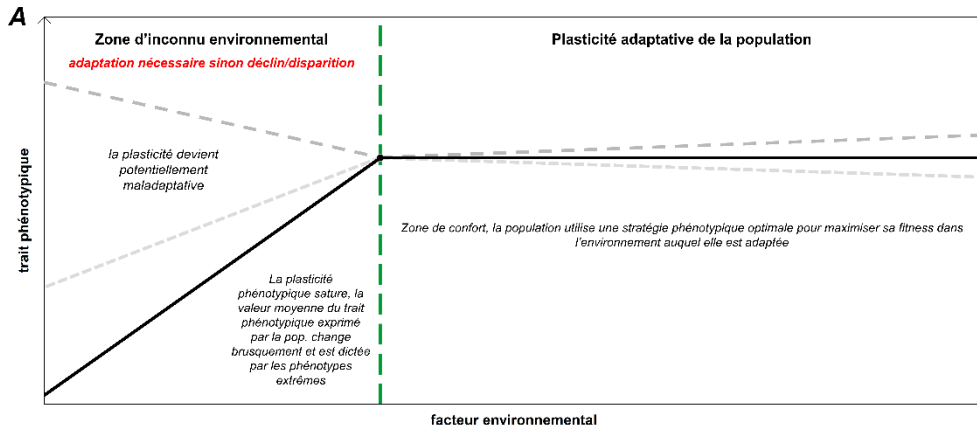


Figure 4. Normes de réaction à la température chez l'ombre commun, *Thymallus thymallus*. Ces exemples sont extraits de Hutchings (2011). Les normes de réaction de trois caractères phénotypiques sont ici représentées en fonction de la température pour trois populations génétiquement différenciées d'ombre commun adaptées à des milieux de vie différents. Il est intéressant de constater que les points de bascule physiologiques sont globalement les mêmes et varient autour de 9°C pour les trois caractères phénotypiques et les trois populations. Ces points de bascule physiologiques ne relèvent donc pas d'une adaptation au milieu de vie mais probablement d'une histoire évolutive plus ancienne. En revanche, les pentes, i.e. degrés de plasticité, des normes de réaction sont très différentes pour les trois populations, au-dessus et en dessous des points de bascule et représentent donc différentes stratégies de maintien de la fitness via la plasticité phénotypique. Cela correspond donc, vraisemblablement, à une plasticité adaptative au milieu de vie. Les données extraites de la publication de Hutchings (2011) sont représentées par les traits pleins. Les traits pointillés sont des extrapolations linéaires afin de prolonger les normes de réaction originale. Dans le cas du (A) taux de croissance et de la (C) probabilité de survie, elles nous permettent de déterminer la présence d'éventuels « points critiques » où le paramètre mesuré est égal à zéro (qui n'ont pas été déterminés par l'auteur). Abbréviation : pop. = population



changement environnemental : augmentation des événements extrêmes (e.g. anthropocène)

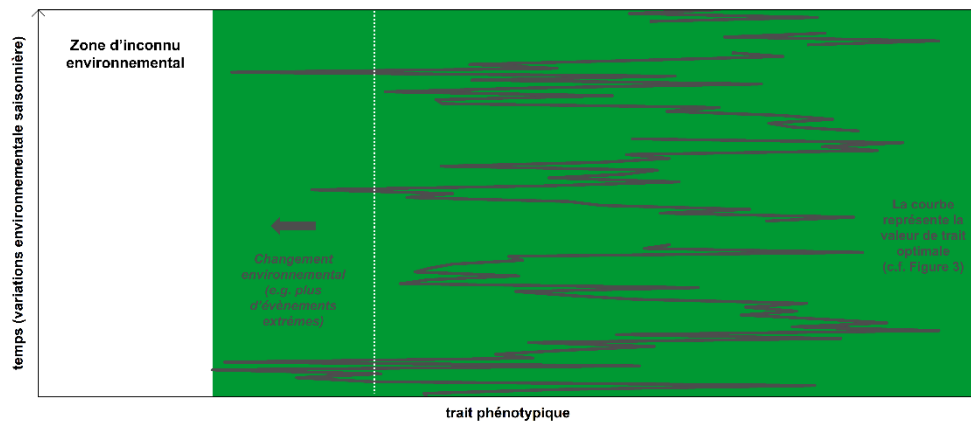
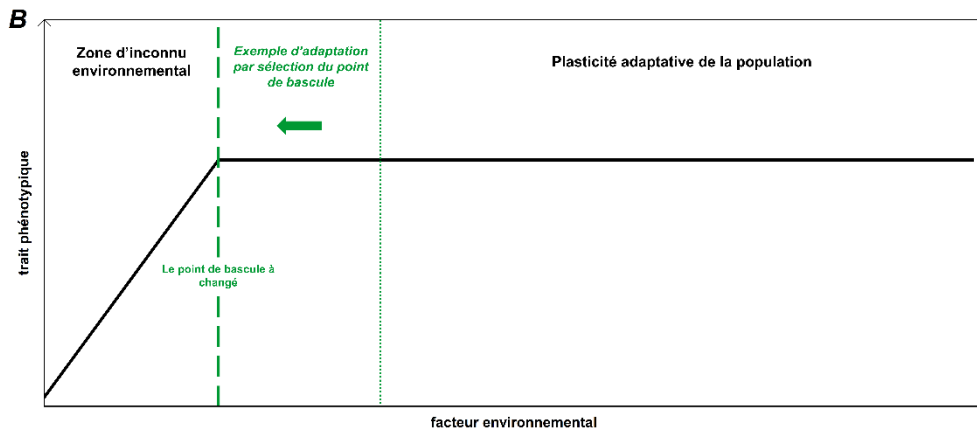


Figure 5. Points de bascule et changements environnementaux. Cette figure explique le principe d'évolution des points de bascule en fonction des changements environnementaux pouvant se produire dans l'anthropocène. Pour chaque partie (A) et (B), le panneau du haut représente une norme de réaction linéaire segmentée, à un instant donné (valeur moyenne exprimée par la population) en fonction de l'intensité d'un facteur environnemental. Pour chaque partie (A) et (B), le panneau du bas représente l'évolution de la valeur optimale du trait phénotypique en fonction du temps et des variations environnementales et est donc une représentation de la plasticité phénotypique et du potentiel adaptatif de la population. Pour mieux comprendre cette partie, il faut se référer à la Figure 3 dont elle est extraite.

La détermination des normes de réaction a donc un potentiel élevé pour étudier l'effet des changements globaux sur la persistance des espèces. Toutefois, elle demande la mise en place d'une méthodologie complexe pour pouvoir être mesurée et modélisée.

III.4. Comment déterminer des normes de réaction ? Points clés, zones d'ombre et approches méthodologiques

« La sensibilité environnementale doit être estimée en mesurant la sélection phénotypique sur un gradient environnemental continu ».

Chevin et al., 2010

Un important travail de synthèse a récemment été conduit par plusieurs auteurs et a permis d'identifier les points clés et les questions à résoudre dans l'étude des normes de réaction aux changements globaux (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Hutchings, 2011). La réponse à ces questions permettra d'améliorer notre compréhension du potentiel adaptatif des espèces. Ces différents points sont listés ci-dessous et constituent la base sur laquelle est construite ce travail de thèse.

Aujourd'hui, l'écrasante majorité des études s'intéressant à la tolérance des organismes aux changements globaux reposent sur des approches exposant les organismes à quelques

conditions environnementales discontinues (majoritairement deux ou trois) (Chevin et al., 2010; Donelson et al., 2018; Gibert et al., 2019). Ces conditions environnementales sont généralement des « scénarios » choisis par les auteurs pour représenter la condition ambiante observée actuellement dans le milieu de vie et les conditions prévues dans un futur proche, e.g. 2100. Cette méthode présente deux inconvénients majeurs qui limitent sa capacité à déterminer le potentiel d'une espèce à persister face aux changements globaux. Tout d'abord, la comparaison d'un trait phénotypique dans quelques conditions environnementales, ne permet pas d'appréhender la forme d'une norme de réaction et de déterminer statistiquement la présence d'un ou plusieurs points de bascule (Carrier-Belleau et al., 2022; Chevin et al., 2010). De plus, cette méthode suppose une connaissance étendue de la variabilité environnementale rencontrée par l'espèce dans son milieu de vie (Carrier-Belleau et al., 2022; Chevin et al., 2010; Donelson et al., 2018; Gibert et al., 2019). Cette connaissance est souvent lacunaire voire biaisée en l'absence de longues séries temporelles de mesures. Cela est particulièrement le cas pour des espèces constituées de populations différenciées vivant dans des mosaïques d'habitat aux conditions très variables à l'échelle locale (Donelson et al., 2018). En conséquence, les conditions expérimentales choisies correspondent souvent à des conditions environnementales qui sont déjà rencontrées actuellement par l'individu dans son milieu de vie et sont donc peu informatives sur le potentiel de persistance des espèces face aux changements globaux (Chevin et al., 2010). Les limites des approches par scénario (sélection de quelques conditions environnementales basée sur des *a-priori*), pour étudier le potentiel adaptatif des populations aux changements globaux par rapport à l'utilisation des normes de réaction, sont présentées en Figure 6.

Il existe autant de normes de réaction qu'il y a de traits phénotypiques. La norme de réaction d'un caractère est un compromis évolutif avec les normes de réaction de tous les autres

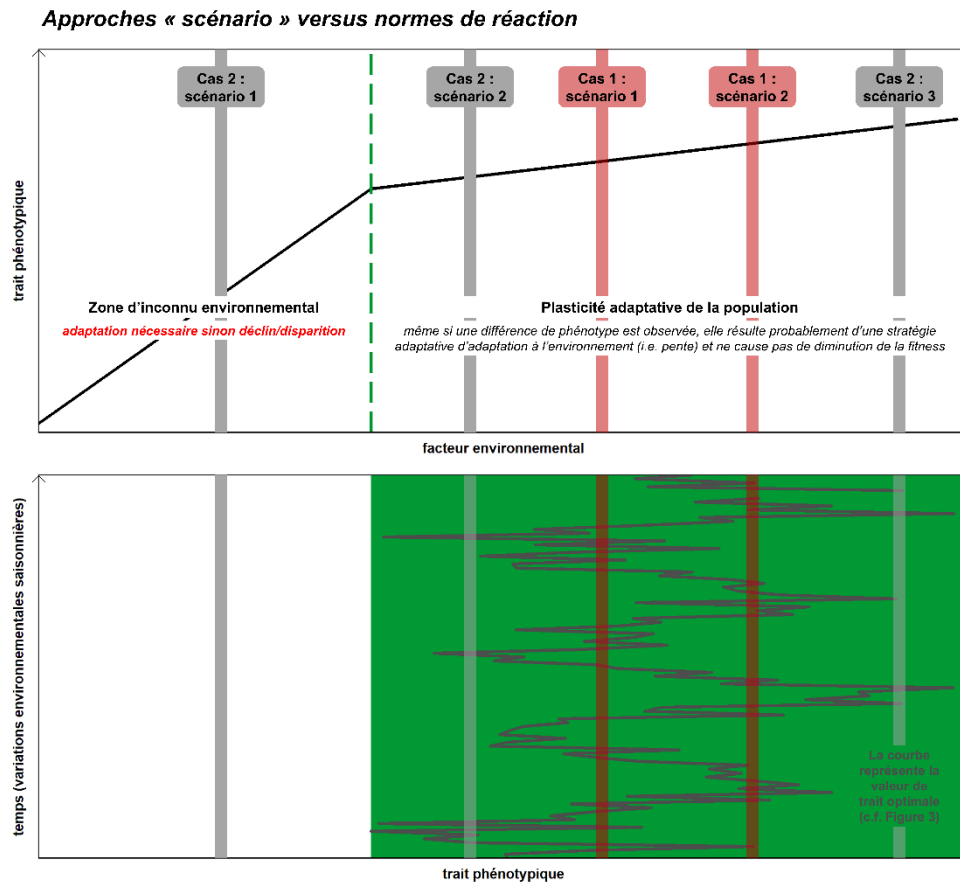


Figure 6. Limites des approches en scénario et avantages des normes de réaction dans l'étude des changements globaux. Le panneau du haut représente l'établissement d'une norme de réaction sur une large gamme de variations environnementales qui permet de déterminer les points de bascules et les pentes (voir Figure 5). Cette norme de réaction permet d'identifier la « zone d'inconnu environnemental » où l'adaptation est nécessaire pour maintenir la fitness de la population (point de bascule) afin d'éviter son éventuel déclin et sa disparition sur le long-terme. Deux exemples d'approches en scénario sont représentés par des rectangles gris pour le « cas 1 » (trois conditions testées) et le « cas 2 » (2 conditions testées). Dans le cas 1 (rouge), la population est dans sa zone « de confort » où la plasticité est adaptative. Si une augmentation ou une diminution de la valeur du trait phénotypique est mesurée, il est difficile de conclure à un impact du facteur environnemental sur la fitness de la population (i.e. pente = degré de plasticité résultant d'une adaptation locale). Dans le cas 2 (gris), l'une des conditions testées se trouve dans la zone où la fitness de la population est compromise et où l'adaptation est nécessaire. Toutefois, l'approche « scénario » ne permettra pas de déterminer la valeur du point de bascule de manière statistiquement robuste.

caractères phénotypique visant à maximiser la fitness globale de l'organisme (Chevin et al.,

2010). En effet, les ressources énergétiques d'un organisme ne sont pas infinies, surtout en situation de stress, et doivent être réparties entre les différentes fonctions physiologiques afin de maximiser la fitness et la survie (Sokolova, 2021; Sokolova et al., 2012a). En plus d'être liées par la répartition des besoins énergétiques, les normes de réaction sont également liées par les différents gènes codant la plasticité chez un individu. En effet, ceux-ci agissent par « paquets de gènes » (i.e. pléiotropie *versus* épistasie) et codent bien souvent plusieurs traits phénotypiques à la fois (DeWitt et al., 1998; DeWitt & Scheiner, 2004). Ces gènes jouant un rôle pivot dans la réponse plastique des organismes restent pour l'instant largement méconnus, tout comme les groupes fonctionnels auxquels ils appartiennent, et doivent être déterminés (Murren et al., 2015). Pour résoudre cette lacune il convient d'étudier quantitativement l'évolution de l'expression de l'entièreté du génome via la transcriptomique.

La modification d'une norme de réaction entrainera bien souvent la modification des autres normes de réaction par effet de « vase communicant » via l'expression des gènes et la bioénergétique. Ce principe fondamental fait qu'il existera des similitudes et des patterns communs entre les différentes normes de réaction des différents caractères phénotypiques d'une population (voir Figure 4). Par exemple, bon nombre d'entre elles présenteront des points de bascule similaires. Il convient donc impérativement d'utiliser des approches holistiques déterminant les normes de réaction des principaux caractères phénotypiques conditionnant la fitness et la survie des organismes (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Donelson et al., 2018; Gibert et al., 2019; Hutchings, 2011; Sommer, 2020). L'association de plusieurs normes de réaction permettra d'identifier les points de bascules similaires afin de déterminer le seuil de tolérance global. Au-delà de cette valeur d'intensité environnementale, la persistance des espèces est fortement compromise à court-terme.

Il est également nécessaire de combiner les normes de réaction macro-physiologiques, i.e. à l'échelle de l'organisme, à des approches moléculaires. Pour cela, les approches omiques sont à privilégier (Murren et al., 2015; Sommer, 2020). En effet, l'échelle la plus rapide d'expression de la plasticité phénotypique est l'échelle moléculaire (e.g. expression des gènes) qui peut répondre à court-terme (secondes, heures) aux changements environnementaux, alors que les changements macrophysiologiques (e.g. modification morphologique) interviennent souvent à beaucoup plus long-terme (semaines, années) (West-Eberhard, 1989). Il sera donc possible de détecter des marqueurs de plasticité phénotypique à l'échelle moléculaire qui pourraient être invisibles à l'échelle macrophysiologique sur de courtes échelles de temps. La transcriptomique, i.e. mesure de l'expression de l'ensemble du génome, est un indicateur de premier plan qui doit être intégré à la détermination des normes de réaction (Murren et al., 2015; Sommer, 2020). La plasticité est également régulée, dans une certaine mesure, par d'autres phénomènes intervenant à l'échelle moléculaire, qui sont non-génétiques, i.e. épigénétiques, hormonaux (DeWitt & Scheiner, 2004). Ces phénomènes régulent l'expression des gènes et/ou l'activation des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse plastique des organismes. Toutefois, cette régulation non-génétique de la plasticité reste pour l'instant largement méconnue et doit être déterminée en intégrant d'autres approches omiques que la transcriptomique, telles que la métabolomique et la protéomique, aux normes de réaction (Murren et al., 2015; Sommer, 2020).

La réversibilité des impacts des changements environnementaux occasionnés au-delà du point de bascule doit également être déterminée lorsque les conditions environnementales redeviennent optimales (voir recommandations de Bednaršek et al., 2021 pour identifier les points de bascule dans le contexte de l'acidification des océans). En effet, l'anthropocène se caractérise par une alternance d'évènements extrêmes et de périodes de répit où les conditions

redeviennent optimales pour la physiologie de l'organisme (IPCC, 2014), impliquant une potentielle récupération (Gunderson et al., 2016). La capacité de récupération des organismes est un type particulier de plasticité qui conditionne la résilience, i.e. retour à un état initial, des organismes après avoir expérimenté un épisode de stress environnemental aigu (Gabriel, 2005; Schulte et al., 2011). Un organisme ayant subi un retard de croissance après avoir été privé de nourriture peut par exemple, lorsqu'il est de nouveau nourri, augmenter son taux de croissance afin de rattraper son retard et supprimer l'impact du stress sur sa fitness (Bohman, 1955; Dmitriew, 2011). Cette capacité de récupération doit être étudiée dans le cadre des normes de réaction et déterminera le rôle évolutif joué par les points de bascule (Bednaršek et al., 2021). En effet, si les effets observés en dessous du point de bascule pour un trait physiologique peuvent être totalement compensé lorsque les conditions redeviennent favorables, leur rôle évolutif sera moindre.

Pour vérifier la théorie selon laquelle les points de bascule et pente des normes de réaction sont déterminés par l'adaptation aux changements environnementaux il faudrait idéalement suivre les normes de réaction sur plusieurs générations. Une manière détournée et plus simple à mettre en place est de comparer les normes de réaction de populations ou d'espèces phylogénétiquement proches, vivant dans des milieux différents (Donelson et al., 2018; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011; Murren et al., 2015; Sommer, 2020). De cette manière, il est possible de vérifier si le degré de plasticité d'une espèce/population est adapté à son milieu et de voir si les points de bascules correspondent effectivement aux conditions environnementales les plus extrêmes y étant rencontrées. La tendance à l'érosion de la plasticité phénotypique fait que les espèces vivant en milieu de vie stable et peu variable ont tendance à avoir une faible plasticité phénotypique et un potentiel adaptatif limité. Elles seront donc plus vulnérables aux changements globaux et événements extrêmes rencontrés pendant

l'anthropocène (Bitter et al., 2021). Ainsi, les espèces vivant en zones polaire et tropicale et qui sont exposées à peu de variations environnementales seront théoriquement plus sensibles aux changements globaux que celles vivant en zones tempérées (Bitter et al., 2021).

*Exemple : Différentes normes de réaction présentant un point de bascule en fonction de la température chez l'ombre commun *Thymallus thymallus* sont présentées dans la revue de Hutchings (2011) et reproduites en Figure 4 en guise d'illustration. Les normes de réaction sont différentes dans leur pente pour trois populations différenciées génétiquement et reflètent ainsi différentes stratégies d'adaptation à différents milieux de vie. En revanche, les points de bascule sont similaires pour les trois populations reflétant probablement une histoire évolutive commune, à plus long-terme. Ici, les points de bascule n'ont pas été sélectionnés différenciellement par le milieu de vie des populations. Cet exemple démontre l'intérêt de comparer les normes de réaction de populations génétiquement différenciées et/ou d'espèces phylogénétiquement proches afin d'obtenir des informations précieuses sur la plasticité adaptative.*

Les normes de réaction seront multidimensionnelles si plusieurs changements environnementaux ont lieu dans le même temps en conditions de multi-stress (Chevin et al., 2010). Cela peut impliquer la présence de plusieurs points de bascules et pentes, compliquant drastiquement l'interprétation des résultats observés. Pour cette raison, dans le cadre de cette thèse nous nous contentons d'étudier des normes de réaction à un facteur environnemental. Le potentiel des normes de réaction multidimensionnelles sera discuté plus en détail, en perspective, dans la discussion générale de cette thèse.

Pour évaluer le potentiel adaptatif des espèces face aux changements environnementaux, il est nécessaire de généraliser l'utilisation des normes de réaction et de mesurer la sensibilité environnementale des espèces aux changements globaux sur une large gamme de variations

environnementales (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). Cette approche a ainsi vu une augmentation majeure de son utilisation dans la plupart des domaines de recherche au cours de ces dernières décennies. La biologie marine constitue une exception où la détermination des normes de réaction reste aujourd'hui peu fréquente (Bitter et al., 2021). L'acidification des océans est le changement global dont l'impact est le plus étudié en biologie marine (Browman, 2017). Pourtant, seulement une poignée de normes de réaction ont été établies constituant une limite de la recherche sur l'acidification des océans qui doit être dépassée (Bednaršek et al., 2019, 2021).

IV. Acidification des océans et plasticité phénotypique

IV.1. L'acidification des océans : un changement sans précédent

« Le maintien des émissions de CO₂ dans les siècles à venir pourrait changer le pH des océans à un rythme plus rapide que tous les changements intervenus au cours des 300 derniers millions d'années ».

Caldeira & Wickett, 2003

L'anthropocène et plus particulièrement, depuis les années 1950, la « grande accélération » se caractérisent par un emballement des activités humaines et de leur impact sur les cycles biogéochimiques (Ceballos et al., 2020; Steffen et al., 2015) (Figure 1). L'un des effets les plus documentés est l'augmentation exponentielle des émissions de dioxyde de carbone dans l'atmosphère et leur impact climatique, dont notamment le réchauffement global des températures terrestres et océaniques (IPCC, 2021). L'océan joue toutefois un rôle majeur dans la régulation des changements climatiques en absorbant une grande partie du CO₂ émis dans l'atmosphère, e.g. 31% des émissions entre 1994 et 2007 (IPCC, 2021). Une fois aqueux, le CO₂ ne reste pas inerte et l'augmentation de sa concentration déséquilibre ainsi le cycle

biogéochimique océanique du carbone et, plus particulièrement, la chimie des carbonates. Cela résulte, à terme, en un bouleversement global de l'équilibre chimique du milieu marin appelé acidification des océans (AO). Cette partie vise à résumer les mécanismes biogéochimiques qui caractérisent l'acidification des océans. Elle se base en grande partie sur le travail de synthèse effectué par Gattuso & Hansson dans le livre « *Ocean acidification* » (2011).

Le cycle de la chimie des carbonates dans l'océan débute par l'association du CO₂ aqueux avec des molécules d'eau. Cela résulte en la formation d'acide carbonique H₂CO₃ qui se décompose rapidement en ions bicarbonate HCO₃⁻ et en protons H⁺. C'est ce relâchement de protons H⁺ qui provoque l'augmentation de l'acidité des océans et la diminution du potentiel hydrogène (pH) (Figure 7A). Le pH est une manière de quantifier l'activité des ions hydrogènes en solution selon l'équation (Sørensen, 1909) :

$$\text{pH} = -\log_{10}(\text{activité des ions H}^+)$$

L'activité des ions H⁺ détermine leur potentiel de réaction avec d'autres molécules tels que les composés organiques. Cette forte capacité à réagir avec les composés organiques fait qu'une augmentation de l'activité des ions hydrogènes aura un impact sur les organismes vivant dans les océans via l'acidose de leur milieu interne. La diminution du pH constitue donc la première facette importante de l'AO (Figure 7C).

Les ions HCO₃⁻ se dissocient naturellement en ions carbonates CO₃²⁻ et en protons H⁺. Les ions CO₃²⁻ constituent l'un des substrats qui, avec les ions calcium Ca²⁺, permet aux organismes calcifiants de précipiter des carbonates de calcium CaCO₃ sous forme de cristaux biogéniques via la calcification. Ce processus régule les changements globaux en stockant une partie du carbone émis par l'homme dans les sédiments marins après la mort des organismes (i.e. puits de carbone). Toutefois, la réaction des HCO₃ et CO₃²⁻ avec les ions H⁺ est réversible. Lorsque le pH diminue sous l'effet des actions humaines, l'équilibre des réactions est modifié

résultant à terme en une diminution de la concentration océanique en ions CO_3^{2-} (Figure 7B-C).

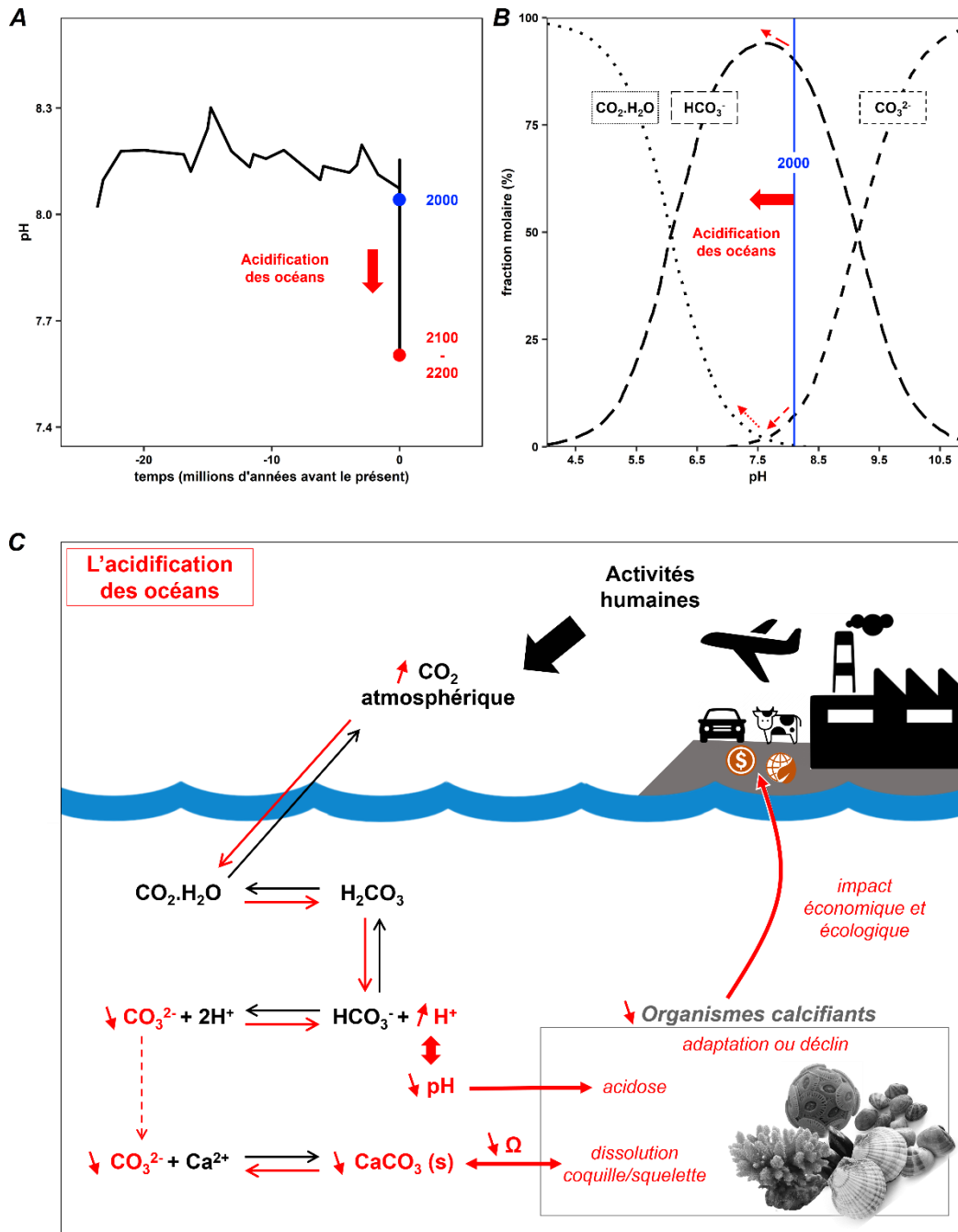


Figure 7. L'acidification des océans. (A) Evolution du pH moyen de l'océan global au cours des 25 derniers millions d'années (d'après Turley et al. dans *Avoiding Dangerous Climate Change*, 2006). (B) Diagramme de Bjerrum de spéciation du carbone inorganique dissous en fonction du pH de l'eau de mer. (C) Présentation globale de l'acidification des océans, de la chimie des carbonates et de leurs impacts sur les organismes calcifiants, les écosystèmes et les sociétés humaines.

Cette diminution de la disponibilité des ions CO_3^{2-} pour la calcification des organismes marins constitue la deuxième facette de l'AO.

Comme tout changement global dans l'anthropocène, le rythme de l'AO est extrêmement rapide à l'échelle des temps géologiques (Caldeira & Wickett, 2003). Ainsi, au cours du XXI^e siècle, la diminution du pH pourrait excéder tous les changements d'acidité s'étant produit dans les océans au cours des 300 derniers millions d'années. Plus concrètement, le pH moyen de l'océan global, qui est actuellement proche de 8.1, est resté stable autour de 8.2 depuis plusieurs millions d'années, et devrait diminuer de 0.13 à 0.33 unités entre 2000 et 2100 selon les scénarios RCP 4.5 et RCP 8.5 du GIEC (Groupement d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) (Figure 7A) (IPCC, 2021). Cela correspondrait ainsi à une augmentation de 35 à 110% de l'acidité, i.e. concentration en ion hydrogènes, dans les océans.

Aujourd'hui, les ions HCO_3^- , CO_3^{2-} et le CO_2 aqueux représentent respectivement ~ 90 %, ~ 10 % et moins de 1 % du carbone inorganique dissous (IPCC, 2014). Cette proportion n'est pas uniforme dans l'océan global mais dépend de nombreux facteurs physicochimiques locaux (e.g. pression, température, salinité). La proportion d'ion carbonate devrait en revanche diminuer drastiquement avec le pH au cours du XXI^e siècle, et pourrait être divisée par deux en 2100 (RCP 8.5) (Figure 7B). Le taux de saturation en CaCO_3 , Ω , est une manière de visualiser cette réduction de la disponibilité en ions carbonates pour la calcification des organismes (Corliss & Honjo, 1981). Il se définit par l'équation :

$$\Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{océan}} [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{océan}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{saturation}} [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{saturation}}}$$

Ce coefficient détermine l'équilibre de la réaction de précipitation des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} en cristaux biogéniques de CaCO_3 . Lorsque Ω est supérieur à 1, l'eau est sursaturée en CaCO_3 et la précipitation est favorisée (Corliss & Honjo, 1981). A l'inverse, lorsque Ω est inférieur à 1,

l'eau est sous-saturée en CaCO_3 et les structures calcaires biogéniques, telles que les exosquelettes (coraux), les thalles (algues), les tests (coccolithophores) et les coquilles (mollusques), tendent à se dissoudre. En réalité, il existe plusieurs types de CaCO_3 biogéniques dont les plus répandus sont la calcite et l'aragonite. On différenciera donc Ω_{CA} pour la calcite et Ω_{AR} pour l'aragonite, la calcite étant moins soluble que l'aragonite dans l'eau de mer (Mucci et al., 1989) et donc plus résistante à l'AO. Les zones océaniques sous-saturées en CaCO_3 et peu favorables pour le développement des organismes calcifiants devraient s'étendre drastiquement au cours de l'anthropocène, impactant un nombre croissant d'espèces et de populations (IPCC, 2019, 2021).

La solubilité du CO_2 gazeux dans l'eau de mer dépend de plusieurs paramètres, dont la température, et les milieux océaniques seront donc impactés différenciellement par l'OA selon leurs caractéristiques physicochimiques (IPCC, 2019, 2021). Tout particulièrement, les zones tropicales seront moins affectées par l'AO alors que les zones polaires seront les plus vulnérables (Jiang et al., 2019). Ainsi, en 2100, le pH futur pourrait être, en moyenne, 0.47 unités plus faible en zones polaires qu'en zones tropicale et la Ω_{AR} y être 50% moins élevée. Les zones tempérées, à forte variabilité environnementale journalière, saisonnière et annuelle, subiront des impacts très divers et fragmentés selon les zones géographiques (IPCC, 2021). Les conditions d'acidification futures sont donc difficiles à prédire à l'échelle locale (IPCC, 2019; Takeshita et al., 2015) et ce d'autant plus, qu'elles seront intensifiées par d'autres facteurs environnementaux tels que l'eutrophisation et l'hypoxie (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). De plus, en zones côtières, les scénarios d'acidification prévus par le GIEC, pour l'océan global de surface sont irréalistes dans la plupart des cas à cause de l'influence combinée des feedbacks biologiques (e.g. production primaire), de l'influence des précipitations, des apports

terrestres et de phénomènes locaux d'*upwelling* (Mathis et al., 2011; Takeshita et al., 2015; Vargas et al., 2017).

Les changements induits par l'AO sont considérables et sans précédent dans l'histoire évolutive récente des espèces marines. Beaucoup d'organismes seront impactés à l'échelle d'une vie, ou de quelques générations et devront donc s'acclimater via leur plasticité phénotypique qui conditionnera leur potentiel adaptatif et leur persistance dans l'anthropocène. Les réactions à l'AO sont très variables selon les groupes phylogénétiques d'organismes marins et il serait fastidieux d'en dresser une liste complète ici (Kroeker et al., 2013). Dans cette introduction générale, nous nous focalisons donc uniquement sur la réponse des organismes calcifiants à l'AO, et plus particulièrement des mollusques coquilliers, qui subissent les effets combinés de la diminution du pH et de la disponibilité en carbonates.

Les mollusques coquilliers sont pour la plupart des espèces ingénieuses structurant leur écosystème et/ou constituant la base de réseaux trophiques complexes (Coen et al., 2007; Grabowski et al., 2012; Harley, 2006; Kohn & Leviten, 1976; McLean, 1983). Certaines espèces, comme les huîtres ou les moules, forment des récifs qui sont des habitats complexes abritant une importante biodiversité pour laquelle elles servent d'abri, de zone de reproduction et/ou de nurserie. Elles protègent aussi les côtes de l'érosion et, pour les suspensivores, améliorent la qualité de l'eau (i.e. turbidité) et stabilisent les sédiments favorisant la productivité des écosystèmes (Asmus & Asmus, 1991; Coen et al., 2007, 2007; Grabowski et al., 2012). Ces services écosystémiques ont une valeur très importante pour les sociétés humaines (Grabowski et al., 2012). De plus, les mollusques coquilliers dominent les productions aquacoles marines en terme de masse produite et représentaient ainsi un marché de 69.3 milliards d'US dollars en 2018 (FAO, 2020). Ainsi, tout déclin ou baisse des

performances physiologiques des mollusques coquilliers exposés à l'AO pourrait avoir un impact important sur les écosystèmes et les sociétés humaines qui en dépendent (Figure 7C).

IV.2. Quels sont les impacts généraux de l'acidification des océans sur la physiologie des mollusques coquilliers ?

Les mollusques coquilliers sont parmi les espèces dont la vulnérabilité à l'AO a été la plus étudiée au cours des deux dernières décennies. Des travaux de synthèse ont permis d'identifier les patterns globaux de leur réponse physiologique à la diminution du pH et de la disponibilité en carbonates (Byrne & Fitzner, 2019; Clark, 2020; Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013; Strader et al., 2020). Les réponses physiologiques sont très variées entre les taxons et parfois même entre populations d'une même espèce (Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). De plus, les conditions d'acidification et d'élevage (e.g. système d'élevage fermé *versus* flux ouvert, température, nourriture) appliquées à l'étude des organismes sont extrêmement variables et compliquent l'identification de patterns communs de réponse (Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). Dans cette partie, nous allons présenter les principaux patterns de la réponse phénotypique des mollusques coquilliers à l'AO sans s'attarder sur les réponses spécifiques. Les études ont pu utiliser des facteurs de la chimie des carbonates différents pour mesurer l'impact de l'AO, principalement le pH, la pression partielle en CO₂ dissous (pCO₂) et les Ω (Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). Ici, nous avons ramené les résultats observés à leur relation au pH afin de faciliter la compréhension. Lorsque nous évoquerons les effets de l'acidification sur la physiologie des organismes, il s'agira de ceux relatifs à une diminution de 0.3-0.4 unités de pH par rapport au niveau ambiant (i.e. 8.0-8.2), correspondant aux scénarios d'acidification prévu par le GIEC pour l'océan global de surface, à l'horizon 2100. Ces scénarios ont en effet été appliqués par l'écrasante majorité des études, dont les résultats sont synthétisés ci-dessous.

Le pH détermine le maintien de l'équilibre cellulaire interne, des activités métaboliques et de la calcification (Cyronak et al., 2016). En effet, l'acidification pousse les organismes à investir une grande partie de leur énergie dans le maintien d'un gradient favorable de protons H^+ entre l'extérieur et l'intérieur du milieu cellulaire. D'une part, ce gradient assure le maintien de la production d'énergie et du fonctionnement des transporteurs membranaires déterminant le métabolisme, l'équilibre osmotique et, plus globalement, le maintien de l'homéostasie (Collard et al., 2014; Gattuso & Hansson, 2011; Michaelidis, Haas, et al., 2005a; Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005; Rudnick, 1987). D'autre part, les protons H^+ sont un déchet, sous-produit, de la calcification et doivent être éliminés pour pouvoir maintenir la biominéralisation (Cyronak et al., 2016; Ramesh et al., 2020). Le phénomène d'acidose interne survient lorsque les organismes ne peuvent plus maintenir leur homéostasie acido-basique à cause de l'AO qui augmente les coûts de régulation (Hannan et al., 2016; Lannig et al., 2010; Ramesh et al., 2020). Ce phénomène est observé chez un grand nombre d'organismes mais est très variable selon les espèces et l'intensité de l'acidification. Ainsi une diminution 0.3-0.4 unités de pH sera critique pour certains mais supportable jusqu'à -0.7 unités pour d'autres (Gazeau et al., 2013; Lannig et al., 2010). Certaines espèces peuvent utiliser la dissolution de leur coquille par l'AO afin de maintenir leur équilibre acido-basique interne (Hannan et al., 2016; Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005). En effet, cela solubilise des ions HCO_3^- qui tamponnent le milieu interne et augmentent le pH. La forte augmentation des coûts énergétiques pour le maintien de l'équilibre acido-basique (transport transmembranaire actif d'ions) peut impacter l'énergie allouée au maintien d'autres fonctions physiologiques telles que la réponse immunitaire et, plus généralement, la capacité des organismes à répondre à des stress additionnels (e.g. choc thermique) (Ellis et al., 2015; Manríquez et al., 2019).

Le pH intracellulaire jouerait également un rôle clé dans le maintien de la calcification (Cyronak et al., 2016). En effet, l'activité des protons H^+ conditionne la spéciation du carbone inorganique dissous dans le milieu intracellulaire et favorise ainsi la transformation en ions HCO_3^- ou en ions CO_3^{2-} (Figure 7B). L'organisme essaiera donc de maintenir un pH intracellulaire élevé afin de maintenir l'équilibre de spéciation en faveur des CO_3^{2-} et ainsi maintenir un Ω favorable à la précipitation du $CaCO_3$. C'est l'hypothèse de la « limitation de la calcification par le flux de protons H^+ » (Cyronak et al., 2016; Rajan et al., 2021). Dans tous les cas, alors qu'une diminution de la calcification est observée chez certains organismes dans les conditions futures d'AO, la calcification peut souvent être maintenue à des pH beaucoup plus faible (très inférieurs à 7.7-7.8) (Rajan et al., 2021). Certains auteurs concluent donc que l'AO ne pose pas un problème de maintien de la calcification pour les espèces mais d'avantage un problème de dissolution de la coquille (Rajan et al., 2021).

La majeure partie des espèces subissent en effet une dissolution de leur coquille par l'AO (Byrne & Fitzner, 2019; Chadwick et al., 2019; Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). Dans certains cas, cela est favorisé par la délamination du periostracum, qui est la couche organique protégeant la coquille du milieu extérieur (Alma et al., 2020; Bressan et al., 2014; Peck et al., 2016, 2018; Rajan et al., 2021; Zhao et al., 2020). Dans ce cas, si les eaux sont sous saturées en $CaCO_3$, i.e. $\Omega < 1$, la face externe de la coquille, qui n'est plus protégée, se dissout directement. Cette dissolution ne peut bien souvent pas être compensée par une augmentation du taux de calcification, lui-même impacté par la diminution du pH, résultant en une diminution de l'épaisseur de la coquille (Bressan et al., 2014; Gazeau et al., 2013; Peck et al., 2018; Rose et al., 2020). De plus, même si la calcification peut être maintenue à des pH faibles, elle résulte fréquemment, lorsque le pH diminue, en l'apparition de malformations de la coquille telles que la modification des arrangements cristallins, de la densité des minéraux et de la matrice

organique (Byrne & Fitzner, 2019). Ces modifications structurelles de la coquille peuvent alors conduire à une diminution sa résistance face aux stress physiques (e.g. vagues) et aux prédateurs diminuant considérablement la fitness des organismes (Byrne & Fitzner, 2019; Wright et al., 2018).

La gaméto-génèse peut également être impactée par l'AO et résulte dans ce cas d'une altération de la balance énergétique des individus (Boulais et al., 2017; Gazeau et al., 2013; Ross et al., 2011). Dans ce cas, les gamètes peuvent être de moindre qualité (e.g. moins de réserves dans les ovocytes) impactant les générations futures (Griffith & Gobler, 2017; Y. H. Lee et al., 2020). La fécondation est généralement peu affectée par l'AO (Boulais et al., 2017, 2018; Gazeau et al., 2013). En revanche, le stade larvaire, et plus particulièrement, la formation de la première coquille, i.e. *prodissoconch*, est critique (Waldbusser et al., 2015). En effet, la diminution du pH peut provoquer des malformations de la coquille empêchant les larves de se mouvoir et de s'alimenter. Chez un grand nombre d'espèces, l'AO entraîne également des retards de développement, des retards de croissance et un allongement de la durée du stade larvaire avec des conséquences critiques pour la fitness (Espinel-Velasco et al., 2018; Przeslawski et al., 2015; Waldbusser et al., 2015). Le comportement des larves peut aussi être altéré par la diminution du pH augmentant leur vulnérabilité face à d'autres stress environnementaux tels que la prédation (altération qui peut aussi se retrouver au stade adulte) (Tresguerres & Hamilton, 2017; Wright et al., 2018). En effet, les protons H⁺ interfèrent avec les influx nerveux, notamment au niveau des récepteurs GABA. Ainsi, la survie larvaire peut être drastiquement impactée par une diminution de -0.3-0.4 unités de pH constituant un goulot d'étranglement dans l'adaptation des espèces à l'AO (Espinel-Velasco et al., 2018; Gazeau et al., 2013; Przeslawski et al., 2015; Waldbusser et al., 2015).

La réponse des organismes a également été étudiée au niveau moléculaire, notamment à l'aide d'approches -omiques telles que la transcriptomique, la protéomique et la lipidomique (Clark, 2020; Dineshram et al., 2015; Rajan et al., 2021; Strader et al., 2020; Timmins-Schiffman et al., 2014). Cela a permis d'identifier les principaux patterns de réponse dans l'expression des gènes qui conditionnent la mise en place de mécanismes de réponse au stress, de régulations acido-basiques, de compromis métabolique et de maintien de la calcification. Des listes de centaines de gènes, impliqués dans la réponse à l'AO, ont par exemple pu être constituées et représentent des bases de données majeures pour la compréhension du potentiel adaptatif des espèces (Strader et al., 2020). Toutefois, la fonction précise de la plupart de ces gènes n'a pas pu être déterminée car ces approches ne sont bien souvent pas intégrées à l'observation d'effets au niveau macro-physiologique (e.g. croissance, mortalité, calcification) (Strader et al., 2020). En conséquence, de nombreux mécanismes impliqués dans le maintien de la biominéralisation, processus clé dans la réponse à l'OA, restent à éclaircir et à déterminer (Clark, 2020; Yarra et al., 2021). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches intégrant l'utilisation de méthodes -omiques aux observations macrophysiologiques afin d'évaluer les mécanismes de la réponse physiologique des organismes aux changements globaux (Strader et al., 2020).

IV.3. Approches méthodologiques dans l'étude de l'acidification des océans

Le terme « acidification des océans » a été défini pour la première fois en 2003 par Ken Caldeira et Michael Wickett. Depuis, la recherche sur l'AO a connu une croissance exponentielle et est devenue, en à peine deux décennies, le sujet de recherche le plus productif en biologie marine (Browman, 2017), avec ~ 8694 articles publiés à ce jour (recherche « *ocean acidification* » en « *topic* » sur Web of Sciences, le 3 janvier 2022, « *all database* »). Les études

sur la réponse phénotypique des organismes exposés à l'AO ont consisté, dans l'écrasante majorité des cas, à utiliser une approche en « scénario » consistant à les exposer à quelques conditions de pH, pCO₂ ou Ω, le plus souvent deux ou trois. L'établissement de normes de réaction a été anecdotique avec seulement une dizaine d'articles publiés à ce jour dont seulement 6 sur les mollusques marins (Bamber, 1987, 1990; Dorey et al., 2013; Jager et al., 2016; H.-G. Lee et al., 2019; Ventura et al., 2016). Cette faible utilisation des normes de réaction va à l'encontre de l'évolution constatée dans les autres domaines de la recherche sur les changements environnementaux (e.g. température) et les autres taxons (e.g. plantes, mammifères, poissons, oiseaux). En effet, dans ces domaines, l'utilisation de cette approche a connu une explosion au début des années 1990 et ne cesse d'augmenter depuis (Figure 8).

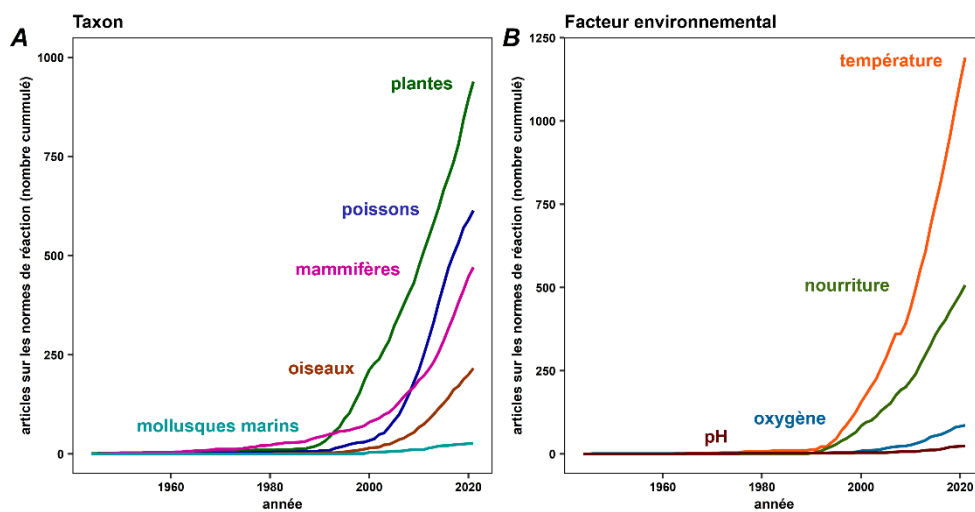


Figure 8. Evolution du nombre cumulé d'articles s'intéressant aux normes de réaction depuis 1950. Ces données ont été compilées depuis Web of Science (03/01/22) en recherchant les formules suivantes dans la section « topic » (titre, abstract et keywords) de la base « all database » : « reaction norm* » AND « plant », « reaction norm* » AND « fish* », « reaction norm* » AND « mammal* », « reaction norm* » AND « bird* », « reaction norm* » AND (« mollusk* » OR « mollusc* ») AND (« ocean » OR « marine »), « reaction norm* » AND « temperature », « reaction norm* » AND « food », « reaction norm* » AND « oxygen » et enfin « reaction norm* » AND « ph ».

L'établissement de normes de réaction représente pourtant l'approche la plus adaptée pour évaluer la capacité des espèces à perdurer face aux changements globaux (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). Dans le domaine de l'AO, la détermination de points de bascule et de seuils de tolérance serait particulièrement intéressante. En effet, ils sont représentatifs de la sensibilité des espèces et pourraient être facilement communiqués aux décideurs politiques et économiques pour gérer la conservation des zones côtières et des activités aquacoles (Bednaršek et al., 2019, 2021). Ces points de bascule pourraient également être intégrés dans des modèles à large échelle afin de modéliser les risques représentés par l'AO pour les organismes calcifiants, selon les zones géographiques (une fois la variabilité environnementale connue).

Les premières études des effets du pH sur les mollusques coquilliers ont pourtant établi des normes de réactions dès la fin des années 1980 (Bamber, 1987, 1990). Dans ces travaux pionniers, Roger Bamber a ainsi décrit les normes de réaction sur une gamme de pH allant de 8.3 à 3.5 chez la palourde, *Venerupis decussata*, l'huître plate *Ostrea edulis*, l'huître creuse *Crassostrea gigas* et la moule *Mytilus edulis* (Figure 9). Il a ainsi identifié la présence d'un seuil de tolérance global à pH 7.1-7.0 où se trouvent les points de bascule en dessous desquels les performances physiologiques sont altérées (e.g. croissance, alimentation). L'intégrité de la coquille et du periostracum sont, quant à eux, rapidement impactés lorsque le pH diminue (7.7-7.6) et représentent ainsi le paramètre le plus sensible à l'acidification. Malgré leur aspect pionnier, ces résultats sont toutefois difficilement exploitables car l'échelle de pH employée par l'auteur est inconnue. De plus, l'eau a été acidifiée par ajout d'acide sulfurique ayant probablement altéré d'autres paramètres de la chimie de l'eau de mer qui pourraient avoir affecté les organismes (voir Gazeau et al., 2013 pour revue).

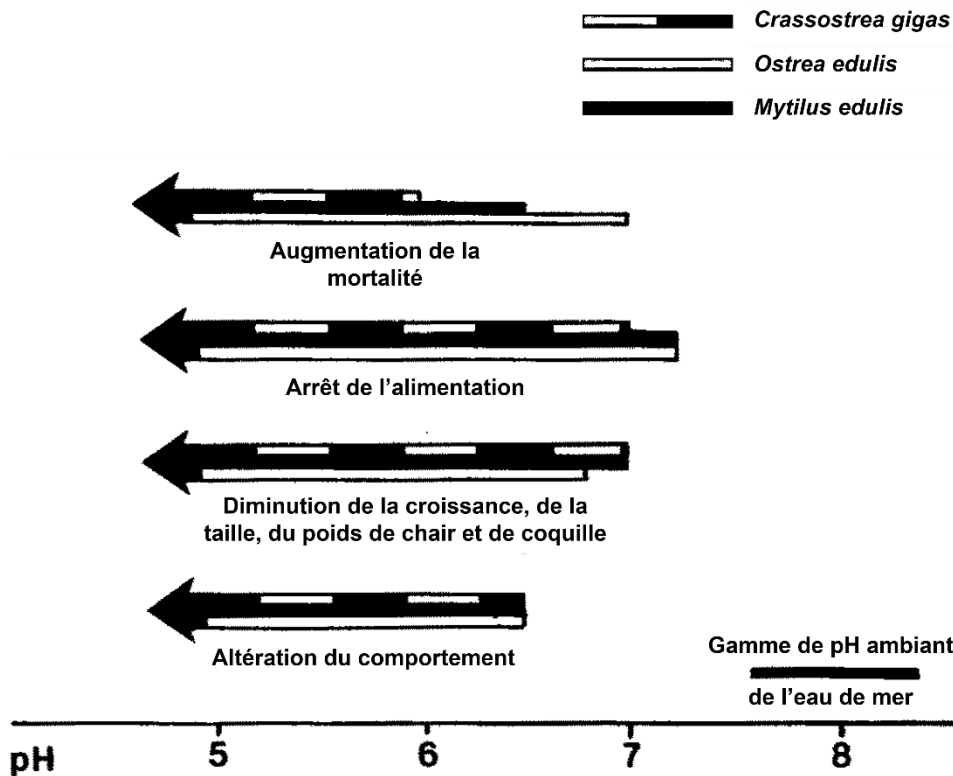


Figure 9. Normes de réaction déterminée par Roger Bamber en 1990 chez l’huître creuse, l’huître plate et la moule bleue. Ces résultats ont depuis été considérés comme étant inexploitable du fait de biais méthodologiques (voir Gazeau et al., 2013 pour revue).

L’utilisation de normes de réaction dans l’étude de l’AO a par la suite été rejetée car jugée irréaliste quant aux scénarios futurs d’acidification prévus par le GIEC (voir Gazeau et al., 2013 pour revue). Par conséquent, les points de bascule et les seuils de tolérance à l’AO, qui conditionnent en grande partie le potentiel adaptatif, restent aujourd’hui méconnus pour l’écrasante majorité des espèces (Bednaršek et al., 2019, 2021). L’existence de tels points de bascules a pourtant été suggérée chez plusieurs espèces pour des processus, telles que la régulation acido-basique, la croissance, la calcification et la reproduction, mais n’a pas pu être déterminée par les approches utilisées (Boulais et al., 2017; Fitzer et al., 2014; Lannig et al., 2010).

L'exposition d'organismes à quelques conditions environnementales choisies, i.e. « scénarios », suppose une connaissance aigüe de la variabilité environnementale du pH dans le milieu de vie des espèces étudiées (Vargas et al., 2017). Or, cette variabilité est forte à l'échelle locale et la plupart des espèces vivent dans des mosaïques d'habitat compliquant la détermination des scénarios futurs d'acidification (IPCC, 2019; Vargas et al., 2017). En conséquence, une grande partie des études, qui se sont basées sur des scénarios pour l'océan global de surface, ont en fait exposé les organismes à des scénarios de pH qu'ils rencontrent déjà naturellement dans leur milieu de vie (Hofmann et al., 2011; Vargas et al., 2017). De cette manière, les réactions plastiques observées (e.g. diminution de la calcification, diminution de la croissance) correspondent peut-être simplement à une plasticité adaptative à leur milieu de vie et non pas à des conséquences directes de l'AO sur la fitness des individus (voir exemple méthodologique en Figure 6). En effet, pour déterminer le potentiel adaptatif des espèces aux changements globaux, il est primordial d'exposer les organismes à des conditions plus extrêmes que celles rencontrées dans leur milieu de vie (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010). Pour remédier à ce problème, certaines études ont appliqué un offset correspondant aux prédictions du GIEC, e.g. -0.3-0.4, à des mesures de pH à l'échelle locale (Dineshram et al., 2015; Gazeau et al., 2014; Ko et al., 2014). Toutefois, ces mesures sont uniquement représentatives d'un habitat (e.g. un estuaire, une baie) à un instant donné (celui de l'expérience) et peuvent difficilement être généralisées à l'ensemble d'une population ou d'une espèce.

On observe un regain d'intérêt pour les normes de réaction à l'AO depuis le début des années 2010 avec la publication de 4 articles sur les mollusques marins dont trois sur les larves d'oursin et un sur les larves de moule *M. edulis* (Dorey et al., 2013; Jager et al., 2016; H.-G. Lee et al., 2019; Ventura et al., 2016). Ces normes de réaction ont été établies sur des paramètres globaux à l'échelle macro-physiologique avec l'étude de la survie, de la croissance, du

développement larvaire, de la respiration et du pH gastrique. Elles n'ont pas intégré d'analyses à l'échelle moléculaire. Jager et Al. (2016) ont, quant à eux, développé un modèle innovant permettant de déterminer les points de bascule chez les larves d'oursins par approche DEB (*dynamic energy budget theory*). Plus récemment, la nécessité de déterminer les points de bascules physiologiques a été soulignée par Bednaršek et al. (2019, 2021). Ces auteurs ont déterminé des normes de réaction à l'AO pour des groupes phylogénétiques complets tels que les ptéropodes et les échinodermes par méta-analyse. Cette approche permet de comparer la sensibilité des différents taxons à l'AO. En revanche, elle ne tient pas compte de la plasticité adaptative et des différences de résistance intraspécifique et interspécifique comme cela est pourtant recommandé dans l'étude de l'AO (Vargas et al., 2017) et des changements globaux (Donelson et al., 2018; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011; Murren et al., 2015; Sommer, 2020). Bien que ces études restent très peu nombreuses, il est intéressant de constater que toutes les normes de réaction établies sur les invertébrés marins sont des régressions linéaires segmentées, avec la présence de points de bascules (Bamber, 1987, 1990; Bednaršek et al., 2019, 2021; Dorey et al., 2013; Jager et al., 2016; H.-G. Lee et al., 2019; Ventura et al., 2016).

De par l'utilisation systématique des approches scénario, les seuils de tolérance et mécanismes adaptatifs, qui conditionnent la persistance des espèces à l'AO, restent aujourd'hui en grande partie méconnus. Cela est même le cas chez les espèces modèles les plus étudiées, telles que l'huître creuse *C. gigas* (Ducker & Falkenberg, 2020). Cette espèce joue pourtant un rôle écosystémique et économique majeur et par conséquent sa sensibilité à l'AO doit être déterminée (Lemasson et al., 2017). D'autres espèces au rôle économique majeur, telle que l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, restent quant à elles très peu étudiées (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016) et les conditions

de pH actuelles dans leur milieu de vie restent largement méconnues (J. E. Johnson et al., 2015, 2020) compliquant la mise en place d'approches scénario. La détermination de normes de réaction au pH chez ces espèces d'importance pour les sociétés humaines est donc une nécessité.

V. Les huîtres et l'acidification des océans : modèles biologiques

V.1. L'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est un mollusque coquillier du phylum *Mollusca*, de la classe des *Bivalvia*, de l'ordre des *Ostreida*, de la famille des *Ostreidae* et du genre *Crassostrea*. Elle est l'une des espèces les plus cultivées au monde et particulièrement en France où elle domine la production aquacole (FAO, 2021; FranceAgriMer, 2021). *C. gigas* a été introduite massivement sur les côtes françaises dans les années 1970 (Buestel et al., 2009). Cette introduction a été initiée politiquement afin de relancer le secteur ostréicole touchés par plusieurs épizooties qui ont provoqué le déclin des espèces précédemment cultivés, l'huître Portugaise et l'huître plate native (Buestel et al., 2009). En France, la production de *C. gigas* est devenu depuis le marché le plus rentable parmi les produits de la mer représentant une valeur de 380 millions d'euros en 2020 (FranceAgriMer, 2021).

Originnaire de la mer du Japon et de la mer de Chine, cette espèce a été introduite volontairement dans 45 écorégions des zones tempérées, principalement pour son intérêt économique (Molnar et al., 2008). Elle s'est depuis naturalisée sur la côte est Atlantique, en Europe et en Afrique, et les côtes Américaines et Océaniques du Pacifique (Molnar et al., 2008). Le fort potentiel invasif de cette espèce est lié à son caractère euryèce, supportant de larges gammes de variations environnementales (e.g. température, salinité, nourriture). Elle peut ainsi s'épanouir sur la plupart des zones côtières et dans les estuaires où elle prospère en

milieux tempérés (Miossec et al., 2009). L'assemblage de son génome a ainsi démontré sa forte capacité d'adaptation à une large gamme de perturbations environnementales (Zhang et al., 2012).

D'une part, le caractère invasif de cette espèce a de nombreuses conséquences négatives sur les écosystèmes colonisés, provoquant notamment le déclin, par compétition, des espèces natives (Miossec et al., 2009). D'autre part, en tant qu'espèce ingénieur, elle structure les écosystèmes et produit un grand nombre de services écosystémiques utiles aux sociétés humaines (Miossec et al., 2009). Elle s'installe ainsi sur les substrats meubles et durs des zones intertidales, infralittorales et estuariennes où elle forme des récifs complexes servant d'habitats, de nurserie et de zone de reproduction à de nombreuses espèces, et augmentant ainsi la biodiversité à l'échelle locale (Coen et al., 2007; de Paiva et al., 2018; Zu Ermgassen et al., 2020). Ces récifs calcaires protègent également les côtes de l'érosion. Enfin, en tant qu'espèce suspensivore consommant les particules en suspension, elle améliore la qualité de l'eau, participe à la fixation des sédiments, joue un rôle important dans les cycles biogéochimiques et concentre les pathogènes, protégeant les espèces environnantes.

Comme tous les bivalves, l'huître creuse a un cycle de vie pélagique au stade larvaire puis benthique aux stades juvénile et adulte (Figure 10). Au stade adulte, la gamétogénèse est principalement déterminée par la température et la disponibilité en nourriture (Bayne, 2017). La ponte est déterminée par la température et a lieu généralement à la fin du printemps et en été sur les côtes Européennes (Bayne, 2017). Après la fécondation, la larve devient suspensivore au bout de 3 à 5 jours après épuisement de ses réserves vitellines. La première coquille calcifiée est formée à 24-48 h post fécondation et est majoritairement composée de calcite avec une légère proportion d'aragonite qui diminue au cours du développement larvaire (S. W. Lee et al., 2006). Après fixation, la coquille est constituée de calcite. Le stade larvaire dure

généralement deux à trois semaines selon la température et la disponibilité en nourriture (Bayne, 2017). A la fin du développement larvaire, le stade pédivéligrè possède les organes nécessaires à la métamorphose, dont le pied, et se met à la recherche d'un substrat pour initier la fixation et la métamorphose. Les huîtres produisent des gonades à environ 6-7 mois, puis commencent le stade de maturation jusqu'à atteindre le stade d'adulte mature à un an (Bayne, 2017).

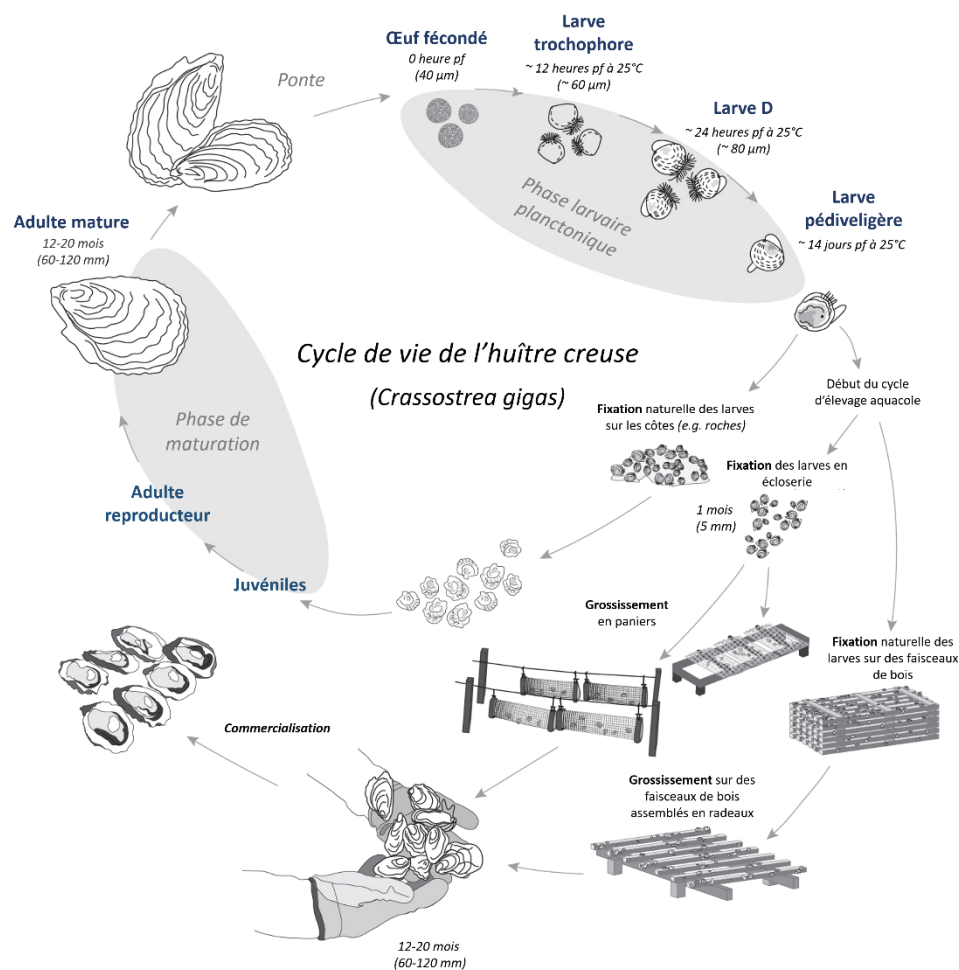


Figure 10. Cycle de vie de l'huître creuse en milieu naturel et en élevage (schéma modifié depuis <https://niwa.co.nz/aquaculture/species/pacific-oyster> ©NIWA)

V.2. L'huître perlière *Pinctada margaritifera*

L'huître perlière, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) est un mollusque coquillier du phylum *Mollusca*, de la classe des *Bivalvia*, de l'ordre des *Ostreida*, de la famille des *Pteriidae*

et du genre *Pinctada*. Depuis les premières greffes pour la production de perles en 1963, la perliculture de *P. margaritifera* a connu une augmentation croissante et représente aujourd'hui un marché économique majeur dont dépend l'économie de pays entiers, particulièrement en Océanie (Tisdell & Poirine, 2008). En Polynésie Française par exemple, elle est le deuxième secteur d'importance économique et représente ~ 60% de la valeur annuelle des exportations (IEOM, 2018; Pickering et al., 2011). *P. margaritifera* est l'une des espèces de suspensivore avec le plus fort taux de filtration et joue ainsi un rôle clé dans la régulation de la qualité de l'eau participant à la structuration des écosystèmes tropicaux (Southgate & Lucas, 2011). Les espèces du genre *Pinctada* participent également à la bioremédiation des milieux pollués, en concentrant notamment les métaux lourds, grâce à leur forte efficacité de filtration (Gifford et al., 2005; Southgate & Lucas, 2011).

Cette espèce occupe une vaste zone géographique dans la bande tropicale, s'étendant de la Méditerranée à la Californie, en passant par la mer rouge et l'océan indien, jusqu'à Madagascar au sud de son aire de répartition (Gervis & Sims, 1992). Néanmoins, son abondance est la plus importante dans les atolls Océaniques où elle se retrouve fixée via son byssus sur les roches de 0 à 50 m de profondeur et est partie intégrante des récifs coralliens. Cette espèce prospère en zone subtidale dans des milieux écologiquement stables, e.g. température, nourriture, et tolère généralement peu les variations environnementales (Mondal, 2006; O'Connor & Lawler, 2004; Pouvreau, Tiapari, et al., 2000; Yukihiro et al., 1999).

Le cycle de vie de l'huître perlière est globalement similaire à celui de l'huître creuse et des autres bivalves (Figure 10) (Southgate & Lucas, 2011). Comme pour la plupart des espèces tropicales, la gamétogenèse est continue, et dépend essentiellement de la disponibilité trophique, résultant en plusieurs épisodes de pontes par année, souvent associés à des fortes températures (Pouvreau, Gangnery, et al., 2000; Thielley, 1993). Le stade larve D est atteint à

24 h post fécondation. La larve devient alors suspensivore et produit sa première coquille calcifiée (Alagarswami et al., 1989; Doroudi & Southgate, 2003; Southgate & Beer, 1997). Le stade pédiveligère est atteint 20 à 23 jours après la fécondation, initiant la métamorphose. La larve produit ensuite du byssus et se fixe au substrat. Les juvéniles commencent alors une longue période de grossissement jusqu'à atteindre le stade d'adulte mature à l'âge de 2 ans (Pouvreau, Gangnery, et al., 2000). A la différence de l'huître creuse, la coquille de l'huître perlière est constituée d'une couche extérieure en calcite et d'une couche interne en aragonite (Nudelman et al., 2008).

V.3. Impacts de l'acidification des océans sur l'huître creuse et l'huître perlière

Il est nécessaire d'étudier la tolérance de l'huître perlière et l'huître creuse à l'AO au vu de leur importance écologique et économique dont dépendent des communautés entières, humaines et écosystémiques, particulièrement en France métropolitaine et en Polynésie Française. *C. gigas* et *P. margaritifera* sont deux espèces phylogénétiquement proches (*Ostreida*) qui se différencient par leur milieu de vie (milieu tempéré *versus* milieu tropical) mais aussi par l'effort de recherche dont elles font l'objet dans le contexte de l'AO. Ainsi dans la base de donnée *Web of Science*, parmi les articles faisant référence au terme « *ocean acidification* » dans leur titre, leur abstract ou leurs mots clefs, 203 articles font référence à « *crassostrea gigas* » contre 6 pour « *pinctada margaritifera* » (Web of Science, recherche faite le 03/01/22, champ de recherche : « *topic* », base : *all database*). Chez l'huître creuse, la grande majorité des recherches ont été menées sur les stades larvaires. Dans ce travail de thèse, nous nous focaliserons sur le stade juvénile qui est le premier stade de longue durée (durée de 6-12 mois pour l'huître creuse à 18-24 mois pour l'huître perlière). Par conséquent, les juvéniles sont plus susceptibles d'expérimenter d'importantes variations de pH que les stade larvaires

(durée de 2-3 semaines). Ce stade de vie a un rôle crucial pour la persistance des populations puisque la croissance y détermine la vitesse d'échappement au risque de prédation par l'atteinte d'une « taille refuge », qui permet ensuite d'initier la maturation et la reproduction (K. D. Johnson & Smee, 2012; Kulp et al., 2011; Rodriguez, 2009). De plus, alors que le stade larvaire peut être contrôlé en écloserie (Barton et al., 2015), les juvéniles sont le plus souvent élevés en milieu naturel où ils seront donc vulnérables à la diminution du pH dans l'anthropocène.

Dans la littérature, les stades adultes et juvéniles de l'huître creuse sont généralement comparables dans leur réponse à l'AO. La plupart des fonctions physiologiques ne sont pas affectées par des diminutions de pH de 7.7 à 7.3 avec un maintien de l'indice de condition, de la croissance de la coquille, de la calcification, de la respiration, de l'ingestion, des réserves énergétiques, du profil lipidique, et de la survie suite à des périodes d'exposition de 25 jours à 10 mois (Clark et al., 2013; Lannig et al., 2010; Pack et al., 2021; Timmins-Schiffman et al., 2014). En revanche, la coquille de l'huître creuse est vulnérable à pH 7.7 et diminue en solidité après 6-8 semaines d'exposition, augmentant la vulnérabilité à la prédation (Lannig et al., 2010; Wright et al., 2018). Des approches de transcriptomique ont été utilisées pour évaluer les effets de l'AO sur l'huître creuse mais n'ont pas été associées à des mesures macro-physiologiques (Wang et al., 2020), limitant la capacité d'interprétation de ces résultats (pour les limites méthodologiques, voir Strader et al. (2020).

Ducker & Falkenberg (2020) ont récemment synthétisé les résultats de la littérature sur les juvéniles et adultes de *C. gigas* par méta-analyse. Selon ces auteurs, les mécanismes physiologiques de réponse à une diminution de pH sont connus mais le seuil de tolérance à l'AO reste à déterminer. Jusqu'à aujourd'hui, seules des approches par scénario ont été utilisées pour étudier *C. gigas*, et la condition minimale de pH testée a été de 7.3. Or, il a été montré que lors d'épisodes d'eutrophisation et d'hypoxie, le pH peut descendre en dessous de 7.1 dans des

zones côtières tempérées (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014) similaires au milieu de vie de l'huître creuse. Ainsi, les scénarios utilisés dans les études sur l'AO pourraient correspondre à des conditions déjà expérimentées par l'huître creuse dans son milieu naturel. Dans ce cas, ces résultats ne permettent pas de conclure sur le potentiel adaptatif (voir exemple méthodologie de la Figure 6) des huîtres à l'AO et il est nécessaire d'établir des normes de réaction sur une vaste gamme de pH (Chevin et al., 2010), en y intégrant des approches omiques (Murren et al., 2015; Sommer, 2020).

Seules deux études ont déterminé expérimentalement les effets de l'AO sur la physiologie de l'huître perlière *P. margaritifera* (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016). Ces études ont consisté à exposer des adultes à des pH de 7.8-7.4 en comparaison avec un scénario ambiant à 8.2 pendant 7 à 100 jours d'exposition. La diminution de pH à 7.8-7.4 n'affecte pas la respiration, l'ingestion et le *scope for growth* mais provoque en revanche une dissolution marquée de la coquille et une délamination complète du periostracum. Comme pour l'huître creuse, la coquille semble être particulièrement vulnérable à la diminution du pH mais le seuil de tolérance à l'AO reste à déterminer. Le besoin de tester les impacts de l'AO sur *P. margaritifera* est réel puisque d'autres espèces du genre *Pinctada* telles que *Pinctada fucata* sont particulièrement sensibles à la diminution du pH (S. Li et al., 2017a; S. Li, Huang, et al., 2016; S. Li, Liu, et al., 2016; Liu et al., 2017). *P. margaritifera* évolue en milieu tropical qui connaît peu de variabilités environnementales journalière et saisonnière. Il est probable que le pH de son milieu de vie soit globalement stable autour de 8.1, pH moyen des eaux de surface dans l'océan global (Kwiatkowski & Orr, 2018; Wu et al., 2018). Toutefois, la variabilité à l'échelle locale est inconnue en l'absence de série temporelle de mesure sur l'aire de répartition de *P. margaritifera* (J. E. Johnson et al., 2015, 2020) compliquant la mise en place d'approches scénario réalistes.

L'établissement de normes de réaction sur une large gamme de pH semble donc être l'approche la plus appropriée pour évaluer la sensibilité de *P. margaritifera* à l'AO.

V.4. Objectifs de la thèse et hypothèses de travail

Dans cette introduction nous avons vu l'intérêt de déterminer les normes de réactions des espèces afin d'évaluer les points de bascules et degré de plasticité phénotypique qui détermineront leur potentiel adaptatif et leur persistance dans l'Anthropocène. Il est particulièrement nécessaire d'y intégrer des approches moléculaires (omiques) afin de déterminer les bases mécanistiques de la plasticité phénotypique qui restent aujourd'hui en grande partie méconnues. Ces approches moléculaires permettent également de détecter la plasticité phénotypique à court-terme qui peut-être invisible à l'échelle macrophysiologique où elle est bien plus longue à se mettre en place. Il est intéressant de déterminer les normes de réaction chez des espèces phylogénétiquement proches mais vivant dans des environnements différents afin d'identifier les mécanismes physiologiques de plasticité adaptative. Il est également nécessaire d'identifier la réversibilité des effets constatés sur le phénotype des organismes, en dessous du point de bascule, via la capacité de récupération. Enfin, nous avons vu que l'établissement des normes de réaction reste marginal aujourd'hui dans le domaine de l'AO.

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à établir les normes de réaction de l'huître creuse *C. gigas* et l'huître perlière *P. margaritifera* à l'AO en intégrant des approches macro-physiologiques (i.e. taux physiologiques, intégrité de la coquille) et -omiques au niveau moléculaire (i.e. transcriptomique, lipidomique). Nous déterminerons également les capacités de croissance compensatoire chez *C. gigas* suite à son exposition au pH. Notre hypothèse principale est que l'huître perlière a développé une plasticité adaptative aux milieux stables et sera donc plus sensible à l'AO que l'huître creuse, espèce euryèce. Les points de bascule

devraient donc être beaucoup plus élevés chez l'huître perlière que chez l'huître creuse. Chez l'huître creuse, les points de bascule pourraient être aux alentours de pH 7.1, correspondant aux conditions les plus extrêmes pouvant être rencontrées en milieu tempéré. L'objectif de la thèse est de répondre aux questions suivantes :

(1) quels sont les points de bascule et le seuil de tolérance global à l'AO chez l'huître creuse et l'huître perlière ?

(2) la réduction de fitness subie en dessous des points de bascule est-elle réversible ?

(3) la plasticité adaptative des espèces aux milieux intertidal tempéré et subtidal tropical conditionne-t-elle leur capacité de réponse et leur potentiel adaptatif à l'AO ?

(4) quels sont les mécanismes régulant la plasticité au niveau moléculaire ?

Le chapitre 1 établit les normes de réaction macrophysiologiques et moléculaires des juvéniles d'huître creuse permettant d'identifier les points de bascule et le seuil de tolérance global à l'AO et de décrire la plasticité phénotypique à l'échelle moléculaire. Le chapitre 2 consiste à tester la capacité de récupération des juvéniles d'huître creuse pour le retard de croissance accumulé en dessous du point de bascule après retour à pH ambiant. Il permet de déterminer si les dommages induit sur la fitness des organismes en dessous du point de bascule sont irréversibles. Le chapitre 3 établit les normes de réaction et le seuil de tolérance global à l'AO chez l'huître perlière. Plus particulièrement, ce chapitre se focalise sur les mécanismes de régulation de la biominéralisation en établissant les normes de réaction de l'expression des gènes en fonction du taux de calcification. Cela permet de discuter de l'intérêt des normes de réaction pour détecter de nouveaux mécanismes de régulation, impliqués dans la réponse à l'AO, à l'échelle cellulaire. Enfin, le rôle joué par la plasticité adaptative aux milieux tempéré et tropicaux dans la réponse des huîtres à l'AO sera discuté dans la discussion générale de ce

travail de thèse. Une réflexion générale sur la place et l'intégration des normes de réaction dans le futur de la recherche sur l'AO clôturera ce travail de thèse.

CHAPITRE 1

Normes de réaction de l'huître creuse

Crassostrea gigas au pH

Revisiting tolerance to ocean acidification: insights from a new framework combining physiological and molecular tipping points of Pacific oyster

Mathieu Lutier^{1,*}, Carole Di Poi¹, Frédéric Gazeau², Alexis Appolis¹, Jérémy Le Luyer³,
Fabrice Pernet^{1,*}

¹ LEMAR CNRS/UBO/IRD/Ifremer, ZI pointe du diable, CS 10070, F-29280 Plouzané, France.

² LOV Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France.

³ EIO UPF/IRD/ILM/Ifremer, Labex CORAIL, Unité RMPF, Centre Océanologique du Pacifique, Vairao – BP 49 Vairao, Tahiti, Polynésie française.

Correspondence and requests for materials should be addressed to to F.P. (email: fpernet@ifremer.fr)

This article was published in *Global Change Biology* on 01/25/2022, to cite this work:

*Lutier, Mathieu, Carole Di Poi, Frédéric Gazeau, Alexis Appolis, Jérémy Le Luyer, et Fabrice Pernet. « Revisiting Tolerance to Ocean Acidification: Insights from a New Framework Combining Physiological and Molecular Tipping Points of Pacific Oyster ». *Global Change Biology* 28, no 10 (2022): 3333-48. <https://doi.org/10.1111/gcb.16101>.*

Abstract

Studies on the impact of ocean acidification on marine organisms involve exposing organisms to future acidification scenarios which has limited relevance for coastal calcifiers living in a mosaic of habitats. Identification of tipping points beyond which detrimental effects are observed is a widely generalizable proxy of acidification susceptibility at the populational level. This approach is limited to a handful of studies that focus on only a few macro-physiological traits, thus overlooking the whole organism response. Here we develop a framework to analyze the broad macro-physiological and molecular responses over a wide pH range in juvenile oyster. We identify low tipping points for physiological traits at pH 7.3-6.9 that coincide with a major reshuffling in membrane lipids and transcriptome. In contrast, a drop in pH affects shell parameters above tipping points, likely impacting animal fitness. These findings were made possible by the development of an innovative methodology to synthesize and identify the main patterns of variations in large -omic datasets, fitting them to pH and identifying molecular tipping-points. We propose the broad application of our framework to the assessment of effects of global change on other organisms.

Keywords

Acidification, Lipidomic, Mollusk, Reaction norm, Threshold, Transcriptomic

Introduction

The exponential increase in the atmospheric emission of carbon dioxide (CO₂) from anthropogenic activities is mitigated by ocean absorption that leads to decreasing ocean pH and changes in carbonate chemistry, a phenomenon known as ocean acidification (OA) (Caldeira & Wickett, 2003; Orr et al., 2005). This represents a tremendous challenge for marine organisms, especially for calcifiers that produce calcium carbonate (CaCO₃)-based exoskeletons. OA not only induces internal acidosis that impacts metabolism, behavior, growth and reproduction, but also decreases carbonate ion (CO₃²⁻) concentration in the ocean, the elemental constituent of calcifier exoskeletons (Gazeau et al., 2013; IPCC, 2019; Kroeker et al., 2013; Tresguerres & Hamilton, 2017 for reviews).

OA has been the most-studied topic in marine science in recent times (Browman, 2017). As such, many OA experiments have been conducted, usually exposing organisms to experimental conditions based on scenarios modelled for open ocean waters, typically simulating present and near-future surface ocean pH levels. However, many calcifying species thrive in coastal areas where pH levels vary far more than in the open ocean on both daily and seasonal scales (Vargas et al., 2017; Waldbusser & Salisbury, 2014). As a result, several authors have applied pH offsets or conditions that are more locally relevant (Dineshram et al., 2015; Gazeau et al., 2014; Ko et al., 2014), but the results cannot be extrapolated to populations or species that are distributed in a mosaic of habitats. We need to implement experimental approaches whose results can be applied in a wide range of environments at the scale of species (Vargas et al., 2017).

Reaction norm, i.e. the response of an organism to changing environmental parameters, allows the identification of tipping points that beyond small variations will have major impacts. According to the last IPCC reports, identification of tipping-points is a key knowledge gap in

environmental change research (IPCC, 2019, 2021). Tipping-point is valid for a whole population regardless of habitat. Also, this is a single, easily communicable value that reflects susceptibility to OA (Bednaršek et al., 2019, 2021). To date, only four studies have experimentally established reaction norms for marine calcifiers in relation to pH. These studies focused on the assessment of tipping points for a few selected traits measured at the organism level (i.e. growth, survival) and provide a limited view of the whole organism response, ignoring molecular responses (Comeau et al., 2013; Dorey et al., 2013; H.-G. Lee et al., 2019; Ventura et al., 2016). We therefore identify the need to integrate macro-physiology and omics together with reaction norms, for understanding the mechanisms responsible for individual organism success under a changing environment. This however requires developing an innovative methodology to synthesize and identify the main patterns of variations in large - omics datasets (Strader et al., 2020) and fit them to reaction norms.

Lipidomic and transcriptomic approaches provide complementary and holistic views of organismal responses to environmental changes at the molecular and biochemical levels. Membrane lipids modulate exchanges between the intracellular milieu, which is highly-regulated, and the extracellular milieu which reflects environmental changes, and therefore play a key role in metabolic regulation and ion exchanges (Hazel & Williams, 1990; Hochachka & Somero, 2002; Hulbert & Else, 1999). However, the role of membrane lipids in the regulation of acid-base equilibrium and biomineralization under OA has never been investigated. Here we expect that membrane lipids play a key role in the maintenance of electrochemical gradient across membranes, a parameter that is essential for organism's persistence under OA (Cyronak et al., 2016).

The transcriptomic response is one of the first level of metabolic regulation that determine shifts in acid-base ion regulation, metabolic processes, calcification and stress

response mechanisms (Matz, 2018; Strader et al., 2020). Although an increasing number of studies investigate the transcriptomic responses of marine calcifiers under OA, they generally focus on a few targeted genes that play a central role in physiological processes and they assume that gene functions are conserved among taxa (Strader et al., 2020). This creates a vicious cycle limiting the opportunities to uncover new mechanisms and cellular pathways involved in organism responses to OA. New methodologies are therefore required to provide new insight on organism's response to OA at the transcriptional level (Rajan et al., 2021; Yarra et al., 2021).

Here we determine the reaction norm of juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*, one of the most cultivated invertebrate species in the world (FAO, 2020), over a wide range of pHs for macro-physiological traits, membrane lipids and gene expression. Although the impacts of OA on this model species have been intensively studied using scenario approaches, there is currently no consensus on its robustness to low pH (Ducker & Falkenberg, 2020). The establishment of reaction norm with biochemical and molecular data is a novel approach that provides new insights on the sensitivity of marine calcifiers to OA.

Material and methods

Animals and maintenance

The oysters were produced at the Ifremer hatchery facilities in Argenton (Brittany, France) in late August 2018 according to Petton et al. (2015). The broodstock consisted of 139 females and 40 males originating from six different cohorts collected in the natural environment between 2011 and 2016, off Fouras (Ile d'Aix, France). At 40 days old, the juveniles were moved to the Ifremer growing facilities in Bouin (Vendée, France). On January 10th 2019, oysters were returned to Argenton and kept for 8 d in a 500 L flow-through tank. Seawater temperature was gradually increased from 7 °C to 22 °C, the optimal temperature for *C. gigas*

(Bayne, 2017), at a rate of ca. 2 °C d⁻¹. During the experiment, oysters were continuously supplied with natural seawater originating from a pool (~9000 m³) which is renewed with each spring tide, filtered at 5 µm and UV-treated. The oysters were fed continuously on a mixed diet of *Isochrysis affinis galbana* (CCAP 927/14) and *Chaetoceros gracilis* (UTEX LB2658) (1:1 in dry weight). Food concentration was maintained at 1500 µm³ mL⁻¹ of phytoplankton cells at the outlet of the tank – ad libitum (Rico-Villa et al., 2009) – and controlled twice daily using an electronic particle counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, USA) equipped with a 100 µm aperture tube. On the eve of the experiment on January 14th 2019, at which point they were 5-month-old, oysters were divided into 15 batches containing 292 ± 20 individuals (95.2 ± 0.2 g).

Experimental design

Each batch of oysters was exposed to one constant nominal pH condition ranging from pH 7.8 to 6.4 with a step of 0.1 between two levels. The upper pH condition (pH ~7.8) was obtained by running seawater with oysters without pH regulation. The lowest pH values encountered by oysters today are presumably between pH 7.4 and 7.0 (Frankignoulle et al., 1996; Melzner et al., 2013; Proum et al., 2017; Wallace et al., 2014). Geochemical models using the record of atmospheric CO₂ levels over the last 300 Myr suggest that the ocean pH was at most 0.6 units lower than today (Caldeira & Wickett, 2003). Continued release of CO₂ from fossil fuels into the atmosphere (worst case scenario) could result in a reduction in pH of 0.7 units at the ocean surface (Caldeira & Wickett, 2003). Therefore, the lowest pH values used in our study are probably unrealistic but expand the reaction norms and increase the statistical power of the tipping point.

The experimental system consisted of 18 experimental units that were randomly assigned to one pH condition (n = 15, no pH replication) or to control blanks without animals (n = 3) (Figure S1). Each experimental unit consisted of a header tank in which seawater was acidified

(except for the ambient pH and blanks) and then delivered by a pump to a holding tank containing the oysters. These tanks were 45 L and their entire volume was renewed every 82 min. pH was regulated by means of pure-CO₂ bubbling, controlled by a pH-regulator (ProFlora® u403 JBL). The pH-regulator was connected to pH-probes installed in each header tank (pH-sensor+Cal, JBL), checked at the start of the experiment using Certipur® Merck NBS buffers (pH = 4.00, pH = 7.00). pH electrodes from the pH-regulator were inter-calibrated twice daily against a pH probe (Sentix® 940-3 WT) connected to a Multiline® Multi 3630 IDS-WTW. The pH-probe was checked once a week using Certipur® Merck NBS buffers (pH = 4.00, 7.00, and 9.00) and calibrated twice a week on the total scale with a certified Tris/HCl buffer (salinity 35; provided by A. Dickson, Scripps University, USA). Throughout the text, pH levels are therefore expressed on the total scale (pH_T). In each experimental tank, air bubbling and a small homogenisation pump (3 W) ensured an efficient mixing of seawater surrounding the oysters. Photoperiod was 10 h light: 14 h dark. During the entire experimental period, oysters were fed as described above.

On January 18th 2019, each batch of oysters was randomly assigned to one tank. Oysters were first held at ambient pH for 3 d. Then, pH was progressively decreased in each pH-regulated tank at a rate of 0.2-unit d⁻¹. The decrease in pH lasted for 7 d for the lowest condition. Experimental pH conditions were all reached on January 27th 2019. The pH exposure lasted 23 days, the time required for critical shell alteration (bleaching, perforation, and dissolution) under the lowest pH conditions. No mortality was recorded during the experiment.

Seawater carbonate chemistry

In each oyster tank, temperature, salinity, dissolved oxygen (O₂) saturation levels and pH were measured twice a day using a Multiline® Multi 3630 IDS-WTW (pH probe Sentix® 940-3 WTW, O₂ probe FDO® 925 WTW, salinity probe TetraCon® 925 WTW). Seawater samples

were collected weekly, filtered through 0.7 µm (GF/F, Whatman®) and poisoned with 0.05 % mercury (II) chloride. Total alkalinity (TA) was then measured in triplicate 50 mL subsamples by potentiometric titration at 22 °C, using a Titrand 888 (Metrohm®) titrator coupled to a glass electrode (ecotrode plus, Metrohm®) and a thermometer (pt1000, Metrohm®). TA was calculated following the protocol described in Dickson et al. (2007). At the time of sampling, pH, salinity and temperature were measured, and then used together with TA value to determine carbonate chemistry parameters using the package seacarb v 3.2.16. of the R software.

Biometry

The total fresh weight (shell + tissue) of each batch of oysters was measured twice weekly and interpolated between measurements to estimate daily weight. In addition, shell length and total fresh weight were measured individually on 30 oysters from each condition at the onset (1 d) and at the end of the experiment (23 d). The measurements relate to different individuals taken over time. These oysters were then dissected and pooled to determine the total weight of shell and tissue, separately. The tissues were then lyophilized and weighted to obtain dry weight. Growth rate was calculated as:

$$G = (\overline{X}_{23} - \overline{X}_1) \div 23,$$

where G is growth rate as expressed as increase in shell length or total body weight per day (mm d^{-1} , mg TW d^{-1}), \overline{X}_1 and \overline{X}_{23} are the average parameter values for shell length and total weight measured at the onset (1 d) and the end of the experiment (23 d).

Shell thickness was measured on the left valve of five individuals collected per pH condition at the end of the experiment. The left valve was more susceptible to acidification than the right valve. We observed holes in the shell under low pH condition ($\text{pH} < 6.6$) that always occurred on the left valves, close to the umbo. Shells were dried for 24 h at 45 °C, embedded in polyester resin and cross-sectioned from umbo to opposite shell margin along the

longitudinal growth axis using a precision saw (Secotom-10 Struers). Sections were glued on a microscope slide and polished with silicon carbide abrasive disks (1200 and 2500 grains cm⁻²). Images of the section were captured under a Lumar V12 stereoscope (Zeiss) at 30x magnification, and the entire section was reconstructed using an image acquisition software (AxioVision SE 64 – v4.9.1, Zeiss). The minimal shell thickness was measured within the first third of the shell starting from umbo using ImageJ software (Schneider et al., 2012).

Physiological rates

Seawater was sampled twice a day at the inlet and outlet of each oyster tank and phytoplankton cell concentrations were measured using an electronic particle counter (see previous section). No pseudofaeces production was detected throughout the experiment. Ingestion rate was determined as:

$$I = \frac{\Delta_{\text{phyto}} \times \text{flow rate}}{W},$$

where I is the ingestion rate expressed as cm³ min⁻¹ g⁻¹, Δ_{phyto} is difference in phytoplankton concentrations between the inlet and the outlet of the oyster tanks (cm³ min⁻¹), *flow rate* is the water flow at the inlet of the oyster tanks (mL min⁻¹), and W is the total fresh weight of oyster batch (g). The three control blanks were used to check that there was no sedimentation of algae (no differences in cell concentrations between the inlet and the outlet, data not shown).

Net calcification and respiration rates were measured after 22 d of exposure. Food supply was stopped 17 h before the assay and tanks were emptied, cleaned and refilled. Again, 1 h before the assay, the tanks were emptied, cleaned and refilled. At the onset of the incubation, water flow and air bubbling were stopped. Gentle mixing of the seawater was maintained by homogenization pump but air bubbling was stopped. Incubations lasted for 90 min. This duration allowed to keep the pH close to the setpoint (< 0.1 pH unit variation) despite oyster

respiration. At the onset and at the end of the incubation period, temperature, salinity, pH and O₂ concentration (mg L⁻¹) were measured, and seawater samples were filtered and poisoned for TA analyses (see above) or were immediately frozen at -20 °C for ammonium (NH₄⁺) measurements (Aminot & K erouel, 2007) (see Table S1). Empty tanks were used as controls to check that there was no change in any of the parameters due to evaporation or other potential biological processes in the water itself. Net calcification rate was determined following a modified procedure from Gazeau et al. (2015) using the alkalinity anomaly technique (Smith & Key, 1975):

$$NC = \frac{(\Delta_{TA} \times \rho - \Delta_{NH_4^+}) \times V}{2 \times t \times W \times \frac{DW}{TW}},$$

where *NC* is the net calcification rate expressed as $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, Δ_{TA} and $\Delta_{NH_4^+}$ are differences in TA ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) and NH₄⁺ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) between the onset and the end of the incubation period, ρ is seawater density (kg L⁻¹) calculated based on temperature and salinity during the incubation, *V* is the volume of the tanks (L), *t* is the duration of the incubations (h), $\frac{DW}{TW}$ is the ratio of dry weight and total weight determined after lyophilization of a pool of tissues from 30 oysters (see above).

Respiration rate was determined following:

$$R = \frac{(\Delta_{O_2} - \Delta_{O_2 \text{ Control}} \times \rho) \times V}{t \times W \times \frac{DW}{TW}},$$

where *R* is the respiration rate expressed as mg O₂ h⁻¹ g⁻¹, Δ_{O_2} and $\Delta_{O_2 \text{ Control}}$ are differences in O₂ concentration (mg L⁻¹) between the onset and the end of the incubation period in the oyster tank and in the three control tanks (average) respectively. Negative values mean that oxygen consumption was negligible and similar to control blanks.

Biochemistry

Soft-tissues of five individuals from each pH condition were collected at 23 d, flash-frozen in liquid nitrogen, pooled, grounded with a ball mill and stored at -80 °C pending analyses. Oyster powder was diluted with chloroform/methanol (2:1, v/v) for the determination of neutral lipids (triacylglycerol: TAG, and sterols: ST) using high performance thin layer chromatography. TAG-ST ratio was used as a proxy of the relative contribution of lipid reserve to structure (membrane). Polar lipids were purified on silica gel micro column, transesterified using methanolic H₂SO₄ at 100 °C, and the resulting fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a gas-chromatography flame ionization detection system equipped with a DB-Wax capillary column. Peaks were analyzed by comparison with external standards. Each fatty acid was expressed as the peak area percentage of total polar fatty acids. Carbohydrate content ($\mu\text{g mg}^{-1}$) was determined according to the colorimetric method described in DuBois et al. (1956).

Transcriptomics

Soft-tissues of five individuals from each tank were collected at 23 d, flash-frozen in liquid nitrogen and individually grounded (n = 75). Total RNA was then extracted with Extract-All (Eurobio) at a ratio of 5 mL per 100 mg of tissue. RNA quantity/integrity and purity were verified with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermoscientific®) and a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®) respectively. Samples were then DNase-treated using a DNase Max™ Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) and analyzed at the Genotoul sequencing platform (INRAE US 1426 GeT-PlaGe, Centre INRAE de Toulouse Occitanie, Castanet-Tolosan, France). TruSeq RNA libraries were multiplexed and sequenced on a single lane of NovaSeq6000 Illumina S4 150-bp paired-end.

Raw reads were first filtered using Trimmomatic v.0.36 for a minimum length (60 bp), a minimum quality (trailing = 20, leading = 20) and the presence of potential contaminants and remaining adaptors (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec>; 08/17/20). The quality of the reads was monitored before and after this trimming process with FastQC v.0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The *C. gigas* reference genome (Peñaloza et al., 2021) was downloaded from NCBI (GCF_902806645.1) and indexed with Gmap v2020.06.01. Filtered reads were mapped against the reference genome using GSNAP v2020-06-30 keeping default parameters but allowing a minimum mismatch value of 2 and a minimum read coverage of 90%. Finally, the gene expression levels were assessed using HTSEQ v0. 6.1. The DESeq2 v1.30.0 R package was used to process the expression with a first step of normalization using the variance-stabilizing transformation implemented in the ‘vst’ function. The vst matrix was used to build a signed weighted co-expression network analysis implemented in the WGCNA v1.69 R package. First, genes with low overall variance (< 5%) were removed for the analysis as recommended (Langfelder & Horvath, 2008). We fixed the “soft” threshold powers of 13 the scale-free topology criterion to reach a model fit (|R|) of 0.90. Clusters were defined using the “cutreeDynamic” function (minimum of 50 genes by cluster and default cutting height of 0.99) based on the topological overlap matrix, and an automatic merging step with the threshold fixed at 0.25 (default) allowed merging correlated clusters. For each cluster, we defined the cluster membership (kME; Eigengene-based connectivity) and only clusters showing significant correlation ($p < 0.01$) to pH were kept for downstream functional analysis.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R software v4.0.3 and the threshold of statistical significance was fixed at 0.05 unless specifically stated. Relationships between

dependent variables and average pH recorded during the exposure period (or the incubation period for net calcification and respiration rates) were computed using regression models. Dependent variables were biometrics (shell length, total body weight, and growth), physiological rates (ingestion, net calcification and respiration), biochemistry (lipid reserves, carbohydrates) and gene expression. Each gene included in the WGCNA clusters were individually tested against pH. Fatty acids were summarized using principal component analysis and separated into two groups according to their correlation with first principal component (positive or negative). Each group was then summed and tested against pH. Piecewise, linear and log-linear regression models were tested and compared for each individual variable (or set of variables). In each case, the model that had the highest R^2 , the lowest Akaike and Bayesian information criteria (AIC, BIC) and the lowest residual sum of squares was selected. For each piecewise regression model, we estimated the tipping point, defined as the values of the pH where the dependent variables tip, by implementing the bootstrap restarting algorithm (Wood, 2001). For physiological rates, we also determined the critical point defined as the pH at which the dependent variable was equal to zero. Normality of residual distribution was tested using Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances was graphically checked. Significance of each slope was tested according to Student's t test. Piecewise regression models were built using the segmented v1.3-4 R package.

For transcriptomic analysis, only genes that are significantly correlated to pH were tested among the retained clusters (Pearson correlation). The frequency distribution of pH tipping-point values was plotted for each cluster of genes. Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies $> 5\%$, were grouped together and used for GO enrichment analysis using GOA-tools v0.7.11 (Klopfenstein et al., 2018), implemented in the Github repository 'go_enrichment' (https://github.com/enormandeu/go_enrichment) and the

go-basic.obo database (release 2019-03-19) with Fisher's extract tests. Only significant GO terms that included a minimum of three genes and with Bonferroni adjusted $P < 0.01$ were kept. For complementarity with previous studies, we also specifically examined the genes that are commonly reported as involved in the calcification process and in the formation of the organic matrix of the shell and periostracum.

Results

Acclimation of oysters to 15 different pH conditions

During the experiment, pH levels in the oyster tanks were stable and reached the targeted values, except for the lowest pH condition that was 6.5 ± 0.3 instead of 6.4 (Note S1, Table S2, Figure S2). The effects of acidification were clearly visible at the end of the experiment on the color and the size of the shells, as shown in Figure 1. Shell pigmentation apparently decreased with decreasing pH. Total body weight and shell length of oysters ranged from 0.4 ± 0.1 to 2.0 ± 0.8 g and from 12.9 ± 2.1 to 25.4 ± 4.5 mm respectively (mean \pm SD; Figure 2A, Figure S3).

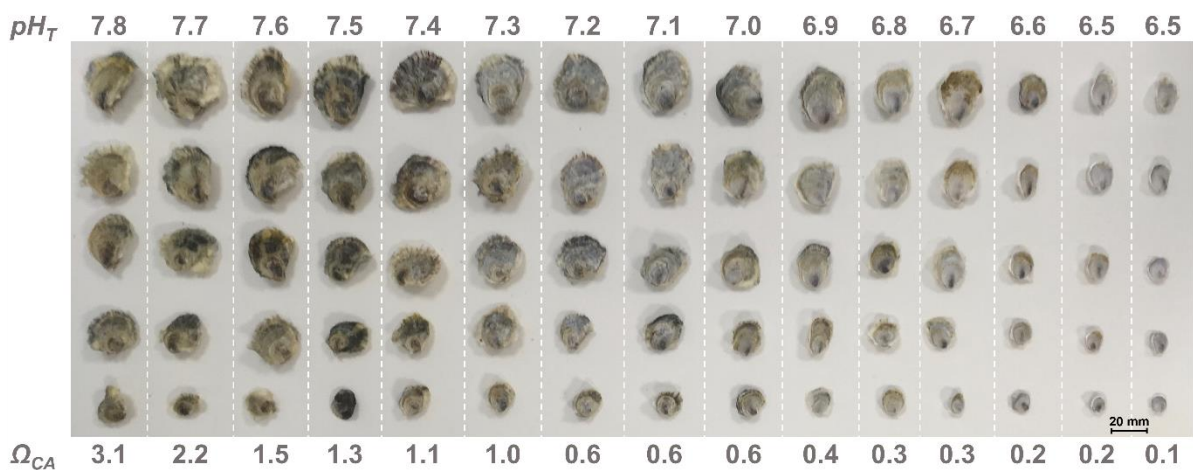


Figure 1. Oysters exposed to 15 pH conditions for 23 d. Five oysters were selected from each condition, and sorted from the smallest to the biggest. Corresponding pH (total scale) and saturation states of seawater with respect to calcite (Ω_{CA}) are shown.

Most macro-physiological traits tip at low pH values between 7.1-6.9

We measured biometric parameters like the length, thickness, and weight of the shell and the total body weight and the dry flesh weight at the end of the 23-day exposure to the 15 different pH conditions. We calculated growth rates for shell length and total body weight, and we measured physiological rates like calcification, ingestion and respiration rates. From these data, we identified an overall tipping point for macro-physiological traits at pH ~7.1-6.9 below which they declined sharply (Figures 2A-H). Calcification rate and growth rates exhibited critical points at pH 6.8 and 6.6, respectively, below which they became negative and turned to net dissolution of the shell and weight and length losses (Figures 2B-D). Concomitantly, respiration rate was arrested at pH 6.7 and ingestion rate was near-zero at pH 6.5 (Figure 2E-F).

Shell parameters and respiration rate are impacted above tipping point

Although macro-physiological traits were generally unaffected by reductions in pH above tipping points, this was not the case for shell length, shell weight and respiration rate. Both shell parameters indeed decreased with decreasing pH while the respiration rate increased before reaching the tipping point (Figures 2A, 2E and 2G). In addition, the shell thickness was the only parameter that decreased linearly over the entire pH range without demonstrating a measurable tipping point (Figure 2I).

A major remodeling of membrane lipids occurs at pH 6.9

To provide an in-depth characterization of the reaction norms at the whole organism level, we aimed to link the oyster reaction norm established for the macro-physiological traits described previously to the molecular responses of oysters. We first analyzed the fatty acid composition of membrane lipids that play an important role in exchanges between intracellular

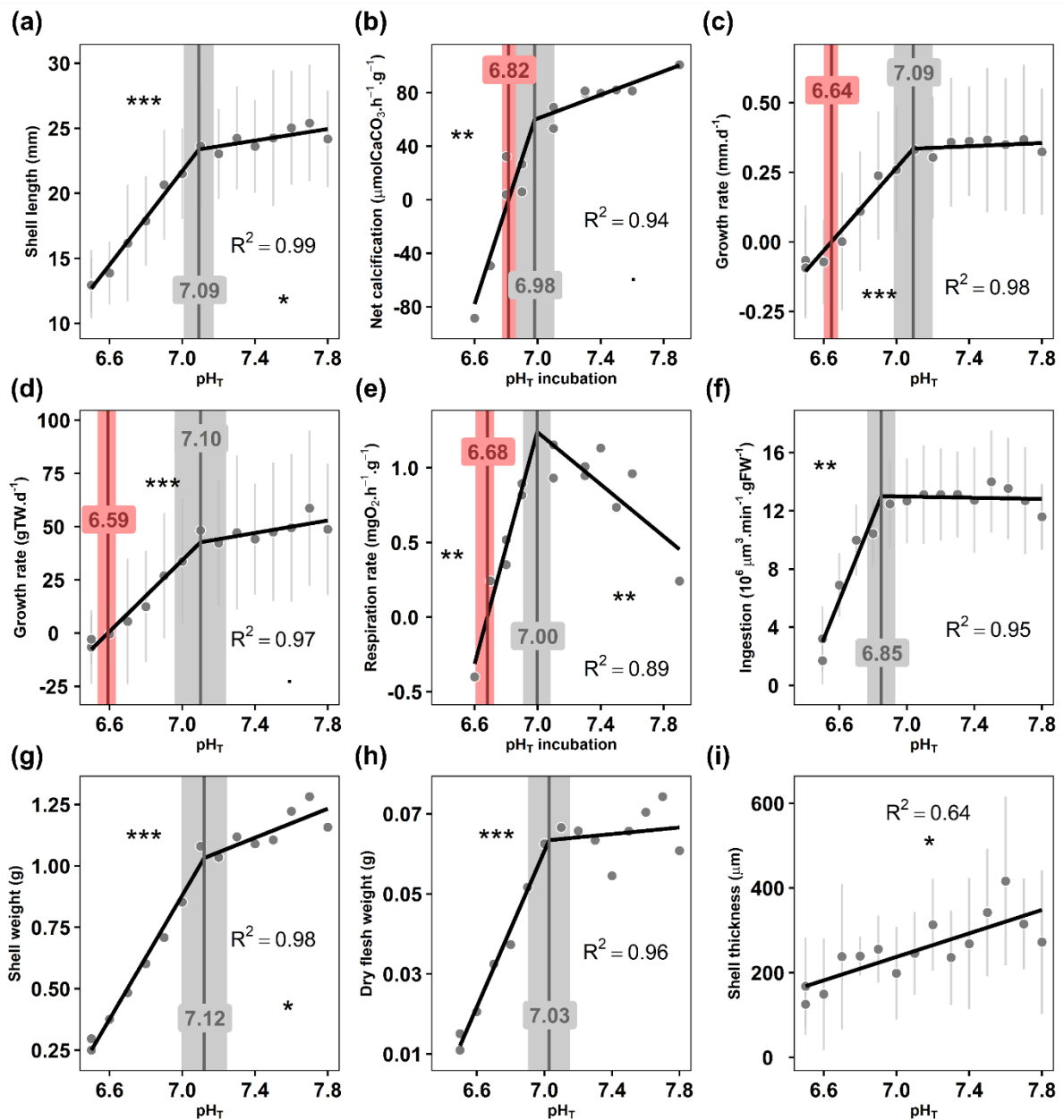


Figure 2. Biometry and physiological rates of oysters as a function of pH (total scale). (A) shell length, (B) net calcification rate, (C) growth rate in shell length, (D) growth rate in total body weight, (E) respiration rate, (F) ingestion rate, (G) shell weight, (H) dry flesh weight and (I) shell thickness. Data are means ± SD when available. Tipping points and critical points and their 95% confidence intervals are shown in grey and red, respectively. The significance levels of the slopes are presented using symbols ($P < 0.001$ ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·).

and extracellular compartments. Principal component analysis of all fatty acids showed that the first axis (PC1) alone explained 66% of the total variance in relation to pH (Figure 3A). The set

of fatty acids was reduced to two terms defined by the sums of fatty acids that correlated with PC1 either positively or negatively, and each term was plotted against pH (Figure 3B-C). Positively correlated fatty acids mainly consisted of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and palmitic acid (PA, 16:0) contributing 43% and 14%, respectively, to PC1 (Table S3). This group of fatty acids exhibited a tipping point at pH 6.9, below which their contribution to membranes decreased markedly (Figure 3B). In contrast, the contribution to membrane of the fatty acids that were negatively correlated with PC1 increased markedly below pH 6.9. These negatively correlated fatty acids consisted of arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and non-methylene interrupted fatty acids (22:2NMI_{i,j}), which contributed 12%, 6% and 6%, respectively, to PC1 (Figure 3C) (Table S3).

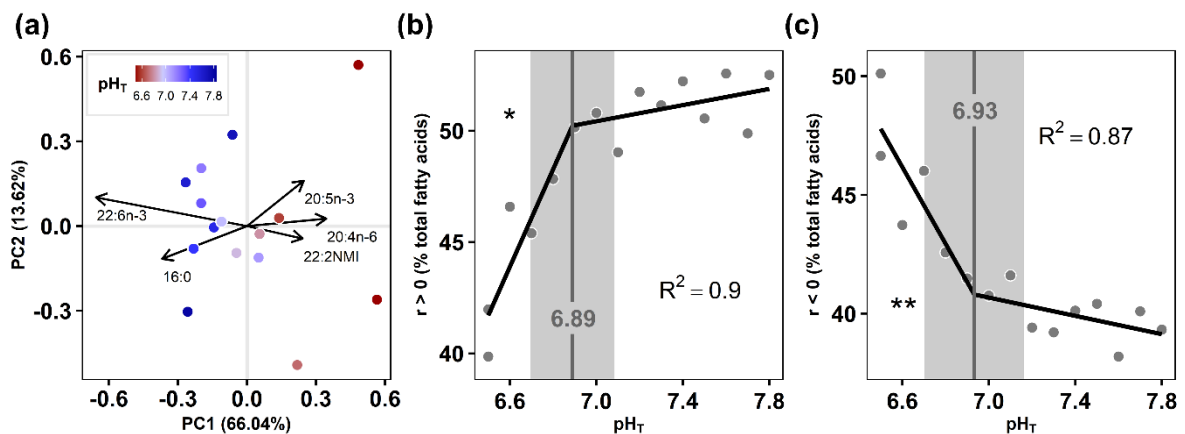


Figure 3. Membrane fatty acid composition of oysters as a function of pH (total scale). (A) Principal component analysis of polar fatty acid classes for oysters (n = 15 pools of five oysters) exposed to 15 pH levels. Arrows represent fatty acids contributing to more than 5% of the first principal component (PC1). Individuals are colored according to the average pH. Contribution to membrane of the sum of fatty acids that are (B) positively or (C) negatively correlated to PC1 as a function of pH. Tipping points and their 95% confidence intervals are shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using symbols (P < 0.001 ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1).

Expression of most genes shows tipping points at pH 7.3-6.9

To further assess the molecular effects of pH change, we compared the transcriptome responses of oysters exposed to the 15 pH conditions for 23 days using RNA-seq. To do this, we first clustered the differentially expressed genes that co-vary together using WGCNA analysis and retained the clusters that were correlated with pH (Table S4). Then, we plotted the frequency distribution of pH tipping-point for each cluster of genes (Figure 4). Owing to this original method, we found that 1054 genes, distributed in three clusters, showed linear (or loglinear) or piecewise regression with pH (Table S4). Among them, 49% showed tipping points at pH 7.3-6.9 (Figure 4A-C). Expression level of most genes were unchanged between pH conditions down to the pH tipping point, below which it increased for genes in clusters 1 and 2 (Figure 4A-B), or decreased for genes in cluster 3 (Figure 4C). Some genes linearly increased for clusters 1 and 2, or decreased for cluster 3 with decreasing pH.

Gene ontology analysis (GO) showed that most of the genes from cluster 1 (42%) exhibited tipping-points at pH 7.3-6.9 (Figure 4A) and were associated with GO terms corresponding to the regulation of RNA-transcription, cellular metabolism, macromolecule biosynthesis and negative regulation of cell-cell adhesion (Table 1). The expression of another group of genes from cluster 1 (14%) increased linearly (or loglinearly) with decreasing pH and was associated with GO terms corresponding to GTP-binding, GTPase activity and ribonucleotide metabolism (Table 1). The expression of most of the genes from cluster 2 (44%) exhibited tipping-points at pH 7.3- 7.0, whereas another large group of genes (18%) increased linearly (or loglinearly) with decreasing pH (Figure 4B). These genes were associated with GO terms corresponding to ribosome synthesis, RNA-binding, translation and protein/amino acid synthesis (Table 1). The expression of 62% of the genes from cluster 3 exhibited tipping-points at pH 7.2-6.9 and decreased thereafter (Figure 4C). These genes were associated with GO terms

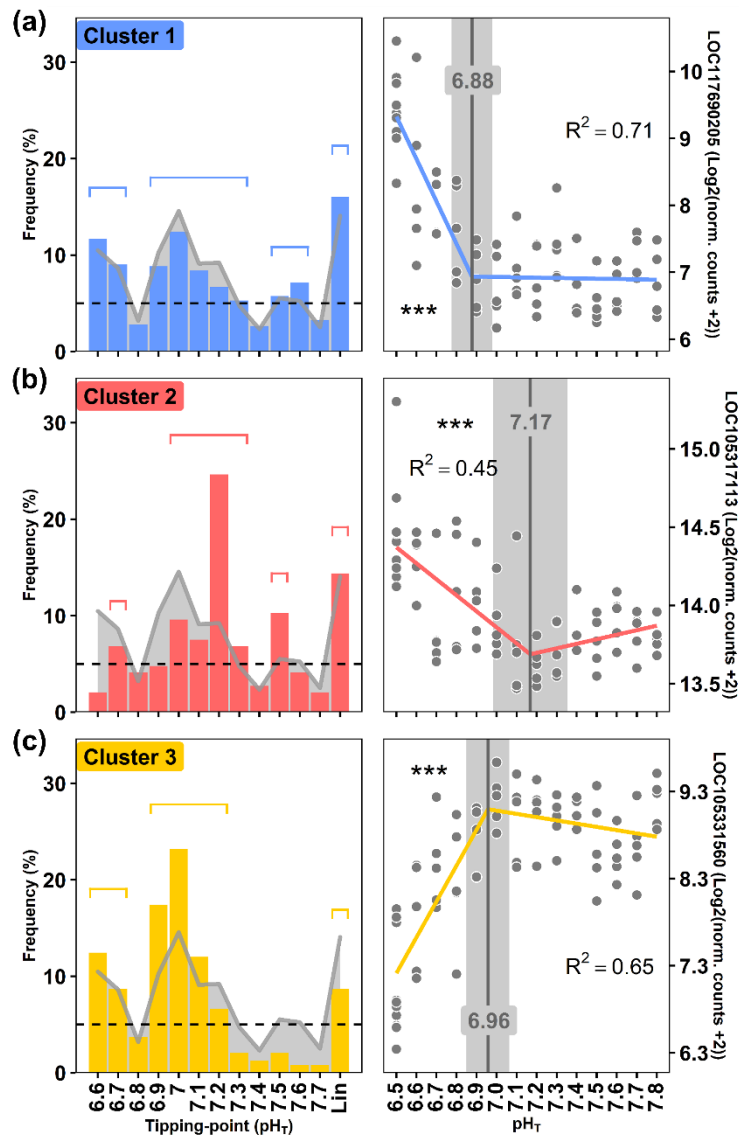


Figure 4. Tipping points of oyster transcriptome. (A-C) Frequency distribution of tipping-point for piecewise linear relationships (left side). Linear and loglinear models (no tipping-point) are under “Lin” name. Genes are grouped into three clusters of genes that co-vary together. The grey line indicates the distribution frequency of all genes irrespective of clusters. Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies > 5% (shown as a dotted line), were grouped together. The segments above the bars indicate the groups of genes on which GO analyses were conducted. In each case, the gene that best represents the cluster according to module membership, gene significance for pH and R^2 is presented as a function of pH as an example (right side). Tipping points and their 95% confidence intervals are shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using stars ($P < 0.001$ ***, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ *). Gene names are: LOC117690205: monocarboxylate transporter 12-like, LOC105317113: 60S ribosomal protein L10a, LOC105331560: protocadherin Fat 4 corresponding to ion transport and more specifically to transmembrane cation transport (Table

1).

Expression of genes related to biomineralization shows tipping point at pH 7.1-6.9

We specifically examined the genes that are commonly reported in the scientific literature as being involved in the calcification process and in the formation of the organic matrix of the shell and periostracum. We found that the expression of 60% of the 38 genes involved in the calcification process that were retained by our models showed pH tipping points between 6.9 and 7.1 (Table 2). These genes encode for calcium-binding proteins, Ca²⁺ signaling pathway, amorphous calcium carbonate-binding proteins and ion transmembrane transporters. Most of these genes decreased below the tipping-point (n = 14) while others increased (n = 8). The expression of genes associated with the regulation of the synthesis of the shell organic matrix and the periostracum (n = 11) generally increased with decreasing pH (Table 2). The relationships were loglinear (n = 3) or piecewise (n = 8).

Among these 38 genes, the family of genes that are the most represented are coding for acetylcholine receptors, monocarboxylate transporters and tyrosinase synthesis (Table 2). The expression of four genes coding for acetylcholine receptors decreased below tipping points at pH 6.9-7.0. The expression of five genes coding for monocarboxylate transporters increased with decreasing pH, and four of them showed pH tipping points between 7.3 and 6.6. The expression of four genes associated to tyrosinase synthesis early increased with decreasing pH and three of them showed tipping points between pH 7.4 and 7.1.

Table 1. Gene ontology term enrichment and tipping point. Model characteristics, physiological function and gene ontology for each cluster. For each GO term, the P-value of Bonferroni test is displayed using symbols (P < 0.001 ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·). Abbreviations: TP: tipping point

Cluster	Models			Physiological function	Gene Ontology			
	shape of the relationship	TP range	number of genes		GO	name	number of genes	p bonferroni
1	↖↖	6.9-7.3	283	regulation of RNA-transcriptionGO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	38	**
				GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	30	***
				GO:2000112	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	41	*
				GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	39	*
				GO:0022408	negative regulation of cell-cell adhesion	8	•
	↖	n.a.	96	GTP metabolismGO:0003924	GTPase activity	8	**
				GO:0005525	GTP binding	9	*
				GO:0032561	guanyl ribonucleotide binding	9	•
				GO:0032550	purine ribonucleoside binding	9	•
						ribonucleotide metabolism		
2	↖↖	7.0-7.3	62	GO:0000027	ribosomal large subunit assembly	4	**
				GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	10	***
				GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	6	***
				GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	6	*
				GO:1990932	5.8S rRNA binding	3	***
				GO:0019843	rRNA binding	8	***
				GO:0003729	mRNA binding	6	*
				GO:0002181	cytoplasmic translation	8	***
				GO:0043604	amide biosynthetic process	25	***
				GO:0043043	peptide biosynthetic process	25	***
	↖	n.a.	25	ribosome synthesis / ribosomal subunit assemblyGO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	3	**
				GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	6	***
				GO:0006412	translation	10	***
				GO:0006364	rRNA processing	4	•
				GO:0043043	peptide biosynthetic process	10	***
3	↖↖	6.9-7.2	150	GO:0006811	ion transport	19	**
				GO:0022890	inorganic cation transmembrane transporter activity	14	*
				GO:0008324	cation transmembrane transporter activity	14	•

Table 2. Tipping points of genes related to calcification and production of the shell organic matrix. Model characteristics and physiological function are reported for each gene. The slope inclination is displayed using arrows only if it is significant according to Student t tests ($P < 0.05$). Abbreviations: TP: tipping point, CBP: calcium-binding proteins, ACCBP: amorphous calcium carbonate-binding proteins, SMP: shell matrix proteins.

Physiological function		Model					Gene		
		model	TP	slope 1	slope 2	R^2	cluster	name	
"Calcification" regulation of $CaCO_3$	ion transport	piecewise	6.6±0.1	↖	n.s.	0.33	1	sodium-dependent phosphate transport protein 2B	
			6.6±0.0	↖	n.s.	0.37	1	monocarboxylate transporter 5	
	CBP		6.6±0.0	↖	n.s.	0.20	1	fibrillin-2-like	
			6.6±0.0	↙	n.s.	0.48	3	EF-hand Ca-binding domain-containing protein 6	
	Ca^{2+} signaling pathway	CBP		6.7±0.2	n.s.	↖	0.20	2	neurocalcin-delta
				6.7±0.1	↙	n.s.	0.32	3	ankyrin repeat and EF-hand domain-containing protein 1
	Ca^{2+} signaling pathway			6.8±0.1	↙	n.s.	0.40	3	polycystin-2
				6.9±0.3	n.s.	↖	0.09	1	neurocalcin-like protein
	ion transport	CBP		6.9±0.1	↖	n.s.	0.71	1	monocarboxylate transporter 12-like
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.17	3	D-galactoside-specific lectin
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.31	3	sarcoplasmic calcium-binding protein
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.42	3	calmodulin-like protein 12
	ion transport	ACCBP		6.9±0.1	↙	↙	0.45	3	sodium/calcium exchanger 3
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.49	3	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.36	3	acetylcholine receptor subunit beta
				6.9±0.1	↙	n.s.	0.31	3	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3
	Ca^{2+} signaling pathway	signaling pathway		7.0±0.2	↖	n.s.	0.17	1	metabotropic glutamate receptor 5
				7.0±0.2	↖	n.s.	0.30	1	toll-like receptor 4
	ion transport			7.0±0.2	n.s.	↖	0.19	1	G protein-activated inward rectifier potassium channel 2
				7.0±0.4	n.s.	↖	0.15	1	monocarboxylate transporter 9
				7.0±0.1	↙	n.s.	0.29	3	organic cation transporter protein
				7.0±0.1	↙	n.s.	0.32	3	small conductance calcium-activated potassium channel protein 2
				7.0±0.1	↙	n.s.	0.24	3	sodium/glucose cotransporter 4
				7.0±0.1	↙	n.s.	0.65	3	protocadherin FAT 4
	Ca^{2+} signaling pathway	ACCBP		7.0±0.1	↙	n.s.	0.43	3	acetylcholine receptor subunit beta-type unc-29
				7.1±0.3	↖	n.s.	0.28	1	neurogenic locus notch homolog protein 1
	Ca^{2+} signaling pathway	CBP		7.1±0.2	↖	n.s.	0.26	1	protocadherin gamma-A4
				7.1±0.1	↙	↙	0.42	3	delta-like protein 4 / delta-like protein C
	ion transport			7.1±0.1	↙	n.s.	0.28	3	calcium-activated potassium channel slowpoke

	<i>Ca²⁺ signaling pathway</i>		7.2±0.1	↖	n.s.	0.18	1	protocadherin-11 X-linked
			7.2±0.2	↙	n.s.	0.14	3	cadherin-87A
	<i>ion transport</i>		7.3±0.2	↖	n.s.	0.20	1	monocarboxylate transporter 12-like
	<i>CBP</i>		7.4±0.1	↖	n.s.	0.29	1	calmodulin-A
	<i>Ca²⁺ signaling pathway</i>		7.5±0.1	↖	n.s.	0.21	1	protocadherin gamma-B1
	<i>ion transport</i>		7.6±0.1	↖	↖	0.33	1	potassium channel GORK
		loglinear	n.a.	↖	n.a.	0.42	1	monocarboxylate transporter 9-like
	<i>CBP</i>		n.a.	↙	n.a.	0.25	3	fibrillin-1
"Shell organic matrix" <i>regulation of the synthesis of the organic part of the shell & periostracum</i>	<i>SMP</i>	piecewise	6.6±0.0	↖	↖	0.66	1	asparagine-rich protein
			7.0±0.1	↖	n.s.	0.21	1	perlucin-like protein
	<i>SMP, periostracum formation</i>		7.0±0.1	↙	n.s.	0.37	3	putative tyrosinase-like protein tyr-1
			7.1±0.2	↖	n.s.	0.20	1	tyrosinase-like protein 2
			7.4±0.2	↖	n.s.	0.24	1	tyrosinase-like protein 2
			7.4±0.2	↖	n.s.	0.30	1	tyrosinase-like protein 2
	<i>SMP, carbonic anhydrase</i>		7.5±0.2	↖	n.s.	0.19	1	nacrein-like protein F2
			7.5±0.2	↖	n.s.	0.25	1	nacrein-like protein / carbonic anhydrase 6
	<i>SMP</i>	loglinear	n.a.	↙	n.a.	0.23	3	leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 5-like
	<i>SMP, periostracum formation</i>		n.a.	↖	n.a.	0.43	1	tyrosinase-like protein 1
<i>SMP</i>		n.a.	↖	n.a.	0.28	1	circumsporozoite protein-like	

Discussion

Here we provide the first reaction norm of juvenile oyster *C. gigas* assessed by combining macro-physiological traits and micro-molecular characteristics. This novel approach applied to juvenile oysters exposed to a wide range of pH conditions revealed that macro-physiological parameters such as growth, calcification, food intake, and respiration exhibited pH tipping points that coincide with a major reshuffling in membrane lipids and transcriptome that was previously unappreciated, but others like shell parameters seemed uncoupled from global effects (Figure 5). This comprehensive view of the oyster response to pH sheds new light on adaptation capacity of this species to OA. We indeed identify low tipping points for most

physiological traits that suggest the species is robust to OA, but reveal sensitivity of shell parameters above the tipping points that potentially impact animal fitness. We therefore determine the true sensitivity of oyster to pH and identify the most relevant and sensitive response variables.

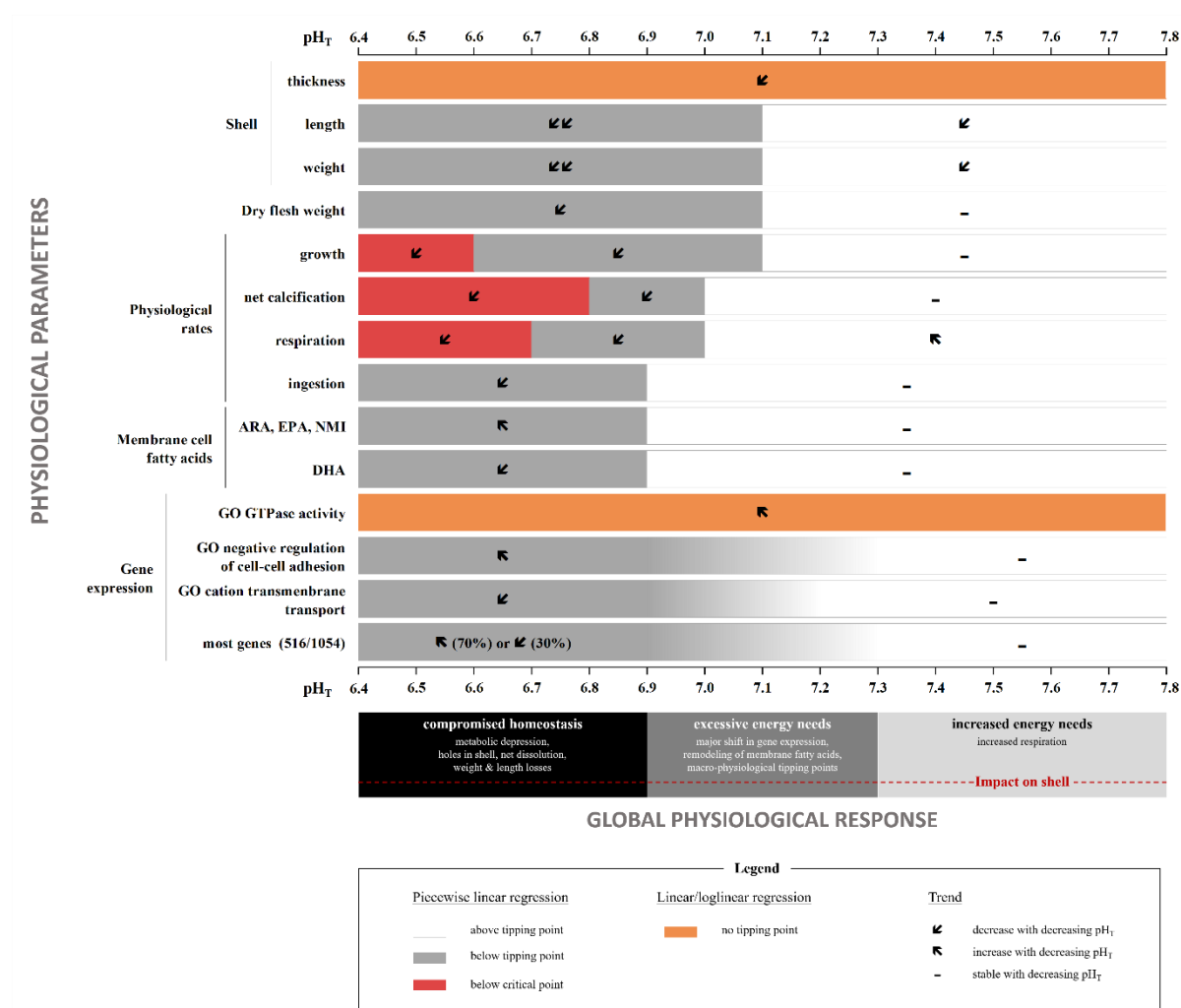


Figure 5. Graphical summary of the reaction norm of juvenile oysters *Crassostrea gigas* over a wide range of pH conditions. Abbreviations: GO, gene ontology term; ARA, arachidonic acid, EPA, ecosapentaenoic acid, DHA, docosahexaenoic acid, NMI, non-methylene interrupted.

We first identify a global tolerance threshold for juvenile *C. gigas* at pH 6.9-7.3, corresponding to the tipping points identified for the majority of the examined parameters. In line with this, several studies based on IPCC scenario assumed the existence of tipping points

below pH 7.5-7.4 for growth, calcification, acid-base equilibrium, and reproduction in oysters and mussels (Boulais et al., 2017; Fitzner et al., 2014; Lannig et al., 2010). Our results are also in agreement with previous studies showing that there are no significant changes in growth, respiration, mortality, metabolic rate, ion regulation, energy reserves, gene expression and fatty acid profile in juveniles and adults of *C. gigas* for pH values above 7.3. (Clark et al., 2013; Lannig et al., 2010; Lemasson et al., 2018; Timmins-Schiffman et al., 2014; Wang et al., 2020). Below tipping points, growth, calcification, respiration and feeding rate decreased markedly, likely reflecting increasing maintenance cost up until reaching critical points that are representative of metabolic depression (Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005; Sokolova, 2021). It is noteworthy that longer exposure time might have revealed an impact of the pH on survival or reproduction, two important parameters for fitness. Survival should be compromised below the tipping point as the animal shift to metabolic depression, i.e., a short-term survival strategy (Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005).

The tipping points we determined at pH 7.3-6.9 ($p\text{CO}_2 \sim 2600\text{-}8200 \mu\text{atm}$) are well below IPCC projections for 2100 in open ocean waters (pH=7.8 according to scenario RCP 8.5 IPCC, 2019). However, acidification events with pH values as low as 7.4-7.0 ($p\text{CO}_2 > 3000 \mu\text{atm}$) currently occur transiently in estuarine ecosystems in relation to eutrophication and hypoxia (Frankignoulle et al., 1996; Melzner et al., 2013; Proum et al., 2017; Wallace et al., 2014) and may explain why the physiological tipping point of oysters is so low. These acidification events are expected to become increasingly frequent and intense in the future (IPCC, 2019), such that the physiological tipping points defined here for juvenile oysters may be reached.

This point outs the importance of tipping point for coastal management and conservation in a changing world. Tipping-point is valid for a whole population regardless of habitat. Here we used juveniles that originate from a large genetic pool and *C. gigas* is a weakly genetically-

structured species (Meistertzheim et al., 2013). However, it was recently shown that wild and domesticated oysters populations vary in their adaptive response to OA (Durland et al., 2019). We therefore need to verify that pH tipping points defined in our study are valid in genetically differentiated populations before integrating them in biogeographic models of species distribution. Finally, tipping point is a single value that reflects susceptibility to stressors that is easily communicable to end-users and society (Bednaršek et al., 2019, 2021).

We show here that shell parameters, i.e. thickness, weight and length, were altered as soon as pH decreased from ambient levels, as already reported for many shellfish species (Byrne & Fitzner, 2019). Shell thickness is generally related to shell strength and therefore with protection against predation and resistance to mechanical stress related to wave exposure and aquaculture processes. Thus, moderate acidification increases predation risk of young *C. gigas* through reduction of shell strength (Wright et al., 2018). We also find that respiration rate first increased when pH decreased, suggesting that metabolism was readily impacted. However, body condition (dry flesh weight) and energy reserves (TAG-ST and carbohydrate, Figure S4) were not affected by pH, likely because oysters were fed *ad libitum* (Leung et al., 2019; Thomsen et al., 2013). Finally, we report here a linear increase in the expression level of genes related to GTPase activity and GTP binding, which are characteristics of stress response in *Crassostrea* spp. (Yan et al., 2018). Overall, these changes suggest that longer exposure to moderate acidification (above tipping point) could impair overall oyster fitness.

We further show that this reduction in shell parameters was not related to metabolic depression or to changes in net calcification or global gene expression. In contrast, a recent meta-analysis on *C. gigas* suggests that OA induces a reduction in shell thickness that is related to an overall transcriptional change inducing metabolic depression and alteration of calcification rate (Ducker & Falkenberg, 2020). Here we revisit these assumptions and find in

agreement with other prior studies that no metabolic disruptions occurred while shell strength and thickness decreased at pH 7.3-7.7 (Timmins-Schiffman et al., 2014; Wright et al., 2018).

Concomitantly, a delamination of the periostracum, the organic coat covering the shell, may have occurred at pH levels above the tipping point, probably altering shell protection. This was supported by an apparent increase in shell bleaching and expression of four genes coding for tyrosinase-like proteins. Tyrosinases are involved in periostracum synthesis and the increase in expression of their related genes is often considered as a mechanism to limit the damage to the periostracum and the corrosion of the shell in reaction to OA (Hüning et al., 2013). Delamination of the periostracum due to moderate OA was frequently associated with alteration of shell properties such as weakening and thinning (Alma et al., 2020; Auzoux-Bordenave et al., 2019; Bressan et al., 2014; Coleman et al., 2014; Peck et al., 2016, 2018; Zhao et al., 2020). Our results agree with the idea that OA is more a dissolution problem than a biomineralization problem (Rajan et al., 2021).

This investigation of tipping points at the micro-scale also provides new insights on the physiological response of oysters to OA. For the first time, we find a major remodeling of membrane lipids in response to OA and observed a tipping point at pH 6.9. This remodeling consisted of decreasing the long chain PUFA DHA (22:6n-3) that is essential for growth and survival (Knauer & Southgate, 1999; Langdon & Waldock, 1981), at the benefit of eicosanoid precursors (ARA, 20:4n-6 and EPA, 20:5n-3) involved in the stress response (Delaporte et al., 2003). Since membrane fatty acid composition influences the activity of transmembrane proteins involved in ion transport (Hazel & Williams, 1990; Hochachka & Somero, 2002), it could also have been related to regulation of acid-base homeostasis and perhaps calcification under OA.

In line with this, we find an overall decrease in expression of genes related to cation transmembrane transport below tipping points at pH 6.9-7.2 that can be related to alteration of calcification and acid-base homeostasis (Zhao et al., 2020). Concomitantly, we observe an overall decrease in the expression of genes coding for proteins involved in the regulation of calcification through calcium signaling pathway, calcium homeostasis, calmodulin signaling pathway and regulation of calcium carbonate crystal growth (Feng et al., 2017; Wang et al., 2017; Zhao et al., 2020).

In our analysis, we also identify families of genes that must play an important role in oyster response to OA. Among these genes, we identify four genes coding for acetylcholine receptors that are known for regulating and ordering the formation of the shell micro-structure (Feng et al., 2017). We also find five monocarboxylate transporters coding genes, members of a family of proteins that act as co-transporters of protons H^+ , that may be involved in the regulation of acid-base homeostasis and calcification process (Tresguerres et al., 2020; Wang et al., 2020). These proteins also co-transport monocarboxylates such as lactate or pyruvate and were reported to be involved in the stress response of oysters through induction of anaerobiosis under metabolic depression (Ertl et al., 2019).

In conclusion, we show that juvenile *C. gigas* have a broad tolerance to ocean acidification, exhibiting tipping points around pH 7.3-6.9 for most parameters (Figure 5). Nonetheless, we observe that shell parameters change as soon as pH drops, well before tipping points are reached, suggesting animal fitness is likely to be affected. This thus raises concerns about the future of natural and farmed oyster populations in a high- CO_2 world. This new framework for identification of tolerance threshold in organisms represents a breakthrough in the field of global change research. It was made possible by (1) combining reaction norm assessment and thorough molecular and biochemical analyses of animal responses, and (2)

developing a procedure to analyze and synthesize omics data measured over an environmental range.

We believe that such an integrative and holistic approach could now be applied to other organisms and integrate intra-specific variation, life-stages, generations, and other stressors such as temperature, nutrition, pollutants or oxygen levels. Although this approach requires significant financial resources, it allows to determine the true sensitivity of a species to a stressor and to identify the most relevant and sensitive response variables to study in the future.

Supplementary information

Note S1

Temperature, salinity and O₂ saturation levels were stable across the experimental period and similar among pH conditions (Table S2). Seawater was undersaturated with respect to calcite and aragonite when pH was below 7.3 and 7.6, respectively (Table S2). However, parameters of carbonate chemistry were sometimes similar for different pH conditions. This reflects the difference in the frequency of measurements between the parameters (twice daily for pH and weekly for TA). Also, TA decreased slightly but linearly with increasing pH ($R^2 = 0.82$, slope = -0.08, $P < 0.001$) suggesting that seawater renewal was likely not sufficient to counteract both the uptake and the release of carbonate ions from net calcification at high pH and net dissolution at low pH, respectively (Figure S2).

Figure S1

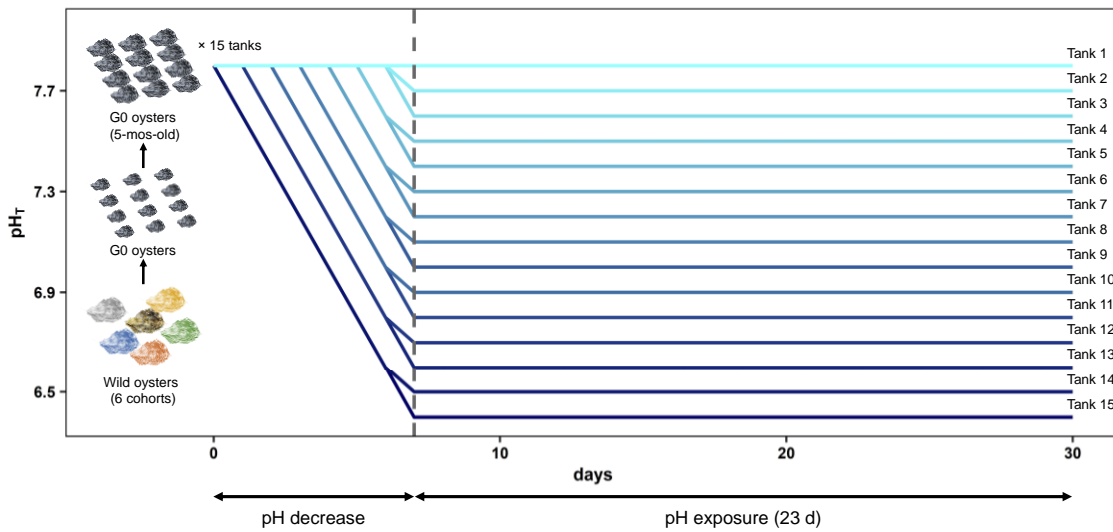


Figure S1. Production of oysters and experimental design. Five-month-old oysters originating from 6 cohorts collected in the wild were exposed for 23 d to one nominal pH condition after gradual pH decrease. There were 15 nominal pH conditions, one tank per condition.

Figure S2

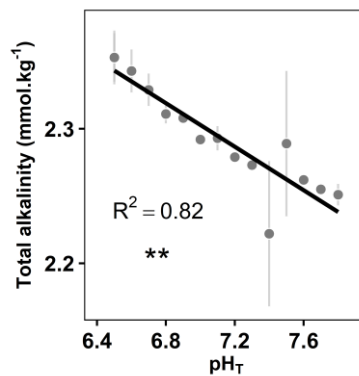


Figure S2. Total alkalinity as a function of pH (total scale). Data are means \pm SD values recorded during the 23 d of exposure. The significance level of the slope is presented using stars (P <0.001 ***, <0.01 **, <0.05 *, <0.1).

Figure S3

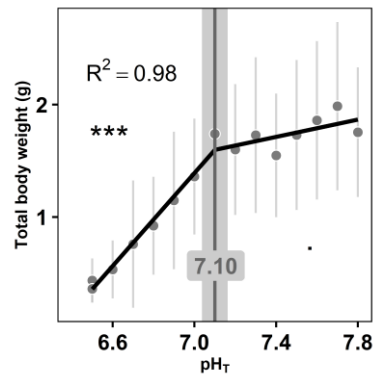


Figure S3. Total body weight of oysters as a function of pH (pH on the total scale). Data are means \pm SD. Tipping-point and its confidence intervals is shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using stars ($P < 0.001$ ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·).

Figure S4

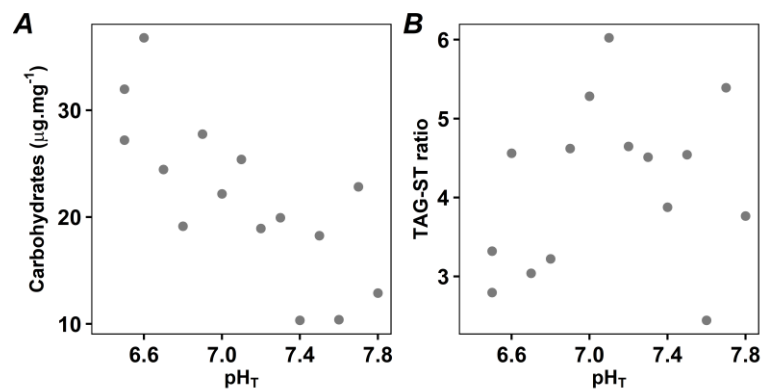


Figure S4. Energy reserves of oysters as a function of pH (total scale). (A) total carbohydrates and (B) triacylglycerol/sterol ratio (TAG-ST). Relationships were not significant ($P > 0.05$).

Table S1

Table S1. Seawater parameters during the incubations. pH on the total scale (pH_T), calcite saturation state (Ω_{CA}), total alkalinity (TA), oxygen saturation (O₂), salinity (S) and temperature (T). *Average* represents the mean values between the onset and the end of the incubations. Δ represents the difference between the end and the onset of the incubations. Values are mean \pm SD.

Nominal pH _T	Average pH _T	Δ pH _T	Average Ω_{CA}	$\Delta \Omega_{CA}$	Δ TA ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	Δ O ₂ (%sat)	Δ NH ₄ ⁺ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Average S	Average T (°C)
Blank	8.0 \pm 0.0	0.0	4.4 \pm 0.0	0.0	-3	2	0.0	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
Blank	8.0 \pm 0.0	0.0	4.3 \pm 0.0	0.0	1	1.7	-0.1	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1
Blank	8.0 \pm 0.0	0.1	4.4 \pm 0.0	0.0	0	1.9	0.3	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.8	7.9 \pm 0.1	0.0	3.1 \pm 0.5	0.7	80	3	-1.1	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.7	7.6 \pm 0.1	0.1	1.7 \pm 0.3	0.4	65	6.5	-1.2	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1
7.6	7.5 \pm 0.1	0.0	1.4 \pm 0.2	0.3	60	5	-1.0	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.5	7.4 \pm 0.1	-0.1	1.1 \pm 0.2	0.3	72	7.9	1.4	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.4	7.3 \pm 0.1	0.1	0.9 \pm 0.2	0.2	72	7.3	-1.8	35.7 \pm 0.0	21.5 \pm 0.1
7.3	7.3 \pm 0.0	-0.2	1.0 \pm 0.0	0.0	61	6.1	-1.0	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.2	7.1 \pm 0.0	0.0	0.6 \pm 0.0	0.0	38	6.7	-0.8	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
7.1	7.1 \pm 0.0	0.0	0.6 \pm 0.0	0.0	44	5.5	-1.1	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1
7.0	7.0 \pm 0.0	0.0	0.5 \pm 0.0	0.0	36	6.1	-2.0	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
6.9	6.9 \pm 0.0	0.1	0.4 \pm 0.0	0.0	19	5.5	-0.9	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
6.8	6.9 \pm 0.1	-0.1	0.4 \pm 0.1	-0.1	2	4.9	-1.0	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1
6.7	6.8 \pm 0.1	-0.1	0.3 \pm 0.0	-0.1	13	3.1	-1.1	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
6.6	6.8 \pm 0.1	-0.2	0.3 \pm 0.1	-0.2	0	2.7	-0.6	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1
6.5	6.7 \pm 0.1	0.1	0.3 \pm 0.1	-0.1	-12	2.4	-0.6	35.7 \pm 0.0	21.7 \pm 0.1
6.4	6.6 \pm 0.1	0.0	0.2 \pm 0.0	0.0	-18	1.5	-0.6	35.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.1

Table S2

Table S2. Seawater parameters measured during the experiment in each experimental tank, including three blanks without oysters. pH on the total scale (pH_T), total alkalinity (TA), oxygen saturation (O_2), salinity (S), temperature (T), calcite saturation state (Ω_{CA}), aragonite saturation state (Ω_{AR}), CO_2 partial pressure (pCO_2) and dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations are shown (mean \pm SD). pH, O_2 , S and T were measured twice daily and TA was measured once a week.

<i>Nominal</i>		<i>Measured</i>				<i>Calculated</i>			
pH_T	pH_T	TA ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	O_2 (% sat)	S	T ($^{\circ}\text{C}$)	Ω_{CA}	Ω_{AR}	pCO_2 (μatm)	DIC ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)
Blank	8.0 \pm 0.1	2331 \pm 7	101.6 \pm 0.5	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	3.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.3	552 \pm 82	2111 \pm 31
Blank	8.0 \pm 0.1	2328 \pm 3	101.5 \pm 0.4	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	3.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.3	551 \pm 82	2108 \pm 29
Blank	7.9 \pm 0.2	2331 \pm 6	101.4 \pm 0.4	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	3.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.3	552 \pm 82	2111 \pm 29
7.8	7.8 \pm 0.1	2251 \pm 8	97.6 \pm 1.8	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	3.1 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	695 \pm 103	2082 \pm 33
7.7	7.7 \pm 0.1	2255 \pm 2	97.6 \pm 1.6	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	2.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2	1070 \pm 161	2152 \pm 19
7.6	7.6 \pm 0.1	2262 \pm 2	96.7 \pm 2.6	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1617 \pm 1	2217 \pm 2
7.5	7.5 \pm 0.1	2289 \pm 54	96.5 \pm 2.2	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	2091 \pm 49	2276 \pm 55
7.4	7.4 \pm 0.1	2222 \pm 54	97.1 \pm 2.1	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	2215 \pm 352	2219 \pm 66
7.3	7.3 \pm 0.0	2273 \pm 3	96.7 \pm 2.3	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.0 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	2644 \pm 4	2292 \pm 3
7.2	7.2 \pm 0.1	2279 \pm 3	96.8 \pm 2.2	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	4276 \pm 7	2371 \pm 3
7.1	7.1 \pm 0.1	2293 \pm 9	96.8 \pm 1.7	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	5067 \pm 671	2414 \pm 30
7.0	7.0 \pm 0.0	2292 \pm 3	97.2 \pm 1.5	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	5062 \pm 664	2413 \pm 27
6.9	6.9 \pm 0.1	2308 \pm 2	97.7 \pm 1.6	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	8160 \pm 1063	2536 \pm 38
6.8	6.8 \pm 0.1	2311 \pm 7	97.6 \pm 1.9	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	8777 \pm 26	2560 \pm 8
6.7	6.7 \pm 0.1	2329 \pm 12	98.2 \pm 1.3	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	11172 \pm 60	2656 \pm 13
6.6	6.6 \pm 0.1	2343 \pm 16	98.9 \pm 1.0	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	15691 \pm 3912	2813 \pm 135
6.5	6.5 \pm 0.2	2353 \pm 20	99.2 \pm 0.8	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	19865 \pm 4915	2953 \pm 164
6.4	6.5 \pm 0.3	2353 \pm 18	99.2 \pm 0.9	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	23079 \pm 5471	3054 \pm 183

Table S3

Table S3. Relative contribution of fatty acids to membrane. Their contribution (%) and Pearson's correlation to the first principal component (PC1) of the PCA are showed.

Average pH _T	Fatty acid (% total fatty acids)										
	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	
7.8	2.7	14.1	1.7	9.7	5.6	1.8	5.3	2.2	1.3	1.7	
7.7	2.7	12.5	2.1	9.2	3.6	1.9	6.0	2.3	1.4	1.8	
7.6	2.5	13.7	1.6	9.8	4.0	1.9	5.4	2.4	1.3	1.6	
7.5	2.0	12.5	1.6	10.8	4.4	1.6	5.6	1.8	1.2	1.4	
7.4	2.2	13.0	1.7	10.8	4.7	1.6	5.5	1.9	1.3	1.5	
7.3	2.2	13.7	1.6	9.4	4.3	1.8	5.1	2.2	1.3	1.6	
7.2	2.5	12.8	1.8	9.9	3.9	1.7	5.5	2.2	1.4	1.9	
7.1	2.3	12.0	1.8	11.2	4.6	1.7	5.2	1.9	1.4	1.7	
7.0	2.4	12.7	1.8	10.7	4.3	1.6	4.4	1.9	1.2	1.6	
6.9	2.0	11.6	1.7	11.3	4.8	1.8	6.0	2.0	1.3	1.6	
6.8	2.0	12.0	1.7	9.8	4.7	1.8	5.9	2.0	1.1	1.4	
6.7	1.5	11.9	1.7	10.6	6.3	1.7	6.2	1.6	0.8	1.0	
6.6	2.0	11.8	1.9	9.3	4.6	2.0	6.7	2.1	1.0	1.4	
6.5	1.8	10.8	2.3	10.0	2.4	1.7	6.7	1.4	0.7	1.0	
6.5	1.5	11.3	2.0	9.0	5.7	1.7	6.5	1.3	0.7	0.7	
PCA	contribution to PC1 (%)	1.9	13.6	0.5	0.7	0.0	0.0	4.6	1.7	1.1	1.8
	correlation to PC1 (Pearson)	0.8	0.9	-0.8	0.2	0.0	0.0	-0.7	0.8	0.9	0.9

Average pH _T	Fatty acid (% total fatty acids)									
	20:1 dma	20:0	20:1n-11	20:1n-7	20:4n-6	20:5n-3	22:2 NMI _{i,j}	22:5n-6	22:6n-3	
7.8	1.9	1.1	1.7	3.8	4.5	8.7	5.0	3.2	15.8	
7.7	1.9	1.1	1.9	3.7	4.9	9.9	5.0	3.0	15.2	
7.6	1.9	1.2	1.7	4.1	4.4	9.5	4.5	3.0	16.3	
7.5	2.1	1.1	2.0	4.0	4.5	9.6	5.4	3.1	16.1	
7.4	2.1	1.1	2.0	4.1	4.4	9.2	5.4	3.2	16.6	
7.3	1.8	1.2	1.8	3.9	4.7	10.1	4.7	2.9	16.0	
7.2	1.9	1.1	2.0	4.1	4.5	9.6	5.1	3.0	16.3	
7.1	2.1	1.2	2.2	4.2	4.6	9.6	6.0	2.8	14.0	
7.0	2.1	1.1	2.1	4.3	4.9	9.9	5.7	3.0	15.7	
6.9	1.9	1.1	2.1	4.0	4.8	9.7	5.4	3.1	15.5	
6.8	2.0	1.2	2.0	4.4	5.1	9.9	5.7	3.0	14.7	
6.7	2.3	1.2	2.1	4.5	5.6	10.3	5.9	2.5	13.7	
6.6	1.9	1.4	1.9	4.3	5.4	9.7	5.9	2.7	14.3	
6.5	2.8	1.2	2.2	4.9	6.5	11.1	6.6	2.0	12.5	
6.5	2.5	1.4	2.1	5.4	6.9	11.1	6.4	2.0	11.8	
PCA	contribution to PC1 (%)	1.2	0.1	0.2	3.2	11.8	6.1	5.8	2.8	43.0
	correlation to PC1 (Pearson)	-0.8	-0.7	-0.6	-0.9	-1.0	-0.9	-0.9	0.9	1.0

Table S4

Table S4 Number of genes modelled against pH. Each step of filtering and the corresponding number of selected genes are specified.

	WGCNA cluster of gene	correlated with pH	modelled & slope $\neq 0$	model	
1	3380	1691	664	piecewise	567
				linear	97
2	723	343	148	piecewise	130
				linear	18
3	2073	623	242	piecewise	221
				linear	21

CHAPITRE 2

Capacité de récupération de l'huître
creuse *Crassostrea gigas* en dessous
du point de bascule

Is the tipping point a point of no return for oyster growth under ocean acidification?

Mathieu Lutier¹, Fabrice Pernet¹, Carole Di Poi^{1*}

¹LEMAR UMR6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, ZI pointe du diable, CS 10070, F-29280 Plouzané, France.

Correspondence and requests for materials should be addressed to CDP (email: carole.dipoi@ifremer.fr)

Submitted to Biology Letters

Abstract

We are entering the Anthropocene where ocean acidification could exceed physiological tipping points of calcifying species, beyond which small pH changes will impact their fitness. However, many of them, like the Pacific oyster, thrive in dynamic environments where acidification events are transient. Therefore, the long-term consequences of tipping point on fitness will depend on the reversibility of the effects occurring beyond when the pH rises again. This question has never been studied in the context of ocean acidification. We therefore investigated the ability of the Pacific oyster to recover from pH decrease, and in particular, to compensate growth stunting occurring below the tipping point. Juveniles were exposed to 15 pH conditions from 7.8 to 6.4 over 16 days and then returned to ambient pH conditions for 42-day recovery. Body weight was monitored as a proxy of growth and modelled as a function of time and pH level. During exposure, we identified a tipping point at pH 7.1 below which body weight decreased. Oyster growth trajectories continued to diverge over recovery time indicating that growth stunting was irreversible. Such irrevocable growth damages, that will occur when environmental pH changes exceed the species tipping point, would have dramatic economic and ecological consequences.

Keywords

Compensatory growth, Crassostrea gigas, Ocean acidification, Oyster, Phenotypic plasticity, Point of no return, Reaction norm, Recovery, Threshold, Tipping point

Introduction

Human activities have increased exponentially carbon dioxide emissions into the atmosphere, causing extremely rapid ocean acidification (OA). The projected pH reduction in the 21st century actually exceeds any pH changes that have occurred in the ocean over the last 300 million years (Caldeira & Wickett, 2003; Orr et al., 2005). Thus, OA is already challenging the adaptability of marine organisms, especially calcifiers that produce calcium carbonate-based structures, by impacting their metabolism, behavior, growth, reproduction as well as the integrity of their calcareous shell and exoskeleton (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2013; Tresguerres & Hamilton, 2017). Furthermore, there is increasing evidence of a physiological tipping point in the response of organisms to OA, beyond which a small pH reduction will have abrupt and dramatic consequences on individual's fitness (Dorey et al., 2013; Jager et al., 2016; H.-G. Lee et al., 2019; Lutier et al., 2022; Ventura et al., 2016).

Today, the characterization of physiological tipping points is identified as an urgent need to predict the fate of marine species and ecosystems facing global environmental changes (Carrier-Belleau et al., 2022; IPCC, 2019, 2022). However, many calcifiers thrive in variable coastal environments where acidification events occur transiently (Chan & Tong, 2020; Frieder et al., 2014; Hoshijima & Hofmann, 2019; Kapsenberg et al., 2018). Therefore, if pH reduction induces physiological damages, organisms could recover from fitness loss when pH returns to optimal conditions for their physiology (Gunderson et al., 2016). Thus, in dynamic environments, species resilience to environmental changes depends on the reversibility of damages occurring beyond the tipping point (Bednaršek et al., 2021), which has never been studied in the context of OA.

Here, we focused on the recovery capacities of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), the most cultivated calcifier worldwide (FAO, 2021), after exposure to a wide range of pH. *C. gigas*

is an intertidal species inhabiting highly variable habitats such as coastal areas and estuaries in temperate ecosystems (Miossec et al., 2009). Recently, juveniles were shown to exhibit a physiological tipping point at pH 7.1 below which growth stunting was observed following 23 d of exposure (Lutier et al., 2022). In oysters, juvenile growth is strongly related to individual fitness, e.g. vulnerability to predation, and to aquaculture profitability, e.g. time to reach market size (Boudry et al., 2003; K. D. Johnson & Smee, 2012; Kulp et al., 2011). In marine species thriving in dynamic environments and for which fitness is size related the ability to compensate for growth stunting after the end of a stress exposure (e.g. food deprivation, temperature, oxygen and pH changes), is often observed (Ali et al., 2003; Gobler & Talmage, 2013; Gurr et al., 2020; Hector & Nakagawa, 2012; Hurst et al., 2005; Keppel et al., 2016). We therefore identified the need to assess the reversibility of growth stunting occurring below the tipping point in the Pacific oyster.

To assess the compensatory growth potential in this species, *C. gigas* juveniles were exposed to 15 pH conditions over 16 d and then returned to ambient conditions for 42 d of recovery. Body weight growth was then modeled over time and pH of exposure. After returning to ambient pH, we expected two main growth responses that can be represented by theoretical growth models (Figures 1-2): (1) individual growth trajectories will converge over time and weight differences between oysters will gradually disappear (Figure 1A-2A); (2) growth trajectories will continue to diverge and individuals exposed to pH reduction beyond the tipping point will never catch-up with other oysters (Figure 1B-2B).

Material and methods

Experimental design

This experiment consisted in two steps: (1) exposure of juvenile oysters to 15 pH conditions for 16 days (exposure period) and (2) a return to ambient pH for 42 days (recovery period).

Exposure period

The protocol of pH exposure and the origin of the oysters are fully described in Lutier et al. (2022). Briefly, oyster's batches containing 292 ± 20 5-month-old individuals were exposed to 15 constant pH conditions ranging from 7.8 to 6.4 with a 0.1 unit step between two levels. The exposure was carried out in 15 independent flow-through experimental units where seawater was acidified by pure-CO₂ bubbling. Seawater was pumped from a pool, which is renewed with each spring tide, filtered at 5 µm and UV-treated. Live phytoplankton (1:1 in dry weight of *Isochrysis affinis galbana* and *Chaetoceros gracilis*) was continuously supplied to ensure *ad libitum* food availability to oysters. Photoperiod was 10h light: 14h dark and temperature was maintained at the species optimum of 22°C (Bayne, 2017). Each batch of oysters was randomly assigned to one tank and held at ambient pH for 3 d. Then, pH was progressively decreased (-0.2 pH unit d⁻¹) in each tank. Experimental pH conditions were all reached on January 27th 2019 and oysters were maintained at these experimental pH levels for 16 d.

Recovery period

After 16 d of exposure, 46 ± 1 individuals were subsampled from each batch and transferred into a 500L-tank in “common garden” where they were kept separated in tagged baskets. Seawater was entirely renewed every 80 min. The pH condition was ambient

depending on the seawater inflow while temperature, photoperiod and phytoplankton diet remained controlled in the same way as described before. Airlift ensured oxygenation and mixing of seawater. Twice a week, we randomly changes the position of the baskets in the 500L-tank in order to limit “tank-effect” that might be related to the hydrodynamic conditions within the system. No mortality was recorded during the exposure and the recovery periods.

Seawater carbonate chemistry

The complete protocols for the determination of seawater physicochemical parameters are described in Lutier et al. (2022). Temperature, salinity, dissolved oxygen saturation levels and pH were measured twice a day and every 2 days during the exposure and recovery periods respectively. pH was determined and expressed on the total scale. For the titration of total alkalinity, seawater samples were collected 2 times (days 2 and 10) and 4 times (days 7, 18, 30 and 39) during the exposure and recovery periods respectively. Carbonate chemistry parameters were then determined from pH and total alkalinity using the package seacarb v 3.2.16. of the R software.

Biometry

Each batch of oysters was weighted during the exposure on days 2, 6, 10 and 16 after reaching the nominal pH and then during the recovery period on days 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 28, 36 and 42. Each batch was drained and the total wet body weight was measured with a Mettler precision balance (Mettler-Toledo, Viroflay, France). For each batch, the mean individual body weight, thereafter designed as “weight”, was calculated as:

$$W = \frac{TW}{n},$$

where W is the mean individual body weight (g), TW is the total body weight of the batch (g) and n is the number of individuals in the batch.

Statistical analysis

First, in order to detect tipping point, we modeled weight as a function of exposure pH for each measurement time point (Figure 1, upper panel). We considered the first day of the recovery period as day 0 and therefore the experiment ran from day -16, i.e. onset of the exposure period, to day 42, i.e. end of the recovery experiment. For each time point, we tested and compared piecewise and linear regression models and selected the most appropriate using information criteria (see detailed procedure in Lutier et al., 2022). For each piecewise regression model, we estimated the tipping point, defined as the value of the factor (pH or day) where the dependent variable, e.g. weight, tipped. Significance of each slope was tested according to Student's *t* test. All selected regression models exhibited a tipping point.

Second, to assess the compensatory growth potential below the tipping point, we extracted the slopes of the models as a function of exposure pH, which represent the differences in weight between the pH conditions expressed as $g\ pH^{-1}$ (Figure 1, upper panel). We only extracted slopes below the tipping point because there were no weight differences above, i.e. no significant slopes (Table S1). We then modeled the weight difference as a function of time (Figure 1, lower panel). For comparison, we built theoretical models derived from data previously published in Lutier et al. (2022): (1) if compensatory growth had occurred, the weight differences below the tipping point should have decreased over the recovery period until completely disappeared (Figures 1A, 2A), (2) if there was no compensatory growth, weight differences should have persisted and increased (Figures 1B, 2B). To visualize growth trajectories, we also modeled weight as a function of time for each pH exposure (Figure 2).

For each model, normality of residual distribution was tested using Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances was graphically checked. All statistical analyses were performed using the R software v4.0.3 and the threshold of statistical significance was fixed at 0.05.

Piecewise regression models were built using the segmented v1.3-4 R package. The parameters of the models are displayed in supplementary materials (Table S1 and S2).

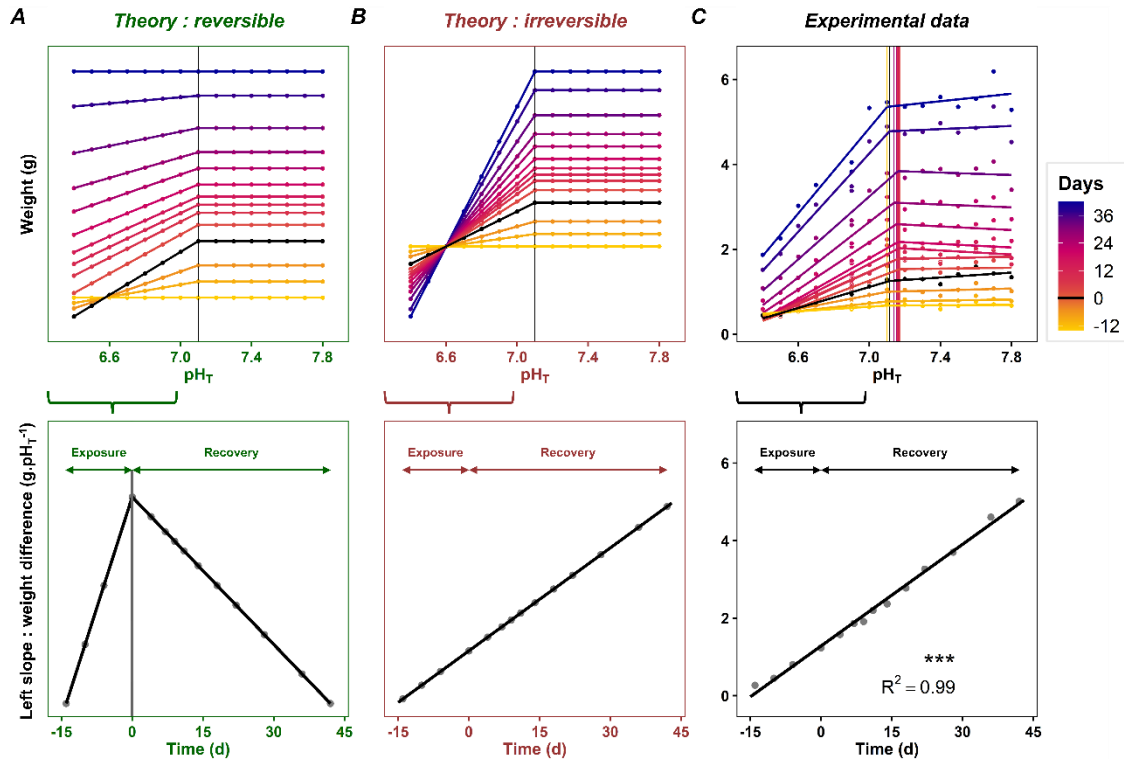


Figure 1. Body weight as a function of pH over time of exposure and recovery. (Higher panel) Piecewise linear regressions of weight as a function of pH of exposure. The color gradient represents the time, before and after day 0 of the recovery period which is highlighted in black. Vertical full lines represent tipping points for the different models. All the slopes above tipping point does not significantly differs from zero according to student t tests. (Lower Panel) Slopes of the piecewise linear regression models of weight as a function of pH of exposure represent the weight differences between individuals that were exposed to pH lower than tipping point, and are displayed as a function of time. Tipping points are shown by a vertical full line when it exists. For experimental data, the R squared is displayed and the significance levels of the slopes are presented using symbols ($P < 0.001$ ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·). (A-B) Theoretical models: (A) growth stunting is reversible and full compensatory growth occurs by the end of the recovery period, (B) growth stunting is irreversible and no compensatory growth occurs, and (C) experimental data.

Results & discussion

Determining tipping point, beyond which organisms will have to adapt to avoid population decline, is considered a priority in climate change research because environmental variations are becoming more frequent and unpredictable (Botero et al., 2015; Carrier-Belleau et al., 2022). In juvenile Pacific oysters, we identified a tipping point for body weight at pH 7.1 below which they exhibited growth stunting after short-term exposure to pH decrease, i.e. 2-16 d (Figure 1C, upper panel). This tipping point corresponds to the most extreme pH value recorded within *C. gigas* range (Melzner et al., 2013). Similar matches are commonly reported and result from the local adaptation of species to their environment (Dorey et al., 2013; Gibert et al., 2019; Jager et al., 2016). The tipping point at pH 7.1 is expected to be crossed in the future as a global pH reduction of -0.3 pH unit is projected by 2100 (IPCC, 2019). This will result in growth stunting in oysters which is a major loss of fitness, particularly for juveniles for which decreasing growth rate increases vulnerability to predation (Boudry et al., 2003; K. D. Johnson & Smee, 2012; Kulp et al., 2011). However, this threshold will not be crossed throughout the year. Indeed pH fluctuates considerably in *C. gigas* habitats with within-year variations of up to 1.2 units (Melzner et al., 2013), and remains above pH 7.9 most of the time (see pH monitoring data on the French coasts: https://wwz.ifremer.fr/cocorico2_en/Donnees). This implies that oysters will have periods to compensate for growth stunting when the pH rises again.

Here, we showed that below the tipping point, inter-individual weight differences increased over recovery time, i.e. for 42 d after returning to ambient pH conditions (Figure 1C, lower panel). This was a consequence of divergent growth trajectories (Figure 2C). Thus, it is likely that *C. gigas* has no compensatory growth potential to recover from growth damages occurring below the tipping point. This limited capacity has already been observed after food

deprivation in *C. gigas* larval and juvenile stages, which did not compensate for growth stunting after returning to optimal growth conditions (Ben Kheder et al., 2010; Brooks, 1999; Evans & Langdon, 2006). Globally, the ability for compensatory growth is known to be species-specific (Hector & Nakagawa, 2012; Steinberg, 2018), although only a few studies have addressed this question in the context of ocean acidification. For instance, the Pacific geoduck (*Panopea generosa*) exhibits compensatory growth in shell length at the larval and juvenile stages when returned to ambient pH conditions after a 1-2 week exposure to pH 7.0-7.4 (Gurr et al., 2020; Putnam et al., 2017). Conversely, the Olympia oyster (*Ostrea lurida*) post-larvae did not compensate growth stunting after being exposed during the entire larval cycle to pH 7.8 (Hettinger et al., 2013). However, the physiological tipping points in these species are unknown, which limits the comparison with our results.

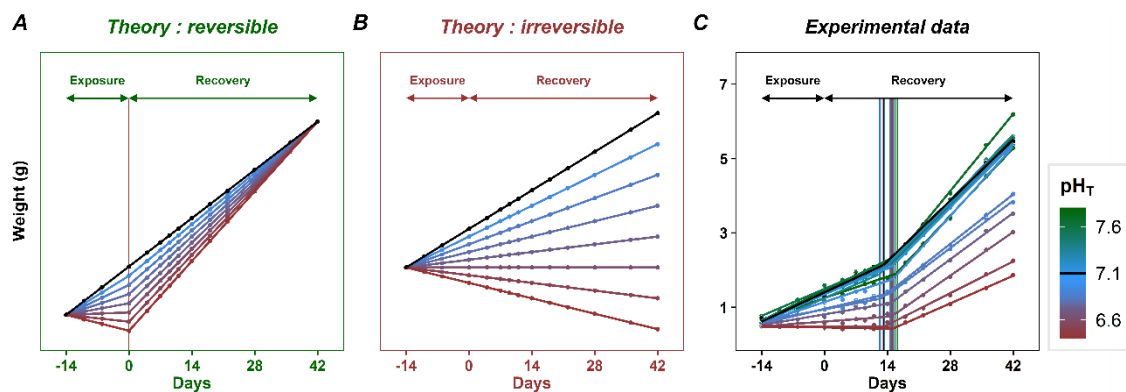


Figure 2. Growth trajectories of body weight over time for each pH of exposure. (A-C) Piecewise linear regressions of weight as a function of time. The color gradients represent the pH of exposure, before and after the tipping point at pH 7.1, which is highlighted in black. Vertical full lines represent tipping points for the different models. (A-B) Theoretical models: (A) growth stunting is reversible and full compensatory growth occurs by the end of the recovery period, (B) growth stunting is irreversible and no compensatory growth occurs, and (C) experimental data.

The tipping point found in body weight echoes the point of no return identified in crustaceans, fish and bivalves following exposure to food deprivation, and beyond which

induction of compensatory growth is impossible (Py et al., 2022; Yang et al., 2010). This point is reached when the intensity of food deprivation is too high, altering physiological functions and in particular digestive system over the long-term (Py et al., 2022). In addition to growth stunting, we have previously evidenced that juvenile oysters likely enter metabolic depression below the pH tipping point with significant impairments in feeding, respiration and calcification (Lutier et al., 2022). Compensatory growth comes at a significant cost to organisms which sometimes prioritize energy expenditure to recover physiological damages other than growth stunting (Py et al., 2022; Steinberg, 2018). It is therefore possible that, in our case, the cost of inducing compensatory growth outweighs its benefits for individual fitness. This hypothesis that trade-off occurs during recovery processes should be further investigated by monitoring other physiological parameters with a holistic approach.

Although the results did not indicate compensatory growth in *C. gigas*, it is worth noting an overall increase in oyster growth 14 d after returning to ambient pH conditions, regardless of the previous exposure pH (Figure 2C). Similar growth increases without compensatory growth have been observed previously in *C. gigas* larvae and juveniles recovering from food deprivation (Ben Kheder et al., 2010; Brooks, 1999; Evans & Langdon, 2006). Importantly, our results showed that all oyster batches reacted the same day, which likely represents a “tank effect”. This may be explained by more favorable conditions for oyster physiology in the common garden than in the exposure tanks, i.e. higher calcite saturation states and pH (Table 1). In addition, the time lag of 14 days before growth increase likely resumed the time required for oyster juveniles to acclimate to the new experimental condition. Similarly, acclimation periods have been observed in the growth of fish recovering from food deprivation (Nicieza & Metcalfe, 1997; Triebenbach et al., 2009).

Table 1. Seawater parameters during both the exposure (15 conditions) and recovery (common garden) periods. pH on the total scale (pH_T), total alkalinity (TA), oxygen saturation (O₂), salinity (S), temperature (T), calcite saturation state (Ω_{CA}), aragonite saturation state (Ω_{AR}), CO₂ partial pressure (pCO₂) and dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations are shown (mean \pm SD).

Period	Nominal		Measured				Calculated			
	pH _T	pH _T	TA ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	O ₂ (%sat)	S	T (°C)	Ω_{CA}	Ω_{AR}	pCO ₂ (μatm)	DIC ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)
Exposure	7.8	7.8 \pm 0.1	2256 \pm 5	97.6 \pm 1.8	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	2.9 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0	755 \pm 2	2101 \pm 5
	7.7	7.7 \pm 0.1	2256 \pm 2	97.7 \pm 1.7	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	2.3 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	977 \pm 1	2141 \pm 1
	7.6	7.6 \pm 0.1	2263 \pm 2	96.8 \pm 2.2	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1618 \pm 1	2217 \pm 2
	7.5	7.5 \pm 0.1	2305 \pm 65	96.6 \pm 2.2	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	2105 \pm 59	2292 \pm 66
	7.4	7.4 \pm 0.1	2207 \pm 67	97.0 \pm 2.3	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	2014 \pm 62	2193 \pm 68
	7.3	7.3 \pm 0.1	2273 \pm 5	96.6 \pm 2.5	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	1.0 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	2645 \pm 6	2292 \pm 4
	7.2	7.2 \pm 0.1	2279 \pm 4	96.9 \pm 2.4	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	4275 \pm 10	2370 \pm 4
	7.1	7.1 \pm 0.1	2295 \pm 11	96.8 \pm 1.8	35.7 \pm 0.1	21.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	5454 \pm 28	2431 \pm 11
	7.0	7.0 \pm 0.1	2290 \pm 1	97.2 \pm 1.6	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	4867 \pm 809	2404 \pm 32
	6.9	6.9 \pm 0.1	2309 \pm 2	97.7 \pm 1.6	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	8773 \pm 3	2558 \pm 2
	6.8	6.9 \pm 0.1	2308 \pm 6	97.3 \pm 1.9	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	8764 \pm 17	2557 \pm 8
	6.7	6.7 \pm 0.1	2323 \pm 9	97.9 \pm 1.4	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	11144 \pm 52	2650 \pm 9
	6.6	6.6 \pm 0.1	2350 \pm 17	98.6 \pm 1.0	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	17949 \pm 136	2890 \pm 20
	6.5	6.5 \pm 0.3	2358 \pm 26	99.0 \pm 0.8	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	22701 \pm 266	3047 \pm 31
	6.4	6.4 \pm 0.1	2356 \pm 24	98.9 \pm 0.7	35.7 \pm 0.1	21.7 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	25662 \pm 4456	3137 \pm 159
Recovery	Ambient	8.0 \pm 0.1	2250 \pm 14	106.2 \pm 4.6	35.4 \pm 0.4	21.0 \pm 0.2	4.2 \pm 0.8	2.7 \pm 0.5	451 \pm 109	2005 \pm 5

To conclude, we demonstrated that tipping point constitutes a point of no return for the fitness of juvenile Pacific oysters exposed to ocean acidification. Indeed, growth stunting induced by short-term exposure to pH below 7.1 is irreversible. This may have strong economic and ecological consequences by delaying the age at which the organisms reach market size and size refuge from predation. We believe that the coupling of tipping point and recovery approaches should be generalized to determine whether there are points of no return for the fitness of species facing global changes. More broadly, this experimental framework must further integrate intra-specific variation, life-stages, generations, and other stressors, to increase its prediction capacity of species sensitivity.

Supplementary information

Table S1

Table S1. Recovery of oysters in total body weight as a function of pH (factor) for each date of measurement (group). The retained model is specified for each set of variables (total body weight, slopes) and factor (pH, time) and each date of measurement. Important parameters of the different models are shown: tipping point and its 95% confidence interval, R², left slope (factor < tipping point) and right slope (factor > tipping point) and level of significance of Student’s t test (P < 0.001 ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·). The tipping point is the pH value where the dependent variable tips. In the case of basic linear model, “left” slope represents the unique slope of the model. Abbreviations: piecewise = piecewise linear regression, conf. interval = 95% confidence interval

Variable	Factor	Group (time, d)	Model	Tipping Point			R ²	Slope 1		Slope 2		
				conf. interval		t test		t test				
				upper	lower							
Total body weight (g)	pH _T	-14	piecewise	7.10	7.50	6.70	0.76	0.271	**	0.022	n.s.	
		-10	piecewise	7.10	7.40	6.80	0.88	0.450	***	0.070	n.s.	
		-6	piecewise	7.10	7.33	6.87	0.93	0.802	***	0.110	n.s.	
		0	piecewise	7.11	7.34	6.90	0.95	1.234	***	0.289	n.s.	
		4	piecewise	7.15	7.34	6.95	0.93	1.680	***	0.051	n.s.	
		7	piecewise	7.13	7.30	6.96	0.95	1.990	***	0.092	n.s.	
		9	piecewise	7.13	7.31	6.96	0.94	2.040	***	0.068	n.s.	
		11	piecewise	7.14	7.28	7.01	0.95	2.350	***	-0.239	n.s.	
		14	piecewise	7.14	7.27	7.01	0.95	2.530	***	-0.207	n.s.	
		18	piecewise	7.13	7.26	7.00	0.95	2.960	***	-0.213	n.s.	
		22	piecewise	7.12	7.25	6.99	0.96	3.480	***	-0.169	n.s.	
		28	piecewise	7.14	7.27	7.00	0.96	3.930	***	-0.140	n.s.	
		36	piecewise	7.10	7.25	6.95	0.95	4.880	***	0.124	n.s.	
42	piecewise	7.08	7.25	6.91	0.94	5.390	***	0.380	n.s.			
Weight difference (g.pH _T ⁻¹)	Left slope	Time (d)	n.a.	linear	n.a.	n.a.	n.a.	0.99	0.087	***	n.a.	n.a.
	Right slope		n.a.	none	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Table S2

Table S2. Recovery capacity of oysters in total body weight as a function of time (factor) for each pH of exposure (group). The retained model is specified for each set of variables (total body weight, slopes) and factor (time, pH) and each pH condition. Important parameters of the different models are shown: tipping point and its 95% confidence interval, R², left slope (factor < tipping point) and right slope (factor > tipping point) and level of significance of Student's t test (P < 0.001 ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·). The tipping point is the pH value where the dependent variable tips. In the case of basic linear model, "left" slope represents the unique slope of the model. Abbreviations: piecewise = piecewise linear regression, conf. interval = 95% confidence interval

Variable	Factor	Group (pH _T)	Model	Tipping Point			R ²	Slope 1		Slope 2	
				conf. interval				t test	t test		
				upper	lower						
Total body weight (g)	Time (d)	6.4	piecewise	15.1	15.9	14.3	1.00	-0.003	**	0.053	***
		6.5	piecewise	13.1	14.5	11.6	1.00	0.000	n.s.	0.061	***
		6.6	piecewise	14.9	16.5	13.3	1.00	0.009	**	0.084	***
		6.7	piecewise	14.8	16.2	13.4	1.00	0.021	***	0.089	***
		6.9	piecewise	14.6	16.0	13.2	1.00	0.029	***	0.091	***
		6.9	piecewise	12.5	13.7	11.2	1.00	0.023	***	0.095	***
		7.0	piecewise	15.2	16.7	13.8	1.00	0.040	***	0.133	***
		7.1	piecewise	13.1	15.7	10.5	1.00	0.056	***	0.117	***
		7.2	piecewise	15.1	16.3	13.9	1.00	0.050	***	0.122	***
		7.3	piecewise	13.4	15.5	11.3	1.00	0.055	***	0.117	***
		7.4	piecewise	12.2	14.0	10.4	1.00	0.052	***	0.126	***
		7.5	piecewise	15.5	17.4	13.5	1.00	0.056	***	0.119	***
		7.6	piecewise	15.1	17.0	13.2	1.00	0.052	***	0.123	***
		7.7	piecewise	16.4	17.6	15.1	1.00	0.058	***	0.148	***
7.8	piecewise	15.9	17.6	14.3	1.00	0.041	***	0.129	***		

CHAPITRE 3

Normes de réaction de l'huître
perlière *Pinctada margaritifera* au
pH

Identify new mechanisms involved in the response of calcifiers to ocean acidification through the holistic determination of tipping points in the pearl oyster

Mathieu Lutier^{1,*}, Fabrice Pernet¹, Amélie Briandy², Jacqueline Le Grand¹, Corinne Belliard², Claudie Quéré¹, Valérian Le Roy¹, Vincent Vanaa², Carole Di Poi¹, Jérémy Le Luyer^{2,*}

¹ LEMAR UMR6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, ZI pointe du diable, CS 10070, F-29280 Plouzané, France.

² EIO UMR24, UPF/IRD/ILM/Ifremer, Labex CORAIL, Unité RMPF, Centre Océanologique du Pacifique, Vairao – BP 49 Vairao, Tahiti, Polynésie française.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.L. (email: mathieu.lutier@gmail.com) or to J.L.L. (email: Jeremy.Le.Luyer@ifremer.fr)

In preparation

Abstract

Ocean acidification is one of the most productive research field. Despite this enthusiasm, the methodologies to explore the comprehensive overviews of organisms responses have changed little. Consequently, little advances have been made on the comprehension of fine mechanisms and cellular pathways involved in calcifier response to ocean acidification. More importantly, some key data, such as the tolerance threshold of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* to acidification, remain unknown despite its importance for the future of the pearl farming industry. Here, we use a promising new framework to analyze the broad macrophysiological and molecular response of juveniles *P. margaritifera* over a wide pH range. We identify low tipping points for physiological traits at pH 7.3-6.9 that coincide with a major reshuffling in membrane lipid and transcriptome. In contrast, periostracum delamination was detected above tipping point with potential impact on shell integrity over the long term. The combination of transcriptomic, lipidomic and calcification reaction norms allow us to identify mechanisms involved in the maintenance of calcification that were previously overlooked in OA research fields: vacuole-assisted biomineralization, membrane fatty acids reshuffling and protein ubiquitination. We believe that the combination of macrophysiological and molecular reaction norms can now be widely applied to environmental research field and would provide a new perspective on the potential of species to survive in a changing world.

Keywords

Biomineralization, Global change, Lipidomic, Ocean acidification, Oyster, Pinctada margaritifera, Reaction norm, Tipping point, Threshold, Transcriptomic

Introduction

Since the pre-industrial era, ocean uptake of carbon dioxide (CO₂) has absorbed about one-third of the atmospheric emissions caused by anthropogenic activities. This trend is leading to a reduction of pH and carbonate availability, a phenomenon known as ocean acidification (OA) (Caldeira & Wickett, 2003; Orr et al., 2005). OA represents a major challenge for marine calcifiers that suffer from internal acidosis altering their metabolism and fitness-related physiological function, while favoring the dissolution of their calcium-carbonate (CaCO₃) exoskeletons (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2013; Parker et al., 2013; Tresguerres & Hamilton, 2017 for reviews).

OA has been one of the most productive research field over the past two decades with up to 800 articles published per year (Browman, 2017). Amongst these researches, the phenotypic plasticity, i.e. all the phenotypes that the same genotype can express in response to environmental changes, was by far the most studied process. Indeed, it represents the first defense of organisms against rapid environmental changes, in particular for many sessile calcifiers, e.g. invertebrates, corals, which cannot migrate to more favorable environments during their lifetime (Boyd et al., 2016; Gienapp & Merilä, 2018). The wide majority of OA experiments generally focus on a few phenotypical traits in organisms exposed to a limited number of experimental conditions, i.e. two or three, based on acidification scenario modelled for open ocean waters. These scenario are often limited in representing environmental changes for mollusk species thriving in coastal areas, as ambient pH conditions remain largely unknown at the local scale (Hofmann et al., 2011; Vargas et al., 2017). Moreover, this method provides a limited view of the phenotypic plasticity (Chevin et al., 2010; Chevin & Lande, 2013) and, therefore, thresholds and critical endpoints remain widely unknown in the physiological

response of organisms to OA, even for the most studied species (Bednaršek et al., 2019, 2021; Ducker & Falkenberg, 2020).

The absence of appropriate methodology makes also difficult the identification of cellular regulatory process that allow the maintenance of calcifier's physiology under OA. For instance, although it is one of the most studied process in marine calcifiers, many mechanisms explaining the regulation of biomineralization, ensuring the formation and integrity of shell, remain little known (Yarra et al., 2021). Transcriptomic is a commonly used tools to study cellular pathways involved in response to OA as it can explore a wide range of functions (e.g. acid/base regulation, metabolism, biomineralization and stress response) (Strader et al., 2020). However, studies often focused on a few specific genes, with the assumptions that genes function is conserved across taxa, limiting the opportunities of discovering new regulatory pathways. In other cases, transcriptomic, proteomic or other -omic quantification are used but the results are not associated with macro-physiological observations (e.g. survival, physiological rates) limiting the understanding of mechanisms regulating phenotypic plasticity (Murren et al., 2015; Sommer, 2020). This therefore requires the development of new holistic approach associating the study of -omics together with macro-physiological changes to revisit our perception of calcifiers response to OA (Rajan et al., 2021).

In recent years, a handful of studies showed that the determination of reaction norms, i.e. characterization of phenotypic plasticity over a wide environmental range, represent a successful alternative to assess the vulnerability of species to OA (Comeau et al., 2013; Dorey et al., 2013; H.-G. Lee et al., 2019; Lutier et al., 2022; Ventura et al., 2016). It allow the identification of tipping points beyond which the phenotypic plasticity become not sufficient to buffer the effects of environmental changes inducing alteration of individual fitness (Botero et al., 2015; Monaco & Helmuth, 2011). Tipping point has the advantage to be a single value

capturing the sensibility of a whole species (or population), whatever the habitat, to an environmental stressor, that can be easily communicated to society and end-user (Bednaršek et al., 2019, 2021; Monaco & Helmuth, 2011).

In a previous study, we proposed a framework establishing reaction norms at the -omics and macro-physiological scale. This opened up new perspectives for the identification of mechanisms involved in the organisms response to OA that were previously unappreciated (Lutier et al., 2022). Amongst important mechanisms, we identified major reshuffling in membrane lipids and major tip in the transcription of hundreds of genes that occurred when calcifier physiology shift towards metabolic depression and intensive dissolution of CaCO_3 -structures. This reshuffling could have been related to acid-base, biomineralization and/or metabolic regulation, three processes that are tightly interconnected (Lutier et al., 2022). For instance, membranes, and particularly their lipid composition, determine exchanges between the highly-controlled intracellular medium and the extracellular medium that is submitted to environmental variations (Hazel & Williams, 1990; Hochachka & Somero, 2002; Hulbert & Else, 1999) and could therefore be involved in regulation of calcification and acid/base homeostasis (Lutier et al., 2022). However, determining the role of membrane lipid reshuffling and global tipping in gene expression requires further investigations.

Here we applied the framework developed in Lutier et al. (2022) to juveniles of the black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in order to determine reaction norms over a wide range of pHs for macro-physiological traits, membrane lipids and gene expression. The vulnerability of this economic important species to OA is of crucial importance for the fate of pearl farming on which entire regions, such as French Polynesia, depend (IEOM, 2018; Pickering et al., 2011). Yet pearl oysters of the *Pinctada* genus are considered to be very sensitive to pH variations (S. Li et al., 2017b; S. Li, Huang, et al., 2016; S. Li, Liu, et al., 2016;

Liu et al., 2017) as they are adapted to live in stable habitats subjected to little seasonal and daily variations (Gervis & Sims, 1992; Yukihiro et al., 1999). Although biomineralization in pearl oysters is affected by OA, tolerance threshold have never been determined (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016).

We also provided an in-depth investigation of the transcriptomic regulation of calcification process and the specific role of membrane lipid reshuffling in response to OA. We analyzed gene expression of oysters as a function of calcification rates and we determined reaction norms for the periostracum integrity and carbonic anhydrase activity, two key parameters involved in the maintenance of shell integrity and biomineralization (Byrne & Fitzer, 2019; Clark, 2020; Peck et al., 2016). The association of these parameters provided new perspectives about the mechanisms involved in the response of marine calcifiers to OA.

Material and methods

Animals and maintenance

Juvenile oysters were produced in 10/03/2019 at Regahiga Hatchery facilities located at Gambier archipelago (French Polynesia) and transferred two days after fertilization to Ifremer facilities in Vairao (Tahiti, French Polynesia) for the larval rearing. Oysters were grown in two 15L flow-through tanks. The oysters were fed continuously on a mixed diet of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros minus* (1:1 in dry weight). Food concentration was maintained at $1500 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$ of phytoplankton cells at the outlet of the tank – *ad libitum* (Rico-Villa et al., 2009) – and controlled twice daily using an electronic particle counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, USA) equipped with a $100 \mu\text{m}$ aperture tube. During the experiment, oysters were continuously supplied with natural seawater originating from Vairao Lagoon, filtered at $1 \mu\text{m}$. On March 18th 2020, oysters were transferred to Vairao lagoon and raised in 5mm mesh baskets

under natural conditions. On May 13th 2020, oysters were returned to the Ifremer facility. On the eve of the experiment, oysters were 7 months-old (average size and weight of 22 ± 8 mm and 0.9 ± 1.0 g respectively) and divided into 15 batches containing 201 ± 4 individuals (mean batch weight of 145.7 ± 7.4 g).

Experimental design

The experimental design and rearing system were similar to that described in Lutier et al. (2022). Each batch of oysters was exposed to one constant nominal pH condition ranging from pH 8.0 to 6.6 with a step of 0.1 between two levels. The upper pH condition (pH ~ 8.0) was obtained by running seawater with oysters without pH regulation. The experimental system consisted of 15 experimental units that were randomly assigned to one pH condition. Each experimental unit consisted of a header tank in which seawater was acidified (except for the ambient pH) and then delivered by a pump to a holding tank containing the oysters. These tanks were 27 L and their entire volume was renewed every 60 min. pH was regulated by means of pure-CO₂ bubbling, controlled by an IKS computer (Aquastar[®]). The pH-regulator was connected to pH-probes installed in each header tank (pH II Modul, Aquastar[®]), checked at the start of the experiment using Certipur[®] Merck NBS buffers (pH = 4.00, pH = 7.00). pH electrodes from the pH-regulator were inter-calibrated twice daily against a pH probe (Sentix[®] 940-3 WT) connected to a Multiline[®] Multi 3630 IDS-WTW. The pH-probe was checked once a week using Certipur[®] Merck NBS buffers (pH = 4.00, 7.00, and 9.00) and calibrated twice a week on the total scale with a certified Tris/HCl buffer (salinity 35; provided by A. Dickson, Scripps University, USA). Throughout the text, pH levels are therefore expressed on the total scale (pH_T). In each experimental tank, air bubbling and a small homogenization pump (3 W) ensured an efficient mixing of seawater surrounding the oysters. Photoperiod and temperature were not controlled and corresponded to natural conditions encountered during May and June

months in Vairao lagoon. However, iBcode22L sensors were randomly placed in four experimental tanks and recorded temperature every hour. During the entire experimental period, oysters were fed *ad libitum* as described above.

On May 13th 2020, each batch of oyster was randomly assigned to one tank and was held at ambient pH for 6 days. Then, pH was progressively decreased in each pH-regulated tank at a rate of 0.2 unit d⁻¹. The decrease in pH lasted for 7 days for the lowest pH condition. Experimental pH conditions were all reached on May 26th 2020 and oysters were maintained at these experimental pH levels for 16 days until they exhibit visible signs of altered physiological state and survival in the most extreme conditions (periostracum delamination, no byssus, mass mortality).

Seawater carbonate chemistry

In each oyster tank, temperature, salinity, dissolved oxygen (O₂) saturation levels and pH were measured twice a day using a Multiline[®] Multi 3630 IDS-WTW (pH probe Sentix[®] 940-3 WTW, O₂ probe FDO[®] 925 WTW, salinity probe TetraCon[®] 925 WTW). Seawater samples were collected weekly, filtered on 0.7 µm (GF/F, Whatman[®]) and poisoned with 0.05% mercury (II) chloride. Total alkalinity (TA) was then measured in triplicate 50 mL subsamples by potentiometric titration at 22 °C, using a Titrando 888 (Metrohm[®]) titrator coupled to a glass electrode (ecotrode plus, Metrohm[®]) and a thermometer (pt1000, Metrohm[®]). TA was calculated following the protocol described in Dickson et al. (2007). At the time of sampling, pH, salinity and temperature were measured, and then used together with TA value to determine carbonate chemistry parameters using the package seacarb v 3.2.16. of the R software.

Biometry, counting & shell analysis

The total fresh weight (shell + tissue) of each batch of oysters was measured twice weekly and interpolated between measurements to estimate daily weight. In addition, oysters were counted and the dead were removed allowing to calculate the cumulative survival rate at the end of the experiment (16 d). After an active washing step using a garden hose, the number of oysters adhering to substrate or to other individuals (percentage of oysters with byssus) was determined at day 16. Biometrics were performed at the onset (0 d) and the end of the experiment (16 d) and no growth for body weight and shell length nor changes for flesh dry weight and shell weight were detected.

Shell thickness was measured on the left valve of five individuals collected per pH condition at the end of the experiment. Shells were dried for 24 h at 45 °C, embedded in polyester resin and cross-sectioned from umbo to opposite shell margin along the longitudinal growth axis using a precision saw (Secotom-10 Struers). Sections were glued on a microscope slide and polished with silicon carbide abrasive disks (1200 and 2500 grains cm⁻²). Images of the section were captured under a Lumar V12 stereoscope (Zeiss) at 30x magnification, and the entire section was reconstructed using an image acquisition software (AxioVision SE 64 – v4.9.1, Zeiss). The shell thickness was measured at different points of the longitudinal section using ImageJ software (Schneider et al., 2012). These points were located at 1/4, 3/8, 1/2 and 3/4 of the total length of the shell section starting from the umbo. The points at 1/4 and 3/8 were chosen in order to target the most vulnerable spot of the shell that was supposed to be located on the first part of the shell, close to the umbo (Lutier et al., 2022). In opposition, the points at 1/2 and 3/4 were measured for comparison as they are closer to the shell margin that is supposed to be more resilient to ocean acidification in bivalves (Bressan et al., 2014). Two different

parameters were measured: (1) the thickness of the mineral part of the shell (CaCO₃) and (2) the thickness of the periostracum, the organic coat covering the shell (see Figure S1).

Additionally, at the end of the experiment, pictures of the external side of shell right valve were taken on ten individuals per pH condition using a Canon® PowerShot G9 camera under constant white light (Figure 1). These images were then processed using ImageJ software in order to determine the surface of the periostracum coverage on the external side of the shell in opposition with the area where it was delaminated. It was expressed as a ratio between the total surface of the shell and the surface of the area that was covered by the periostracum.

Physiological rates

Seawater was sampled twice a day at the inlet and outlet of each oyster tank and phytoplankton cell concentrations were measured using an electronic particle counter (see previous section). No pseudofaeces production was detected throughout the experiment. Ingestion rate was determined as:

$$I = \frac{\Delta_{\text{phyto}} \times \text{flow rate}}{W},$$

where I is the ingestion rate expressed as cm³ min⁻¹ g⁻¹, Δ_{phyto} is difference in phytoplankton concentrations between the inlet and the outlet of the oyster tanks (cm³ min⁻¹), *flow rate* is the water flow at the inlet of the oyster tanks (mL min⁻¹), and W is the daily weight (total fresh weight) of oyster batch (g).

Net calcification rate was measured after 15 d of exposure. Food supply was stopped 15 h before the assay and tanks were emptied, cleaned and refilled. Again, 1 h before the assay, the tanks were emptied, cleaned and refilled. At the onset of the incubation, water flow and air bubbling were stopped. Gentle mixing of the seawater was maintained by homogenization pump but air bubbling was stopped. Incubations lasted for 90 min. This duration allowed to

keep the pH close to the setpoint (< 0.1 pH unit variation) despite oyster respiration. At the onset and at the end of the incubation period, temperature, salinity, pH and O₂ saturation were measured (see Table S1), and seawater samples were filtered and poisoned for TA analyses (see above) or were immediately frozen at -20 °C for ammonium (NH₄⁺) measurements (Aminot & K  rouel, 2007). Net calcification rate was determined following a modified procedure from Gazeau et al. (2015) using the alkalinity anomaly technique (Smith & Key, 1975):

$$NC = \frac{(\Delta_{TA} \times \rho - \Delta_{NH_4^+}) \times V}{2 \times t \times W},$$

where *NC* is the net calcification rate expressed as $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, Δ_{TA} and $\Delta_{NH_4^+}$ are differences in TA ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) and NH₄⁺ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) between the onset and the end of the incubation period, ρ is seawater density (kg L^{-1}) calculated based on temperature and salinity recorded during the incubation, *V* is the volume of the tanks (L), *t* is the duration of the incubations (h), *W* is the daily weight (total fresh weight) of oyster batch (g). Additional incubations were performed on empty tanks after the end of the experiment and allowed to verify that there was no change in seawater parameters caused by evaporation or potential biological processes in the water itself (data not shown).

Biochemistry

Soft-tissues of five individuals from each pH condition were collected at 16 d and stored at -80 °C pending analyses. Tissues were then pooled and grounded in liquid nitrogen with a ball mill. Oyster powder was diluted with chloroform/methanol (2:1, v/v) for the determination of neutral lipids (triacylglycerol: TAG, and sterols: ST) using high performance thin layer chromatography. TAG-ST ratio was used as a proxy of the relative contribution of lipid reserve to structure (membrane). Polar lipids were purified on silica gel micro column, transesterified using methanolic H₂SO₄ at 100 °C, and the resulting fatty acid methyl esters (FAME) were

analyzed using a gas-chromatography flame ionization detection system equipped with a DB-Wax capillary column. Peaks were analyzed by comparison with external standards. Each fatty acid was expressed as the peak area percentage of total polar fatty acids. Carbohydrate content ($\mu\text{g mg}^{-1}$) was determined according to the colorimetric method described in DuBois et al. (1956).

Proteins were extracted on ice using lysis buffer containing 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 detergent (Biorad[®]), 0.5% CA-630 (Igepal, Sigma-Aldrich[®]), 10mM Tris HCl buffer (pH 7.4) and 1 tablet of EDTA-free protease inhibitor cocktail (cOmplete[®]) per 25mL buffer. Samples were grounded and homogenized with Ultra-Turrax[®], incubated 40min on ice and then centrifuged for 1h at 4000rpm and 4°C. The intermediate phase was then sampled and aliquoted for analysis of protein content and carbonic anhydrase activity. Aliquots were stored at -80°C pending analysis. The total protein content was determined according to the colorimetric method described in Lowry et al. (1951). Carbonic anhydrase activity was determined using the “pH method” (Vitale et al., 1999). For the analysis, 125 μL of protein sample were added to 1.875mL of lysis buffer and 250 μL of CO₂-saturated water. The pH decreasing rate was recorded over 1 minute and modeled against time using linear regression model. The slope of the model represented the reaction rate. The non-catalyzed reaction rate was determined using a protein sample that was previously boiled in order to denature proteins (blank). The assays were conducted on triplicate subsamples for both sample and blanks. Carbonic anhydrase activity was then determined using the formulae:

$$CA = \frac{\frac{\text{Slope}}{\text{Slope}_{BLANK}} - 1}{\text{protein weight}}$$

where CA is the activity of carbonic anhydrase expressed as unit mg proteins^{-1} , $Slope$ is the slope of the linear regression of pH with time for the sample, $\overline{\text{Slope}_{BLANK}}$ is the average slope

of the linear regression of pH with time for the blank ($n = 3$) and the total protein weight is expressed in mg.

Transcriptomics

Soft-tissues of five individuals from each tank were collected at 16 d ($n = 75$) and individually stored in RNAlater (Invitrogen®). Total RNA was extracted from *P. margaritifera* by lacerating the tissues with a scalpel and rinsing with 1X PBS. Cellular lysis was induced with 1.5 mL of TRIzol (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA from each individual was subjected to a DNase treatment using Qiagen's RNA cleanup kit (USA). Total RNA was quantified using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo-Fisher, USA), and RNA quality was further evaluated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). High-quality RNA was sent to McGill University's "Genome Quebec Innovation Center" (Montréal, QC, Canada) for Nextera XT (Illumina, USA) library preparation and sequencing on a NovaSeq6000 Illumina S4 100-bp paired-end platform.

Raw reads were first filtered using Trimmomatic v.0.36 for a minimum length (60 bp), a minimum quality (trailing = 20, leading = 20) and the presence of potential contaminants and remaining adaptors (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec>; v08/17/20). Reads quality was monitored before and after the trimming step with FastQC v.0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Filtered reads were mapped against the *P. margaritifera* reference genome (Le Luyer et al., 2019) using GSNAP v2020-06-30 keeping default parameters but allowing a minimum mismatch value of 2 and a minimum read coverage of 90%. Finally, the gene expression levels were assessed using HTSEQ v0. 6.1. The DESeq2 v1.30.0 R package was used to process the expression with a first step of normalization using the variance-stabilizing transformation implemented in the 'vst' function. The vst matrix was used to build a signed weighted co-expression network analysis

implemented in the WGCNA v1.69 R package. First, genes with low overall variance ($< 5\%$) were removed for the analysis as recommended (Langfelder & Horvath, 2008). We fixed the “soft” threshold powers of 13 the scale-free topology criterion to reach a model fit ($|R|$) of 0.90. Clusters were defined using the “*cutreeDynamic*” function (minimum of 50 genes by cluster and default cutting height of 0.99) based on the topological overlap matrix, and an automatic merging step with the threshold fixed at 0.25 (default) allowed merging correlated clusters. For each cluster, we defined the cluster membership (kME; Eigengene-based connectivity) and only clusters showing significant correlation ($p < 0.01$) to pH or calcification rate were kept for downstream functional analysis.

Statistical analysis

The general statistical procedure was previously described in Lutier et al. (2022). All statistical analyses were performed using the R software v4.1.1 and the threshold of statistical significance was fixed at 0.05 unless specifically stated. Relationships between dependent variables and average pH recorded during the exposure period (during the incubation for net calcification rate) were computed using regression models. Dependent variables were survival, percentage of oyster with byssus, physiological rates (ingestion, net calcification), biometrics (shell thickness, periostracum thickness and periostracum coverage), biochemistry (membrane fatty acids, carbohydrates, carbonic anhydrase activity) and gene expression. Each gene included in the WGCNA clusters were individually modeled against pH but also against net calcification rate in order to detect specific mechanisms related to biomineralization processes. Fatty acids were summarized using principal component analysis and separated into two groups according to their correlation with first principal component (positive or negative). Each group was then summed and tested against pH. Piecewise, linear and log-linear regression models were tested and compared for each individual variable (or set of variables). In each case, the

model that had the highest R^2 , the lowest Akaike and Bayesian information criteria (AIC, BIC) and the lowest residual sum of squares was selected. For each piecewise regression model, we estimated the tipping point, defined as the values of the pH where the dependent variables tip, by implementing the bootstrap restarting algorithm (Wood, 2001). For physiological rates, we also determined the critical-point defined as the pH at which the dependent variable was equal to zero. Normality of residual distribution was tested using Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances was graphically checked. Significance of each slope was tested according to Student's t test. Piecewise regression models were built using the segmented v1.3-4 R package.

For transcriptomic analysis, only genes significantly correlated (Pearson's correlation; $p < 0.05$) to pH or to calcification rate were tested among the retained clusters. The frequency distribution of tipping-point values was plotted for each cluster of genes for pH and calcification rate. Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies $> 5\%$, were grouped together and used for gene ontology (GO) enrichment analysis using GOA-tools v0.7.11, implemented in the Github repository '*go_enrichment*' (https://github.com/enormandea/go_enrichment) and the go-basic.obo database (release 2019-03-19) with Fisher's exact tests. Only significant GO terms that included a minimum of three genes and with Bonferroni adjusted $p < 0.05$ were kept. The GO terms that were significantly enriched were thus checked for redundancy using semantic-based clustering in REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>).

In addition, in complementary with previous studies, we specifically identified a list of genes correlated to pH or calcification rate that were commonly reported in literature to be involved in regulation of acid/base homeostasis, biomineralization, maintenance of pearl quality and shell organic matrix and periostracum synthesis in marine bivalves species.

Results

Acclimation of oysters to 15 pH conditions

During the experiment, pH levels in the oyster tanks were stable and reached the targeted values, except for one pH condition that was 6.6 ± 0.2 instead of 6.7 (Table S2). Temperature was similar across pH conditions and iBcode22L sensors reported mean temperature of 27.9 ± 0.6 °C with average daily variation of 0.9 ± 0.7 °C. Salinity and oxygen saturation state were stable and similar across pH conditions. The effect of ocean acidification was not visible on shell size (shell increment was low compared to initial shell length), but shell pigmentation apparently slightly bleached for low pH conditions (Figure 1).

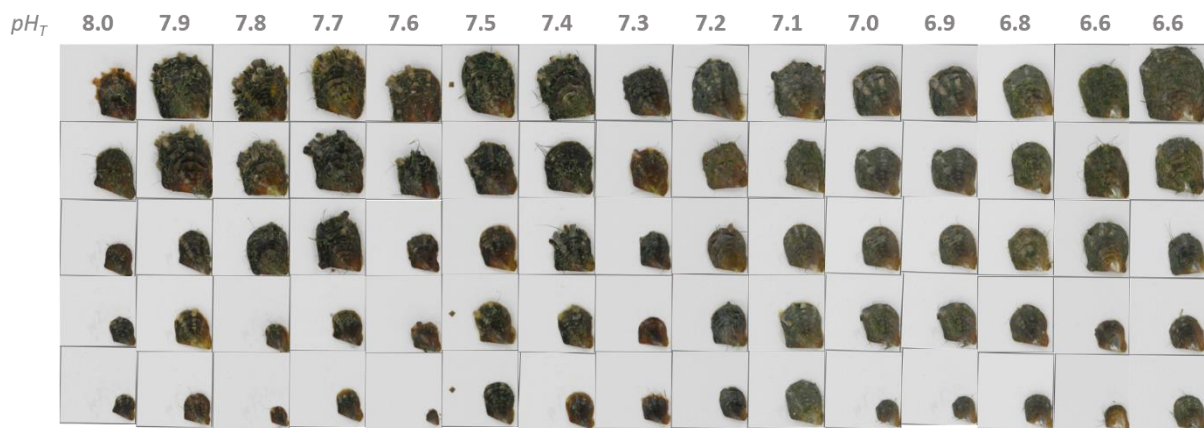


Figure 1. Oysters exposed to 15 pH conditions for 16 d. Five oysters were selected from each condition, and sorted from the smallest to the biggest. Corresponding pH (total scale) are shown. Each square has a dimension of 1x1 cm.

Pearl oyster's physiology tips at low pH values between 7.2-6.9

We first modeled the effect of pH on macro-physiological parameters that are adhesion to substrate (byssus), survival, food ingestion and net calcification rate. In addition, we also modeled the carbohydrate content and carbonic anhydrase activity as a function of pH. We

identified an overall tipping point at pH ~7.2-6.9 below which all these parameters decreased with decreasing pH (Figure 2A-F) although marginally for survival ($p = 0.053$; Figure B) and not significantly for food ingestion ($p = 0.171$; Figure C) and carbohydrate content ($p = 0.113$; Figure E). Moreover, net calcification rate exhibited a critical point at pH 7.0 below which it became negative and turned to net dissolution (Figure 2D).

We also analyzed the effects of pH on periostracum integrity. We measured the coverage and the thickness of the periostracum at four points distant from the umbo. Coverage and thickness decreased with decreasing pH below tipping points at pH 6.9-7.0 (Figure 2G-H, Figure S2) except near the umbo where the tipping point for thickness is much more higher, at pH 7.7 (Figure 2I). Thus, the alteration of periostracum integrity begins at high pH values and then propagate from the umbo towards the shell margin.

Finally, we found no effect of pH on growth (in weight and length) or other biometric parameters (such as dry weight, shell weight, and thickness of the mineral part of the shell), likely reflecting that the pH exposure was too short (16 days) to allow a significant gain or decrease from the initial state.

Membrane lipids are remodeled around pH 7.3

We also determine the reaction norm of the fatty acid composition of membrane lipids that plays an important role in exchanges between intracellular and extracellular compartments. Principal component analysis of all fatty acids showed that the first axis (PC1) alone explained 35% of the total variance in relation to pH (Figure 3A). The set of fatty acids was reduced to

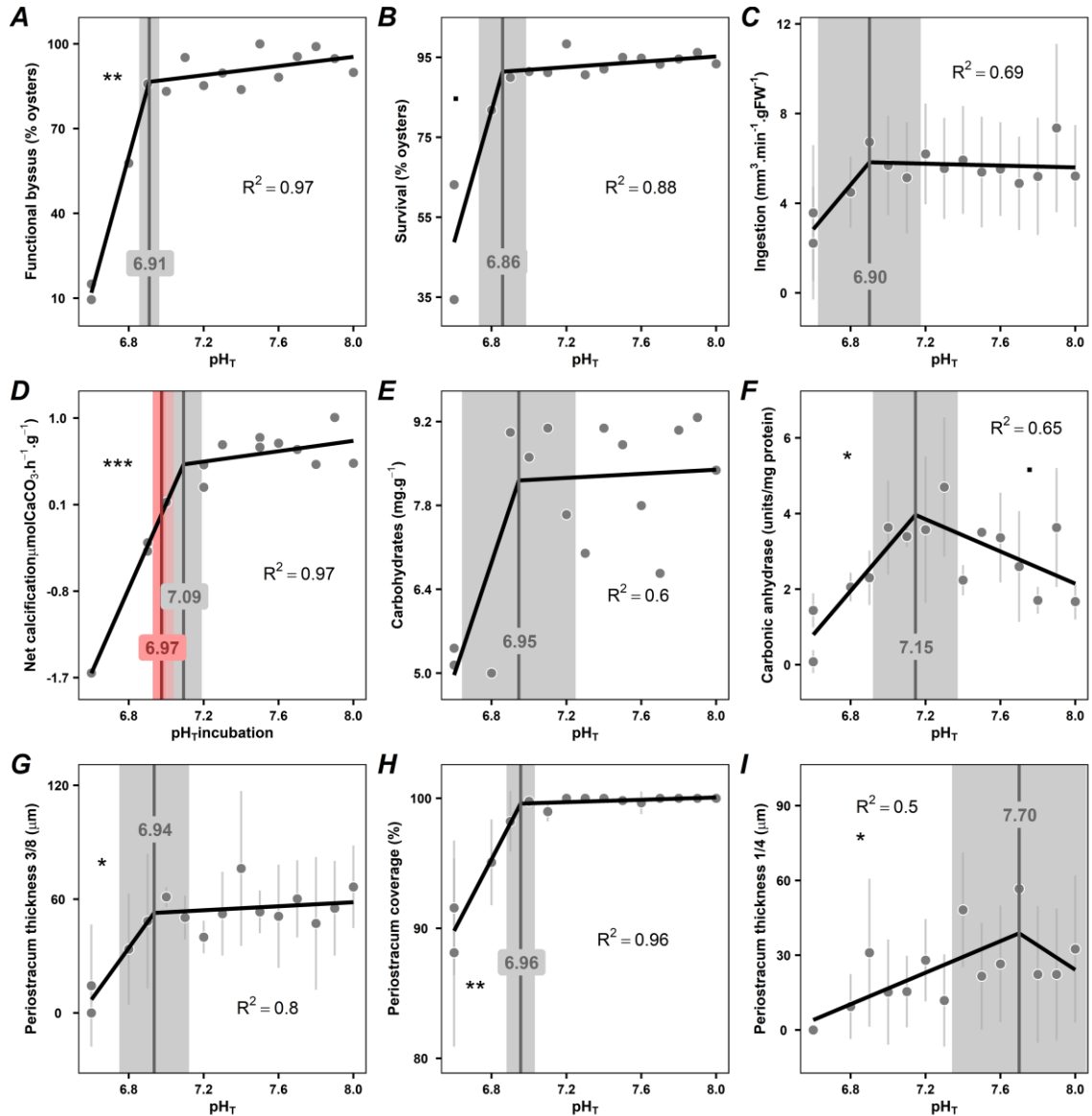


Figure 2. Reaction norms of main physiological and shell parameters of oysters as a function of pH (total scale). (A) percentage of oysters adhering to substrate with byssus, (B) survival, (C) ingestion rate, (D) net calcification rate, (E) carbohydrate content, (F) carbonic anhydrase activity, (G) periostracum thickness at point 3/8, (H) periostracum coverage and (I) periostracum thickness at point 1/4. Data are means ± SD when available. Tipping points and critical points and their 95% confidence intervals are shown in grey and red, respectively. The significance levels of the slopes are presented using symbols (p < 0.001 ***, p < 0.01 **, p < 0.05 *, p < 0.1 •).

two groups defined by the sums of fatty acids that correlated with PC1 either positively or negatively, and each term was plotted against pH (Figure 3B-C). Positively correlated fatty

acids mainly consisted of heneicosapentanoate (HPA, 21:5n-3), oleic acid (18:0), arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), non-methylene interrupted fatty acids (22:2 NMI_{i,j}) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) contributing 14%, 5%, 3%, 3% and 3% respectively, to PC1 (Table S3). This group of fatty acids exhibited a tipping point at pH 7.3, below which their contribution to membrane increased markedly (Figure 3B) at the detriment of the fatty acids that were negatively correlated with PC1. These negatively correlated fatty acids consisted of palmitic acid (PA, 16:0), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and palmitoleic acid (16:1n-7), which contributed 46%, 10% and 8%, respectively, to PC1 (Figure 3C) (Table S3).

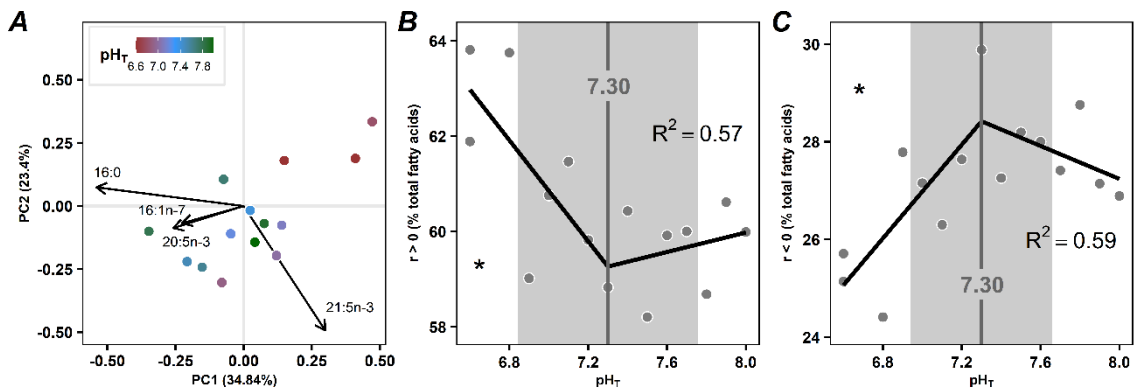


Figure 3. Membrane fatty acid composition of oysters as a function of pH (total scale). (A) Principal component analysis of polar fatty acid classes for oysters (n = 15 pools of five oysters) exposed to 15 pH levels. Arrows represent fatty acids contributing to more than 5% of the first principal component (PC1). Individuals are colored according to the average pH recorded during the exposure period. Contribution to membrane of the sum of fatty acids that are (B) positively or (C) negatively correlated to PC1 as a function of pH. Tipping points and their 95% confidence intervals are shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using symbols ($p < 0.001$ ***, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ *, $p < 0.1$ •).

Expression of most genes tips at low pH values between 7.1-6.8

To further assess the molecular regulation of phenotypic plasticity, we establish transcriptomic reactions norms of oysters to pH using RNA-seq. WGCNA analysis showed that a single cluster of genes was significantly correlated with pH (Table S4). We found that 171 genes showed linear (or loglinear) or piecewise regression with pH (Figure 4, Table S4). Among them, 62% showed tipping-points at pH 7.1-6.8 and the wide majority (99%) of them presented stable level of expression above tipping point that increased below (Figure 4).

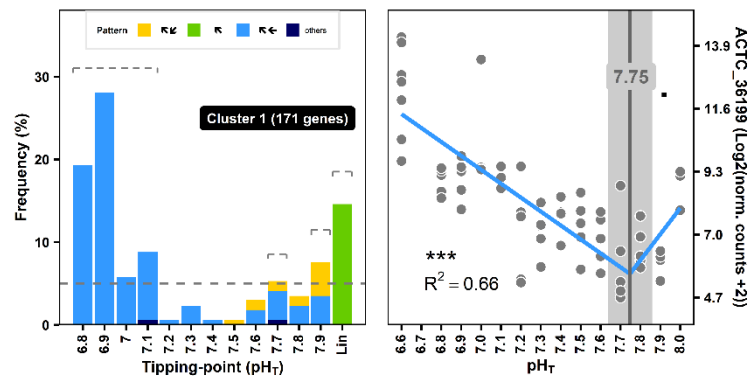


Figure 4. Tipping points of oyster transcriptome as a function of pH (total scale). Frequency distribution of tipping-point for piecewise linear relationships (left side). Linear and loglinear models (no tipping-point) are under “Lin” name. Genes are grouped into one cluster of genes that co-vary together. In the histogram, colors represent the pattern of variation of gene expression as a function of pH for the model (linear regression) or each part of the model (piecewise linear regression). The symbols which represent patterns of variation are: ↖: increase with decreasing pH, ↗: decrease with decreasing pH, ↔: stable with decreasing pH (p-value slope > 0.05). Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies > 5% (shown as a dotted line), were grouped together. The grey segments above the bars indicate the groups of genes on which GO analyses were conducted. ACTC, the gene that best represents the cluster according to module membership, gene significance for pH and R^2 is presented as a function of pH as an example (right side). Tipping points and its 95% confidence intervals is shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using stars (p < 0.001 ***, p < 0.01 **, p < 0.05 *, p < 0.1 •).

Based on a literature review, we identified 24 genes in the dataset that are commonly reported to be involved in regulation of acid/base homeostasis, biomineralization, maintenance of pearl quality, and shell organic matrix and periostracum synthesis. Among them, 52% exhibited tipping point at pH 7.1-6.8 below which their expression rate increased sharply while it remained stable above. Although this list is not exhaustive, we identified that the genes mainly belonged to gene families that are alpha 2 macroglobulin, ankyrin domain, collagen, epidermal growth factor and tyrosinase (Table 1). The expression rate of 2 ankyrin and 1 tyrosinase coding gene (TYRO2) increased in expression rate below tipping point at pH 6.9-7.0 (Table 1). Another tyrosinase coding gene increased early in expression rate (TYRO1) below tipping point at pH 7.9.

Expression of most genes tips with calcification rate

In order to study the regulation of biomineralization processes by transcriptional mechanisms, we modeled the gene expression of oyster as a function of their net calcification rate. Net calcification rate tipped at pH 7.1 corresponding to a value of $0.52 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, and decreased sharply below the tipping-point (Figure 2D). We therefore assumed that genes for which expression rate tipped at calcification rate around $0.5 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ may be related to regulation of biomineralization processes under OA.

WGCNA analysis showed that 4 clusters of genes correlated with net calcification (Table S4). We found that 1612 genes, distributed in four clusters, mainly in clusters 1 (n= 276; Figure 5A) and 2 (n=1065; Figure 5B), showed linear or piecewise regression with net calcification rate (Table S4; Figure S3). Most of them (64%) showed tipping-points at calcification rates around $0.5 \mu\text{molCaCO}_3.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (0.4-0.7) (Figure 5A-B, Figure S3) and are therefore likely related to the regulation of biomineralization process below tolerance threshold for pH.

Table 1. Tipping points of main genes related to regulation of acid/base homeostasis, biomineralization, and shell organic matrix and periostracum synthesis as a function of pH (total scale). Model characteristics and physiological function are reported for each gene. The slope inclination is displayed using arrows only if it is significant according to Student t tests ($p < 0.05$). Genes that possess multiple versions (isomorphs) are underlined. Abbreviations: TP: tipping point, CBP: calcium-binding proteins

Gene family	Tipping point	Gene name	Model parameters				WGCNA cluster
			model	slope 1	slope 2	R^2	
Alpha 2 macroglobulin (3 genes) ~ <i>organic matrix / pearl quality</i>	6.8	<u>CD109 antigen (CD109_12527)</u>	piecewise	↖	n.s.	0.39	1
	6.9	<u>CD109 antigen (CD109_17289)</u>		↖	n.s.	0.52	1
		<u>CD109 antigen (CD109_46067)</u>		↖	n.s.	0.40	1
		<u>Complement C3 (CO3_46151)</u>		↖	n.s.	0.20	1
	None	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8 (CPMD8_1063)	loglinear	↖	n.a.	0.28	1
		<u>CD109 antigen (CD109_60808)</u>		↖	n.a.	0.29	1
		<u>Complement C3 (CO3_25481)</u>		↖	n.a.	0.21	1
Ankyrin domain (2 genes) ~ <i>Ca²⁺ signaling pathway / CBP</i>	6.9	Ankyrin repeat domain-containing protein 28 (ANR28_56928)		↖	n.s.	0.43	1
		Ankyrin-1 (ANK1_24287)		↖	n.s.	0.36	1
Collagen (2 genes) ~ <i>organic matrix / pearl quality</i>	6.9	Collagen alpha-1(XII) chain (COCA1_23305)		↖	n.s.	0.40	1
		Collagen alpha-2(IV) chain (CO4A2_48640)		↖	n.s.	0.39	1
Epidermal growth factor (EGF domain) (2 genes) ~ <i>organic matrix / pearl quality</i>	6.9	EGF-like domain containing protein 2 (ELDP2)		↖	n.s.	0.20	1
	7.5	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6 (MEGF6_64575)		↖	↙	0.22	1
Tyrosinase (2 genes) ~ <i>periostracum / pearl quality</i>	7.0	<u>Tyrosinase-like protein 2 (TYRO2_48230)</u>		↖	n.s.	0.32	1
		<u>Tyrosinase-like protein 2 (TYRO2_52079)</u>		↖	n.s.	0.31	1
	7.9	<u>Tyrosinase-like protein 1 (TYRO1_17597)</u>		↖	n.s.	0.30	1
		<u>Tyrosinase-like protein 1 (TYRO1_64665)</u>		↖	n.s.	0.29	1

Most of the genes from cluster 1 exhibited linear regressions with calcification rate but were not enriched in GO terms. Expression of 21% of genes from cluster 1 increased below tipping point at $0.5-0.4 \mu\text{molCaCO}_3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Figure 5A). These genes were associated to GO terms “*cellular response to hypoxia*” and “*lactate metabolism*” (Table 2).

Expression of most genes (78%) from cluster 2 increased below tipping point at calcification rate $0.7-0.4 \mu\text{molCaCO}_3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Figure 5B). We found enrichment for 121 non-

redundant GO terms mainly related to ATP metabolism and acid / base homeostasis such as “*regulation of phosphorus metabolic process*”, “*proton exporting ATPase activity*”, “*regulation of phosphorylation*” and “*anion homeostasis*” (Table 2). Other enrichment in GO terms were associated to epigenetic regulation process, ubiquitin pathway associated with multivesicular body sorting pathway, regulation of cell death, metal ion binding, exocytosis / endocytosis transportation, lipid metabolism, cellular communication, autophagy, RNA metabolism and overall regulation of catabolism (Table 2).

We identified 129 genes in the dataset that are commonly reported in the scientific literature to be involved in regulation of acid/base homeostasis, biomineralization, maintenance of pearl quality, and shell organic matrix and periostracum synthesis. Among them, 59% exhibited tipping point at 0.4-0.7 $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Even if this list is not exhaustive, we identified that the genes mainly belonged to gene families that are vacuolar protein sorting-associated protein, ankyrin domain, ABC transporter, collagen, Vacuolar type proton ATPase (V-type ATPase), peroxidase, acetylcholine receptor subunit, carbonic anhydrase, monocarboxylate transporter and potassium channel (Table 3). Interestingly, most vacuolar protein sorting-associated protein, ankyrin, ABC transporter, V-type ATPase, monocarboxylate transporters, and potassium channel increased in expression rate below tipping point around 0.5 $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Table 3). Conversely, most genes coding for carbonic anhydrase decreased in expression rate below tipping point around 0.5 $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Table 3).

Importantly, our approach allow identifying that E3 ubiquitin transferase (16 genes) and the associated Kelch-like protein (11 genes) coding genes, that are involved in protein ubiquitination pathway, were the most represented in genes corelated with calcification rate (Table 4). The wide majority of them increased in expression rate below tipping point around

0.5 $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ and are therefore likely related to the regulation of biomineralization process below tolerance threshold for pH.

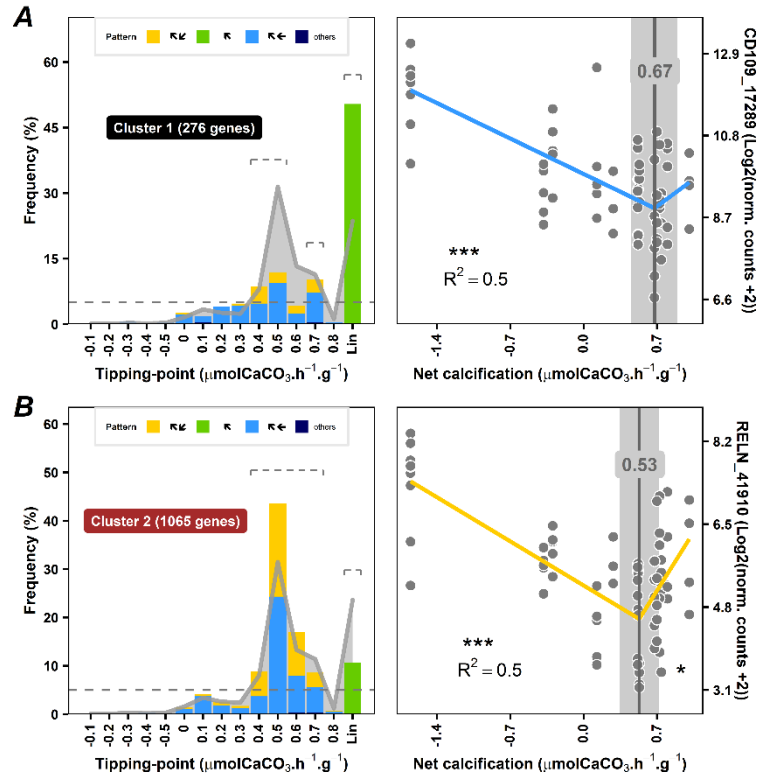


Figure 5. Tipping points of oyster transcriptome as a function of net calcification rate. Frequency distribution of tipping-point for piecewise linear relationships (left side). Linear models (no tipping-point) are under “Lin” name. Genes are grouped into 2 cluster of genes that co-vary together. (A-B) In the histogram, colors represent the pattern of variation of gene expression as a function of pH for the model (linear regression) or each part of the model (piecewise linear regression). The symbols which represent patterns of variation are: \blacktriangleright : increase with decreasing pH, \blacktriangleleft : decrease with decreasing pH, \leftarrow : stable with decreasing pH (p-value slope > 0.05). Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies > 5% (shown as a dotted line), were grouped together. The grey segments above the bars indicate the groups of genes on which GO analyses were conducted. For each cluster, the gene that best represents the cluster according to module membership, gene significance for calcification and R^2 is presented as a function of net calcification rate as an example (right side). Tipping points and their 95% confidence intervals are shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using stars (p < 0.001 ***, p < 0.01 **, p < 0.05 *, p < 0.1 •).

Table 2. Gene ontology term enrichment and tipping points as a function of pH and net calcification rate.

Model characteristics, physiological function and gene ontology for each cluster. For each GO term, the P-value of Bonferroni test is displayed using symbols ($p < 0.001$ ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·). Abbreviations: TP: tipping point

Factor	Cluster	Models			Physiological function	Gene Ontology					
		shape of the relationship	TP range	number of genes		GO	name	number of genes	p bonferroni		
pH _T	1	↖↖	6.8	-	109	regulation of keratinocyte differentiation	GO:0045616	regulation of keratinocyte differentiation	4	*	
			7.1								
Net calcification rate (μmolCaCO ₃ ·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	1	↖↖ ↙↘ 18 genes	0.4	-	57	anaerobiosis	GO:0071456	cellular response to hypoxia	4	*	
			0.5					GO:0006089	lactate metabolic process	3	*
								GO:0051174	regulation of phosphorus metabolic process	51	***
	2	↖↖ 435 genes ↙↘ 390 genes ↖↖ 6 genes	0.4	-	831	ATP metabolism / proton transport	GO:0036442	proton-exporting ATPase activity	6	**	
			0.7					GO:0042325	regulation of phosphorylation	47	***
								GO:1902275	regulation of chromatin organization	19	***
							epigenetic regulation process	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	22	**
								GO:0031056	regulation of histone modification	18	***
								ubiquitin pathway	GO:0016567	protein ubiquitination	47
							GO:0070647		protein modification by small protein conjugation or removal	52	***
							GO:0043162		ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	6	*
							regulation of cell death / apoptosis	GO:0010941	regulation of cell death	53	***
								GO:0042981	regulation of apoptotic process	45	***
							anion homeostasis	GO:0055081	anion homeostasis	11	***
							metal ion binding	GO:0046872	metal ion binding	162	***
								GO:0007034	vacuolar transport	15	**
								GO:0061025	membrane fusion	12	**
								GO:0071702	organic substance transport	103	***
							exocytosis / endocytosis	GO:0016192	vesicle-mediated transport	71	***
								GO:0016050	vesicle organization	24	***
			GO:0007032	endosome organization	10	***					
			GO:1903551	regulation of extracellular exosome assembly	4	*					
			lipid metabolism	GO:0032365	intracellular lipid transport	8	**				
				GO:0019216	regulation of lipid metabolic process	17	**				
			cellular communication	GO:0010646	regulation of cell communication	101	***				
				GO:0009966	regulation of signal transduction	86	***				

autophagy	GO:0006914	autophagy	16	**
	GO:0007041	lysosomal transport	11	*
RNA metabolism	GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	57	***
	GO:1903312	negative regulation of mRNA metabolic process	10	***
	GO:0006397	mRNA processing	23	**
	GO:0008380	RNA splicing	19	*
catabolism	GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	35	***
	GO:0006508	proteolysis	53	***

Table 3. Tipping points of main genes related to regulation of acid/base homeostasis, biomineralization, and shell organic matrix and periostracum synthesis as a function of net calcification rate. Model characteristics and physiological function are reported for each gene. The slope inclination is displayed using arrows only if it is significant according to Student t tests ($p < 0.05$). Tipping points are expressed in $\mu\text{molCaCO}_3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Genes that posses multiple versions (isomorphs) are underlined. Abbreviations: TP: tipping point, CBP: calcium-binding proteins

Gene family	Tipping point	Gene name	Model parameters				WGCNA cluster
			model	slope 1	slope 2	R^2	
Vacuolar protein sorting-associated protein (9 genes) ~ <i>vacuole assisted biomineralization</i>	0.4	<u>Vacuolar protein sorting-associated protein 13B (VP13B_13093)</u>	piecewise	↖	n.s.	0.13	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 33B (VP33B_50530)		↖	↙	0.36	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 37B (VP37B_54330)		↖	↙	0.33	2
	0.5	<u>Vacuolar protein sorting-associated protein 13B (VP13B_25217)</u>		↖	n.s.	0.23	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 19 (PEP7_39542)		↖	↙	0.20	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 2-2 (CHM2B_37424)		↖	n.s.	0.26	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog (VPS28_521)		↖	↙	0.45	2
	0.6	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A (VPS4A_36645)		↖	n.s.	0.12	2
		Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog (VPS53_66663)		↖	n.s.	0.20	2
		None	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B_36647)	linear	↖	n.a.	0.19
Ankyrin domain (8 genes) ~ <i>Ca²⁺ signaling pathway / CBP</i>	0.3	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B (ANS1B_5388)	piecewise	↖	↙	0.22	1
	0.5	<u>Ankyrin repeat and EF-hand domain-containing protein 1 (ANKE1_6493)</u>		↖	n.s.	0.12	2
		Ankyrin repeat domain-containing protein 12 (ANR12_10143)		↖	↙	0.27	2
	0.6	<u>Ankyrin-3 (ANK3_67642)</u>		↖	n.s.	0.15	2
		<u>Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2 (ANKY2_19928)</u>		↖	↙	0.28	2
		<u>Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2 (ANKY2_19931)</u>		↖	↙	0.27	2
	0.7	<u>Ankyrin-3 (ANK3_1401)</u>		↙	↖	0.35	3
	None	<u>Ankyrin repeat and EF-hand domain-containing protein 1 (ANKE1_51911)</u>	linear	↙	n.a.	0.22	4
Ankyrin repeat domain-containing protein 28 (ANR28_56928)			↖	n.a.	0.27	1	

		Ankyrin repeat domain-containing protein 50 (ANR50_30558)		↙	n.a.	0.22	4
		<u>Ankyrin-1 (ANK1_18639)</u>		↙	n.a.	0.26	4
		<u>Ankyrin-1 (ANK1_24287)</u>		↖	n.a.	0.28	1
ABC transporter (ATP-binding cassette transporter) (7 genes) ~ <i>ion, organic molecule transport</i>	0.4	Phospholipid-transporting ATPase (ABCA3_52472)	piecewise	↖	n.s.	0.17	2
	0.5	ATP-binding cassette sub-family F member 1 (ABCF1_66326)		↖	n.s.	0.15	2
		ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1_18962)		↖	n.s.	0.23	2
		<u>Phospholipid-transporting ATPase (ABCA1_21979)</u>		↖	n.s.	0.27	2
	0.6	ATP-binding cassette sub-family F member 3 (ABCF3_18492)		↖	n.s.	0.18	2
		<u>Phospholipid-transporting ATPase (ABCA1_17657)</u>		↖	n.s.	0.14	2
	0.7	<u>ATP-binding cassette sub-family C member 1 (MRP1_9234)</u>		↖	↙	0.39	2
	0.8	<u>ATP-binding cassette sub-family C member 1 (MRP1_66623)</u>		↖	n.s.	0.24	2
	None	ABC transporter A family member 5 (ABCA5_48231)	linear	↖	n.a.	0.25	2
Collagen (7 genes) ~ <i>organic matrix / pearl quality</i>	0.4	Collagen alpha-1(I) chain (CO1A1_34219)	piecewise	↙	n.s.	0.30	3
	0.5	Collagen alpha-2(IV) chain (CO4A2_48640)		↖	n.s.	0.39	1
	0.7	Collagen alpha-1(VII) chain (CO7A1_67127)		↖	n.s.	0.17	2
		Collagen alpha-6(VI) chain (CO6A6_52251)		↙	n.s.	0.15	3
	None	Collagen alpha-1(XII) chain (COCA1_23305)	linear	↖	n.a.	0.30	1
		Collagen alpha-1(XIX) chain (COJA1_6257)		↙	n.a.	0.24	4
		Collagen alpha-2(I) chain (CO1A2_68485)		↙	n.a.	0.26	4
V-type proton ATPase (6 genes) ~ <i>ion transport / acid/base homeostasis</i>	0.5	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit (VATL)	piecewise	↖	↙	0.25	2
		V-type proton ATPase 21 kDa proteolipid subunit (VATO)		↖	↙	0.27	2
		V-type proton ATPase subunit E (VATE)		↖	↙	0.29	2
	0.6	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 4 (VPP4)		↖	↙	0.28	2
		V-type proton ATPase subunit C 1-A (VTC1A)		↖	↙	0.27	2
		V-type proton ATPase subunit S1 (VAS1)		↖	↙	0.23	2
Peroxidase (5 genes) ~ <i>periostracum / pearl quality</i>	0.5	Peroxidasin homolog (PXDN_15715)	piecewise	↖	↙	0.32	2
		Prostaglandin G/H synthase 2 (PGH2_52590)		↖	n.s.	0.12	2
	0.7	<u>Peroxidase-like protein (PLSP_10293)</u>		↙	n.s.	0.19	3
	0.8	<u>Peroxidase-like protein (PLSP_5508)</u>		↙	n.s.	0.25	3
	None	Chorion peroxidase (PERC_25770)	linear	↖	n.a.	0.25	1
		<u>Peroxidase-like protein (PLSP_47735)</u>		↙	n.a.	0.28	3
		<u>Peroxidase-like protein (PLSP_47737)</u>		↙	n.a.	0.21	3
		Thyroid peroxidase (PERT_25771)		↖	n.a.	0.29	1
Acetylcholine receptor subunit (4 genes) ~ <i>CBP</i>	0.5	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-3 (ACHB3_65995)	piecewise	↖	n.s.	0.17	2
	0.6	Acetylcholine receptor subunit alpha-L1 (ACH1_46710)		↖	↙	0.25	2
		Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-2 (ACHA2_20460)		↖	↙	0.32	2
	None	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3 (ACHA3_71526)	linear	↙	n.a.	0.19	4
Carbonic anhydrase (4 genes) ~ <i>calcification</i>	0.2	Carbonic anhydrase (CAHZ_6318)	piecewise	↙	n.s.	0.28	4
	0.4	<u>Carbonic anhydrase 2 (CAH2_13823)</u>		↙	n.s.	0.28	4
		<u>Carbonic anhydrase 2 (CAH2_30262)</u>		↙	n.s.	0.18	4
	0.7	Carbonic anhydrase 12 (CAH12_52990)		↙	↖	0.18	3
	linear	Carbonic anhydrase 14 (CAH14_17431)	linear	↙	n.a.	0.19	4
Monocarboxylate transporter (4 genes) ~ <i>proton & carboxylate transport</i>	0.3	<u>Monocarboxylate transporter 9 (MOT9_70480)</u>	piecewise	↖	↙	0.28	2
	0.4	<u>Monocarboxylate transporter 9 (MOT9_2068)</u>		↖	↙	0.38	2
	0.5	<u>Monocarboxylate transporter 12 (MOT12_35092)</u>		↖	n.s.	0.20	2
		<u>Monocarboxylate transporter 14 (MOT14_10563)</u>		↖	n.s.	0.12	2
	0.6	<u>Monocarboxylate transporter 12 (MOT12_4935)</u>		↖	n.s.	0.17	2
0.7	<u>Monocarboxylate transporter 14 (MOT14_6149)</u>		↖	n.s.	0.18	2	

		Monocarboxylate transporter 5 (MOT5_49294)		↖	n.s.	0.25	2
	0.8	<u>Monocarboxylate transporter 12 (MOT12_33456)</u>		↙	n.s.	0.13	4
	None	<u>Monocarboxylate transporter 12 (MOT12_49313)</u>	linear	↖	n.a.	0.19	2
		<u>Monocarboxylate transporter 9 (MOT9_35091)</u>		↖	n.a.	0.20	2
Potassium channel (4 genes) ~ ion transport	0.4	Inward rectifier potassium channel 2 (KCNJ2)	piecewise	↖	n.s.	0.10	1
	0.5	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 12 (KCF12)		↖	↙	0.31	2
		<u>Potassium voltage-gated channel protein Shaw (KCAW)</u>		↖	n.s.	0.19	2
		Small conductance calcium-activated potassium channel protein (KCNN)		↖	↙	0.33	2
	None	<u>Potassium voltage-gated channel protein Shaw (KCAW)</u>	linear	↙	n.a.	0.36	4

Table 4. Tipping points of genes related to E3 ubiquitin protein ligase as a function of net calcification rate.

Model characteristics are reported for each gene. The slope inclination is displayed using arrows only if it is significant according to Student t tests ($p < 0.05$). Tipping points are expressed in $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Genes that posses multiple versions (isomorphs) are underlined. Abbreviations: TP: *tipping point*

Gene family	Tipping point	Gene name	Model parameters				WGCNA cluster
			model	slope 1	slope 2	R^2	
E3 ubiquitin-protein ligase (16 genes)	0.4	<u>RING finger protein 86 (TRIM2_39959)</u>	piecewise	↖	↙	0.29	1
	0.4	<u>RING finger protein 86 (TRIM2_5964)</u>		↖	↙	0.23	2
	0.5	<u>RING finger protein 103 (RN103_71915)</u>		↖	↙	0.46	1
	0.5	RING finger protein 145 (RN145_65522)		↖	n.s.	0.23	2
	0.5	RING finger protein 146 (RN146_20585)		↖	↙	0.38	2
	0.5	RING finger protein 181 (RN181_53484)		↖	n.s.	0.16	2
	0.5	RING finger protein 185 (RN185_36311)		↖	↙	0.31	2
	0.5	RING finger protein 38 (RNF38_62838)		↖	↙	0.25	2
	0.5	RING-type E3 ubiquitin transferase UBR2 (UBR2_27226)		↖	n.s.	0.3	2
	0.5	RING-type E3 ubiquitin transferase UBR3 (UBR3_54686)		↖	↙	0.21	2
	0.5	HECT-type E3 ubiquitin transferase UBR5 (UBR5_47214)		↖	n.s.	0.15	2
	0.6	RING finger protein 11 (RNF11_18737)		↖	↙	0.38	2
	0.6	RING finger protein 44 (RNF44_60488)		↖	↙	0.28	2
	0.7	RING finger protein 111 (RN111_24463)		↖	↙	0.19	2
	0.7	<u>RING finger protein 86 (TRIM2_24329)</u>		↖	↙	0.11	2
	0.8	<u>RING finger protein 97 (TRIM3_56705)</u>		↙	n.s.	0.19	4
	linear	<u>RING finger protein 103 (RN103_71916)</u>	linear	↖	n.a.	0.29	2
linear	RING-type E3 ubiquitin transferase UBR7 (UBR7_40313)		↖	n.a.	0.22	2	
linear	RING finger protein 60 (TRIM1_22206)		↖	n.a.	0.32	1	
linear	<u>RING finger protein 97 (TRIM3_12099)</u>		↖	n.a.	0.19	2	
Kelch-like protein (11 genes)	0.2	<u>Kelch-like protein 3 (KLHL3_39931)</u>	piecewise	↖	n.s.	0.43	1
	0.4	Kelch-like protein 20 (KLH20_35027)		↖	n.s.	0.25	2
	0.5	Kelch-like protein 13 (KLH13_70136)		↖	n.s.	0.27	2
	0.5	Kelch-like protein 21 (KLH21_46903)		↖	↙	0.26	2
	0.5	<u>Kelch-like protein 24 (KLH24_43133)</u>		↖	n.s.	0.28	2
	0.5	<u>Kelch-like protein 24 (KLH24_62196)</u>		↖	n.s.	0.19	2
	0.5	Kelch-like protein 26 (KLH26_12977)		↖	↙	0.3	2
	0.5	Kelch-like protein 33 (KLH33_55255)		↖	n.s.	0.2	2
	0.5	Kelch-like protein 2 (KLHL2_59769)		↖	↙	0.38	2
	0.5	Kelch-like protein 6 (KLHL6_69065)		↖	↙	0.31	2

0.7	<u>Kelch-like protein 25 (KLH25_1009)</u>		↙	n.s.	0.32	4
0.7	<u>Kelch-like protein 25 (KLH25_48129)</u>		↙	n.s.	0.21	4
linear	Kelch-like protein 28 (KLH28_69369)	linear	↖	n.a.	0.19	2
linear	Kelch-like protein 3 (KLHL3_14205)		↖	n.a.	0.27	1

Discussion

Here we provide the first reaction norm of juvenile oyster *P. margaritifera* to ocean acidification assessed by combining macro-physiological traits and molecular characteristics (Figure 6). This approach reveals that macro-physiological parameters exhibited low pH tipping points that coincide with major reshuffling in membrane lipids and transcriptome as previously reported for *C. gigas* (Lutier et al., 2022). Thus, juveniles appear resistant to near-future OA with tolerance threshold at low pH 7.3-6.9, although the shell could be affected above tipping points over the long-term. In-depth characterization of transcriptomic and lipidomic reaction norms associated with calcification rate suggest for the first time the importance of vacuolar assisted biomineralization, protein ubiquitination and membrane fatty acids in regulating biomineralization under extreme acidosis. These phenomena are widely overlooked in OA literature. This opens up interesting perspectives for using tipping point approach to discover new mechanisms involved in organisms’ response to global changes.

Tolerance threshold in juvenile *P. margaritifera* is below near-future OA projections

We identify a global tolerance threshold for juvenile *P. margaritifera* at pH 7.3-6.9, corresponding to the tipping points identified for the majority of the examined parameters including macro-physiological, i.e. byssus attachment, calcification, ingestion and energy reserves (carbohydrates), and molecular changes, i.e. membrane lipids, gene expression and carbonic anhydrase activity. Our results align with previous studies showing that bioenergetic

of adult *P. margaritifera* (ingestion, respiration, scope for growth) and gametogenesis were not affected for pH conditions above 7.4 (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016). Below tipping points, calcification, adhesion to substrate, ingestion, energy reserves and survival decreased markedly, likely reflecting increased maintenance costs that are unsustainable for organism's physiology (S. Li et al., 2017b; Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012a). Our results also support the fact that carbonic anhydrase activity is a proxy of calcification rate in marine invertebrates (Clark, 2020) as they concomitantly decreased below tipping point at pH 7.1.

The tipping point we determined at pH 7.3-6.9 will probably never be reached in tropical areas inhabited by pearl oyster where the average pH remains around 8.0 throughout the year (Chakraborty et al., 2021; Hofmann et al., 2011; Jiang et al., 2019; Kwiatkowski & Orr, 2018; Wu et al., 2018). This suggests a strong resilience of the species to near-future OA with a pH reduction of -0.33 units projected by 2100 (IPCC, 2021). However, it should be noted that pH recording is particularly scarce in the large geographic range of *P. margaritifera* (J. E. Johnson et al., 2020; Sutton et al., 2014) which extends from California to the Mediterranean sea and Madagascar (Gervis & Sims, 1992). Extreme events with pHs as low as 7.0 already occur in this geographic range, as recently shown on Borneo island (Proum et al., 2017), and could therefore be more frequent than expected. These events could spread and increase in duration and severity in the future (IPCC, 2019). Therefore, efforts should be made to monitor current and future pH variations in Polynesian islands at the local scale to project on the fate of pearl farming (J. E. Johnson et al., 2020). Indeed, once pH variability will be known, tipping points defined in our study could be integrated in biogeographic models of species distribution which is critical for implementing sound conservation policies. However, *P. margaritifera* is a

genetically structured species (Reisser et al., 2019) and therefore further researches would determine whether the tipping points are equivalent for genetically differentiated populations.

We expected that species inhabiting highly stable habitat such as tropical area must be more sensitive to OA as previously observed in *Pinctada fucata* that exhibit decrease in calcification, byssus production and metabolism at pH 7.8-7.4 (S. Li et al., 2017b; S. Li, Huang, et al., 2016; S. Li, Liu, et al., 2016). Tipping points in *P. margaritifera* however are similar to those observed in the Pacific oyster *C. gigas*, a species inhabiting highly variable environments in temperate intertidal areas (Lutier et al., 2022). Moreover, the strong resistance of *P. margaritifera* to OA is also highlighted by byssus functioning that is altered below tipping point at pH 6.9. To our knowledge, this result corresponds to the strongest resistance of bivalve's byssus to pH decrease reported in the literature. Indeed, the physicochemical structure of byssus is generally assumed to be very sensitive to OA resulting in loss of adhesion to substrate at pH 7.8-7.4 in mussels and *P. fucata* (L. Li et al., 2015; S. Li et al., 2017b; O'Donnell et al., 2013; Welladsen et al., 2011; Zhao et al., 2017). More studies are therefore needed to understand the evolutionary divergence associated with species-specific tolerance thresholds to OA.

Potential sensitivity of shell structure to OA

Here, we found no impact of OA on shell properties, i.e. shell weight, length and mineral thickness, and no impact on periostracum coverage for pH above 7.0-6.9. This differs from previous study that showed periostracum delamination accompanied by crystalline malformation and dissolution of the shell mineral layer in *P. margaritifera* exposed 100 d at pH 7.8-7.4 (Le Moullac, Soyeux, Vidal-Dupiol, et al., 2016). This could be explained by the short duration of our experiment, 16 d, that was not sufficient to observe significant impacts on shell properties. We however observed a decrease in periostracum thickness below tipping point at pH 7.7 near the umbo, the oldest part of the shell, indicating the onset of active periostracum

delamination. The periostracum, the organic coat covering the shell, delaminates under OA from the umbo to the shell margin with dramatic consequences for shell integrity which is no longer isolated from the corrosive surrounding seawater (Bressan et al., 2014; Peck et al., 2016, 2018). In our case, the decrease in periostracum thickness was accompanied by increase in expression of genes coding for tyrosinases, that are involved in periostracum formation (Hüning et al., 2013). In oysters and mussels, up-regulation of tyrosinases and periostracum delamination often coincide with a decrease in shell strength and thickness (Zhao et al., 2020) that determines resistance against predation (Wright et al., 2018). This therefore suggest that longer exposure to pH above tipping point could have impacted *P. margaritifera* shell properties and individual fitness. Indeed, it was recently demonstrated that alteration of shell properties can occur above physiological tipping points (Lutier et al., 2022) and that OA is more a “dissolution problem” than a “calcification problem” (Rajan et al., 2021). The sensitivity of shell properties would therefore be further investigated, over a longer exposure period, in order to determine the true sensitivity of juvenile pearl oysters to OA. It would also be necessary to determine the long-term impact of pH drops above the tolerance threshold, on pearl quality, the other CaCO₃-structure produced by pearl oyster, that is crucial for pearl farming in Polynesian islands. For instance, the up-regulation of tyrosinase related genes in the mantle was shown to be associated to decrease in pearl quality in *P. margaritifera* (Le Luyer et al., 2019; Marie et al., 2012).

Maintenance costs of calcification and acid/base homeostasis could explain the rapid mortalities occurring below the tolerance threshold

Contrary to what we previously observed in the Pacific oysters (Lutier et al., 2022), *P. margaritifera* could not enter metabolic depression below tipping points in order to spare energy and maintain homeostasis. Among the physiological regulations related to metabolic

depression, organisms are expected to reduce active transmembrane transport of ions as it is one of the most energy-intensive physiological mechanism (Sokolova et al., 2012b). This process was indeed observed in *C. gigas* (Lutier et al., 2022). Conversely, below the tipping point for calcification, pearl oysters increased the expression of genes related to GO terms that can be associated to proton extrusion and active regulation of acid/base homeostasis such as “*proton-exporting ATPase activity*” and “*anion homeostasis*” (Strader et al., 2020). We also found an increase in expression of Ankyrin-related genes which codes for membrane proteins regulating the functioning of transmembrane transporters such as ATPases (Benner et al., 2013; Cunha & Mohler, 2011; Nelson & Veshnock, 1987).

In order to fuel the increase in energy need related to active ion transport, the metabolism of juvenile oysters could have switched to anaerobiosis below tolerance threshold. Indeed, this metabolic process is more efficient than aerobiosis in quickly delivering large amounts of energy to cells under acute stress (Sokolova, 2013). Below calcification tipping point, the induction of anaerobiosis to produce energy is indicated by the linear increase in expression of genes related to GO terms “*cellular response to hypoxia*”, “*lactate metabolism*”, “*regulation of phosphorus metabolic process*” and “*regulation of phosphorylation*” that can be related to anaerobiosis and energy production (J. L. Carroll & Wells, 1995; Lannig et al., 2010). Under extreme acidification, the use of anaerobiosis is quite paradoxical as protons H^+ are a byproduct of anaerobiosis that are concentrated in the intracellular medium and must be eliminated (Michaelidis, Haas, et al., 2005a). Our results emphasize the tight link between anaerobiosis, proton extrusion and calcification as we found a global increase in expression of monocarboxylate transporters genes below tipping point for calcification rate. Indeed, these transmembrane proteins cotransport protons H^+ and monocarboxylates such as lactate that are by-product of anaerobiosis that must be removed from intra-cellular milieu (Ertl et al., 2019;

Tresguerres et al., 2020). Although it has received little attention in OA research, our results support recent observations in *C. gigas* suggesting that monocarboxylate transporters play a central role in maintaining the homeostasis of calcifiers (Lutier et al., 2022).

We therefore found that *P. margaritifera* expend a lot of energy to actively maintain H⁺ proton gradient across membranes below tipping point. However, this cannot be maintained over a long period of time since organisms have only limited carbohydrate reserves as source of energy when they decrease ingestion rates (Sokolova, 2013). Therefore, we observe a decrease in carbohydrate content below tipping point followed by massive increase in mortality. In intertidal temperate Pacific oyster, metabolic depression is a mechanism of adaptive plasticity that allows the organism to withstand extreme acidosis at low tide where hemolymph pH can reach 6.8 (Michaelidis, Haas, et al., 2005a). Conversely, in tropical subtidal environments, the pH is very stable and therefore *P. margaritifera* probably does not experience extreme acidosis events during its lifetime (Chakraborty et al., 2021; Hofmann et al., 2011; Jiang et al., 2019; Kwiatkowski & Orr, 2018; Wu et al., 2018). This could explain why the metabolic depression strategy was not selected in this species which is therefore not adapted to resist extreme acidosis events. Our findings are worrying for the future of the pearl oyster, which will decline rapidly if OA exceeds its tolerance threshold in its habitat.

Endocytosis/exocytosis, membranes fatty acids and protein ubiquitination are likely involved in the maintenance of calcification

Here, we highlighted the importance of endocytosis/exocytosis in the maintenance of calcification and acid/base homeostasis under OA, a phenomenon that has been largely overlooked in literature. Vesicles are formed from cellular membranes and contains ion transporters that can be used to regulate seawater carbonate chemistry inside the vesicles without impacting other intracellular processes (Bentov et al., 2009; Mackinder et al., 2010).

Vacuole-assisted biomineralization consists in favoring crystal formation in the vesicle that are then transported to the calcification site. Endocytosis and exocytosis can also participate to ion transportation and proton extrusion (Lacoste et al., 1993). In our case, the induction of this phenomenon is shown by the enrichment of many GO terms associated to endocytosis/exocytosis and ubiquitin pathway in the genes that increase in expression rate below tipping point for calcification. Indeed, ubiquitin pathway is crucial for vesicle formation (Hershko & Ciechanover, 1998; MacDonald et al., 2012). We also found increase in expression of many genes coding for V-type ATPases that ensure proton extrusion from vesicles (Mackinder et al., 2010). Moreover, this is accompanied by increase in the expression of many genes encoding vacuolar-sorting associated proteins, as recently observed in oysters submitted to OA (Rajan et al., 2021), which ensure the transportations of proteins, e.g. enzymes, to vesicles (Xiang et al., 2013).

The formation of vesicle also depends on the lipid composition of the membranes (Degreif et al., 2019) which is congruent with the membrane lipid reshuffling observed under OA. In our case, the link between vesicle formation and lipid composition is particularly supported by increasing contribution of ARA to membrane fatty acids below the tipping point. Indeed, this fatty acid is known to be an activator of vesicle formation and exocytosis (Garcia-Martinez et al., 2018; Latham et al., 2007). Membranes lipid reshuffling also influences the functioning of transmembrane transporters (Hazel & Williams, 1990; Hochachka & Somero, 2002). Here we observe a concomitant increase in membrane ARA level and expression of genes encoding potassium channels that are involved in acid/base and calcification regulation (S. Li, Liu, et al., 2016; Yarra et al., 2021; Zhao et al., 2020) which supports the role of ARA as an activator of these channels (Horimoto et al., 1997). Our results therefore emphasize the crucial role of membrane fatty acids reshuffling and signaling fatty acids such as ARA for the

maintenance of calcifier's homeostasis under OA. Importantly, common pattern of variations were found for ARA in the membranes of *C. gigas* submitted to OA (Lutier et al., 2022).

Besides favoring vesicle formation, protein ubiquitination could also be involved in biomineralization process through ubiquitination of shell matrix protein that favor CaCO_3 crystal formation. Interestingly, this process is activated in *P. fucata* submitted to stress and in *Crassostrea hongkongensis* submitted to OA, and is mainly related to E3-ubiquitin protein ligase activity (Rajan et al., 2021; J. Zhang et al., 2020). Here we found that the expression of many genes encoding E3-ubiquitin ligase increases below tipping point, as well as Kelch-like proteins that are part of the E3-ubiquitin protein ligase complex (Shi et al., 2019). Ubiquitin ligases are also known for mediating the functioning of transmembrane proteins and ion transport through their ubiquitination (Foot et al., 2017). Also, we observe increase in expression of genes related to GO "protein ubiquitination" below tipping point together with increase in GO terms related to cell autophagy, lysosome, apoptosis and proteolysis. These observations supports the role of protein ubiquitination in mitigating injury caused by OA to tissues as already observed in *P. fucata* (S. Li et al., 2015, 2017b).

Here, we did not examine specific tissues related to biomineralization, such as the mantle, and the genes we identified are often involved in different physiological functions. However, the association of macrophysiological (calcification) and molecular reaction norms provides a comprehensive view of the animal response, strengthen our interpretive capacity and therefore makes it possible to identify mechanisms involved in the regulation of calcification. We believe that these important mechanisms of vacuole-assisted biomineralization, protein ubiquitination and membrane fatty acid reshuffling must be widely used in marine calcifiers exposed to OA. Indeed, other studies commonly observed upregulation of genes associated with protein ubiquitination and endocytosis/exocytosis under OA in corals, gastropods and bivalves but did

not linked it to the regulation of biomineralization processes (S. L. Carroll & Coyne, 2021; Kaniewska et al., 2015; S. Li et al., 2017b; S. Li, Huang, et al., 2016; Rajan et al., 2021).

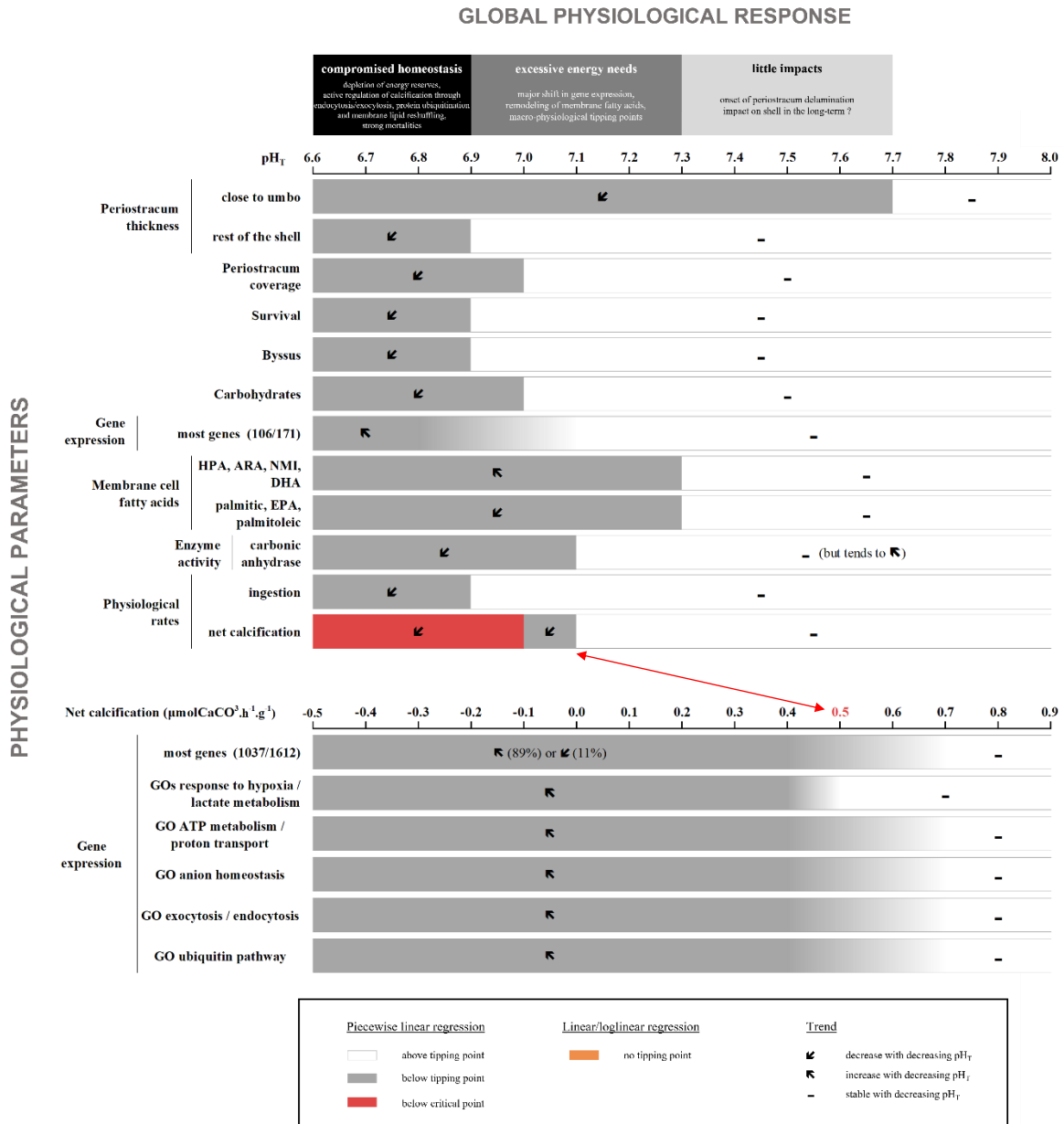


Figure 6. Graphical summary of the reaction norms of juvenile oysters *Pinctada margaritifera* over a wide range of pH conditions, and reaction norms of the biomineralization processes as a function of net calcification rate. Abbreviations: GO, gene ontology term; ARA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; HPA, heneicosapentaenoic acid; NMI, non-methylene interrupted acids.

Conclusion

We show that juveniles *P. margaritifera* have a broad tolerance to OA, exhibiting tipping points around pH 7.3-6.9 for most parameters (Figure 6). However, further researches are needed to determine the precise impact of OA on shell integrity and pearl quality above the tolerance threshold. Interestingly, our approach allows identifying mechanisms involved in the maintenance of calcification that were previously overlooked in OA research fields: vacuole-assisted biomineralization, membrane fatty acids reshuffling and protein ubiquitination. Although we did not examine specific tissues related to biomineralization, these findings were made possible by combining molecular and biochemical assessment of reaction norms with macro-physiological observations. We believe that it is possible to go further and apply this approach to the study of specific tissues, organs and cells in order to precisely identify fine mechanisms involved in the physiological response of organisms to global changes.

Supplementary information

Figure S1

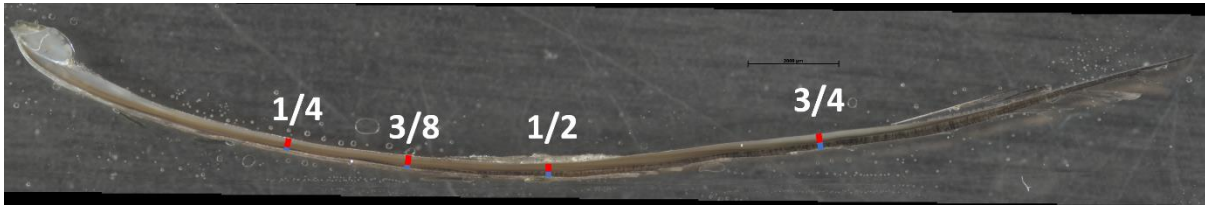


Figure S1. Longitudinal cross-section of an oyster shell from the umbo (left) towards the margin (right). The four points (1/4, 3/8, 1/2 and 3/4) where thickness was measured are shown. Two different parameters were measured: the thickness of the mineral part of the shell (red) and the thickness of the periostracum (blue).

Figure S2

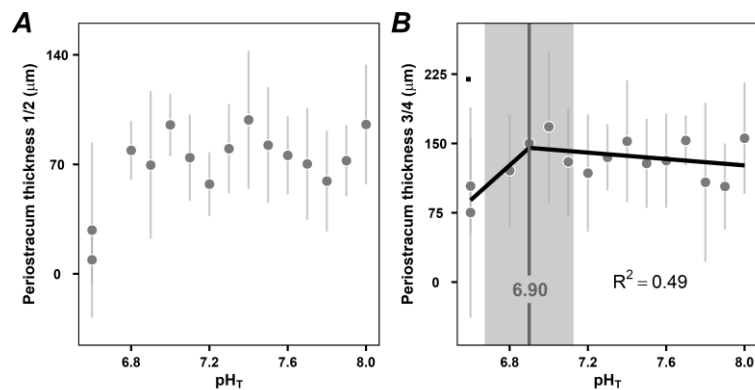


Figure S2. Reaction norms of periostracum thickness at points (A) 1/2 and (B) 3/4 as a function of pH (total scale). Data are means \pm SD. Tipping points and its 95% confidence intervals is shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using symbols ($p < 0.001$ ***, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ *, $p < 0.1$ •). (A) No model is significant, only points are displayed

Figure S3

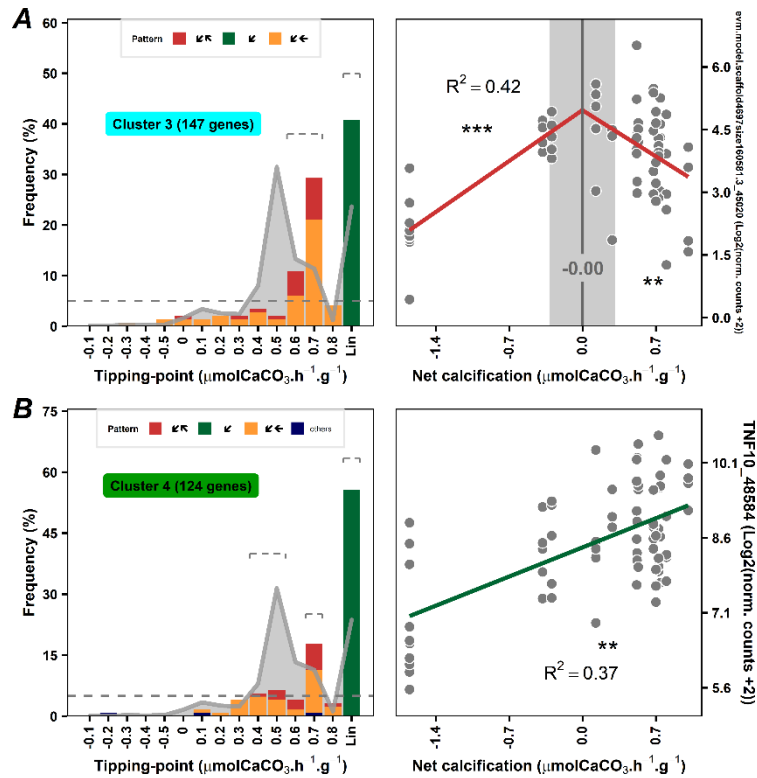


Figure S3. Tipping points of oyster transcriptome as a function of net calcification rate. Frequency distribution of tipping-point for piecewise linear relationships (left side). Linear models (no tipping-point) are under “Lin” name. Genes are grouped into 2 cluster of genes that co-vary together.(A-B) In the histogram, colors represent the pattern of variation of gene expression as a function of pH for the model (linear regression) or each part of the model (piecewise linear regression). The symbols which represent patterns of variation are: \nwarrow : increase with decreasing pH, \swarrow : decrease with decreasing pH, \leftarrow : stable with decreasing pH (p-value slope > 0.05). Groups of genes which exhibit neighboring tipping points with distribution frequencies $> 5\%$ (shown as a dotted line), were grouped together. The grey segments above the bars indicate the groups of genes on which GO analyses were conducted. For each cluster, the gene that best represents the cluster according to module membership, gene significance for calcification and R^2 is presented as a function of net calcification rate as an example (right side). Tipping points and their 95% confidence intervals are shown in grey. The significance levels of the slopes are presented using stars ($P < 0.001$ ***, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ *).

Table S1

Table S1. Seawater parameters during the incubations. pH on the total scale (pH_T), calcite saturation state (Ω_{CA}), total alkalinity (TA), oxygen saturation (O₂), salinity (S) and temperature (T). Average represents the mean values between the onset and the end of the incubations. Δ represents the difference between the end and the onset of the incubations. Values are mean \pm SD.

Nominal pH _T	Average pH _T	Δ pH _T	Average Ω_{CA}	$\Delta \Omega_{CA}$	Δ TA ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	Δ O ₂ (%sat)	Δ NH ₄ ⁺ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Average S	Average T (°C)
8.0	8.0 \pm 0.0	0.0	5.2 \pm 0.1	0,20	6.6	2.2	0.3	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
7.9	7.9 \pm 0.0	0.1	4.2 \pm 0.4	0,50	7.6	1.0	-1.3	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
7.8	7.8 \pm 0.0	0.0	3.6 \pm 0.1	0,10	2.8	2.1	-3.0	35.4 \pm 0.0	28.3 \pm 0.1
7.7	7.7 \pm 0.0	0.1	2.8 \pm 0.2	0,30	8.4	2.4	-1.3	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
7.6	7.6 \pm 0.0	0.0	2.5 \pm 0.1	0,20	8.1	2.9	-1.8	35.4 \pm 0.0	27.9 \pm 0.1
7.5	7.5 \pm 0.0	0.0	2.1 \pm 0.1	-0,10	5.8	1.8	-4.4	35.4 \pm 0.0	28.1 \pm 0.0
7.4	7.5 \pm 0.0	-0.1	1.9 \pm 0.1	-0,20	7.7	2.1	-1.4	35.4 \pm 0.0	28.1 \pm 0.1
7.3	7.3 \pm 0.1	-0.1	1.3 \pm 0.2	-0,30	6.0	1.7	-2.4	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
7.2	7.2 \pm 0.0	0.1	1.1 \pm 0.1	0,10	5.0	3.2	-2.4	35.4 \pm 0.0	28.0 \pm 0.1
7.1	7.2 \pm 0.1	-0.1	1.0 \pm 0.1	-0,20	1.9	2.1	-0.8	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
7.0	7.0 \pm 0.1	-0.1	0.6 \pm 0.1	-0,10	0.2	1.2	-1.2	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
6.9	6.9 \pm 0.2	-0.3	0.6 \pm 0.2	-0,30	-5.1	1.9	-1.3	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.1
6.8	6.9 \pm 0.1	-0.2	0.6 \pm 0.2	-0,30	-4.0	2.2	-1.1	35.4 \pm 0.0	28.2 \pm 0.0
6.7	6.6 \pm 0.1	-0.1	0.3 \pm 0.1	-0,10	-18.6	2.5	-3.3	35.4 \pm 0.0	27.9 \pm 0.0
6.6	6.6 \pm 0.2	-0.3	0.3 \pm 0.1	-0,20	-9.5	0.5	-0.5	35.4 \pm 0.0	28.1 \pm 0.1

Table S2

Table S2. Seawater parameters measured during the experiment in each experimental tank. pH on the total scale (pH_T), total alkalinity (TA), oxygen saturation (O₂), salinity (S), temperature (T), calcite saturation state (Ω_{CA}), aragonite saturation state (Ω_{AR}), CO₂ partial pressure (pCO₂) and dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations are shown (mean \pm SD). pH, O₂, S and T were measured twice daily and TA was measured once a week.

Nominal		Measured				Calculated			
pH _T	pH _T	TA ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	O ₂ (% sat)	S	T (°C)	Ω_{CA}	Ω_{AR}	pCO ₂ (μatm)	DIC ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)
8.0	8.0 \pm 0.0	2325 \pm 8	96.9 \pm 0.8	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.5	4.9 \pm 0.4	3.2 \pm 0.3	516 \pm 48	2046 \pm 21
7.9	7.9 \pm 0.0	2336 \pm 5	96.4 \pm 0.8	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	4.0 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2	708 \pm 57	2117 \pm 16
7.8	7.8 \pm 0.1	2327 \pm 5	95.7 \pm 1.0	35.3 \pm 0.1	27.9 \pm 0.5	3.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.1	810 \pm 20	2133 \pm 8
7.7	7.7 \pm 0.0	2320 \pm 8	97.0 \pm 0.7	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	2.8 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	1116 \pm 68	2182 \pm 12
7.6	7.6 \pm 0.0	2281 \pm 26	96.4 \pm 0.8	35.3 \pm 0.1	27.6 \pm 0.6	2.3 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1349 \pm 90	2177 \pm 27
7.5	7.5 \pm 0.1	2308 \pm 12	96.4 \pm 0.7	35.3 \pm 0.1	27.8 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1726 \pm 69	2237 \pm 13
7.4	7.4 \pm 0.1	2327 \pm 6	96.5 \pm 0.9	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	1.7 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	2126 \pm 323	2284 \pm 22
7.3	7.3 \pm 0.0	2320 \pm 7	96.7 \pm 0.4	35.3 \pm 0.1	27.8 \pm 0.5	1.4 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	2613 \pm 304	2306 \pm 18
7.2	7.2 \pm 0.1	2313 \pm 10	94.9 \pm 1.3	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.5	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	3921 \pm 417	2358 \pm 19
7.1	7.1 \pm 0.2	2337 \pm 5	96.7 \pm 1.1	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	5077 \pm 403	2424 \pm 15
7.0	7.0 \pm 0.1	2342 \pm 5	96.2 \pm 0.8	35.3 \pm 0.1	27.8 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	5622 \pm 594	2447 \pm 20
6.9	6.9 \pm 0.1	2341 \pm 3	95.9 \pm 1.4	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	6992 \pm 1233	2489 \pm 38
6.8	6.8 \pm 0.1	2342 \pm 5	96.3 \pm 0.6	35.3 \pm 0.1	27.8 \pm 0.6	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	9995 \pm 788	2578 \pm 23
6.7	6.6 \pm 0.2	2320 \pm 12	95.7 \pm 0.9	35.4 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	11272 \pm 1747	2592 \pm 50
6.6	6.6 \pm 0.1	2358 \pm 7	96.2 \pm 0.7	35.3 \pm 0.1	27.7 \pm 0.6	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	15752 \pm 1710	2752 \pm 47

Table S3

Table S3 Relative contribution of fatty acids to membrane. Their contribution (%) and Pearson's correlation to the first principal component (PC1) of the PCA are showed.

Average pH _T	Fatty acid (% total fatty acids)									
	16:0	16:1n-7	17:0	18:0 dma	18:0	18:1n-9	18:1n-7	18:2n-6	20:0	
8.0	12.0	2.2	1.0	13.7	5.6	3.5	2.9	2.0	1.6	
7.9	11.8	2.3	1.0	13.9	6.0	3.5	3.2	1.9	1.4	
7.8	13.2	2.5	1.1	14.0	5.6	3.2	3.1	1.9	1.5	
7.7	12.5	2.3	1.0	14.3	5.9	3.3	2.9	2.1	1.2	
7.6	12.9	2.3	1.0	12.8	6.2	3.0	3.2	1.7	1.5	
7.5	12.5	2.4	1.0	13.1	6.1	3.1	3.5	1.9	1.3	
7.4	12.1	2.2	0.9	14.3	5.9	3.4	3.2	2.0	1.5	
7.3	13.6	2.5	1.1	14.6	6.5	3.5	3.4	2.1	1.5	
7.2	12.2	2.3	0.9	13.8	5.9	3.5	3.2	2.1	1.4	
7.1	12.0	1.9	1.1	14.0	6.4	3.4	3.0	1.9	1.7	
7.0	11.7	2.1	1.0	13.4	6.3	3.3	3.4	2.0	1.5	
6.9	12.1	2.2	1.1	13.3	5.9	3.6	3.4	2.1	1.7	
6.8	11.2	1.6	1.4	14.7	6.8	3.3	3.0	1.6	1.5	
6.6	11.8	2.0	1.4	14.4	6.3	3.2	3.2	1.5	1.6	
6.6	11.5	1.6	1.3	14.3	6.8	3.8	3.4	1.8	1.5	
PCA	contribution to PC1 (%)	45.5	8.0	0.8	2.6	4.7	0.4	0.3	1.3	0.1
	correlation to PC1 (Pearson)	-1.0	-0.9	0.6	0.3	0.5	0.3	-0.2	-0.5	0.2

Average pH _T	Fatty acid (% total fatty acids)								
	20:1n-11	20:1n-9	20:4n-6	20:5n-3	22:2 NMI	21:5n-3	22:5n-6	22:6n-3	
8.0	3.8	1.7	5	3.1	8.7	2.3	4.7	13	
7.9	3.9	1.4	5.2	3.6	9.2	2.5	4.2	12.6	
7.8	3.1	1.5	5.3	4.1	8.7	2.4	3.9	12.5	
7.7	4.2	1.6	5.1	3.4	9	2.2	4.1	12.1	
7.6	4.3	1.6	4.8	3.6	9.5	2.4	4.3	12.9	
7.5	3.6	1.4	5.1	4.2	9.1	2.4	3.7	12.1	
7.4	3.8	1.6	4.8	3.3	9	2.4	4.4	12.9	
7.3	3.7	1.5	5	3.8	8.9	0	4.5	12.5	
7.2	3.6	1.7	4.9	3.5	8.8	2.3	4.4	12.8	
7.1	3.7	1.6	4.6	3.1	8.9	2.4	4.4	13.7	
7.0	3.9	1.5	5.1	3.6	8.9	2.5	4.3	13.3	
6.9	3.1	1.6	4.9	3.7	8.4	2.4	4.3	13.1	
6.8	4.0	1.5	5.7	2.9	9.7	2.3	4.1	12.6	
6.6	4.4	1.3	5.9	4	8.8	2.4	3.2	12.2	
6.6	3.8	1.8	5.6	2.8	9.4	2.4	4.2	13.2	
PCA	contribution to PC1 (%)	2.3	0.2	3.2	10.4	3.0	14.0	0.1	3.1
	correlation to PC1 (Pearson)	0.4	0.3	0.4	-0.7	0.5	0.6	-0.1	0.3

Table S4

Table S4. Number of genes modelled against pH and net calcification rate. Each step of filtering and the corresponding number of selected genes are specified.

Factor	WGCNA cluster of gene	Correlated with factor	Modelled & slope $\neq 0$	Model		
pH_r	1	1311	787	171	piecewise	146
					linear	25
Net calcification rate ($\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	1	1311	995	276	piecewise	137
					linear	139
	2	6971	2496	1065	piecewise	951
					linear	114
	3	776	489	147	piecewise	87
					linear	60
	4	1942	832	124	piecewise	55
					linear	69

DISCUSSION GENERALE

I. Objectif de la thèse : décrire la plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieux tempéré et tropical

Depuis les années 1950, les changements environnementaux liés aux activités humaines se poursuivent à un rythme sans précédent dans l'histoire évolutive des espèces contemporaines (Steffen et al., 2015), surpassant leurs capacités d'acclimatation et d'adaptation et provoquant ainsi la sixième crise d'extinction massive de la biosphère (Ceballos et al., 2020). La plasticité phénotypique représente la première ligne de défense permettant aux espèces de persister à court-terme et s'adapter sur le long-terme face aux changements globaux (Gibert et al., 2019). Cela est particulièrement le cas pour les espèces sessiles, telles que les huîtres, qui ne peuvent pas migrer vers des environnements plus favorables (Padilla & Savedo, 2013). Ainsi, il est crucial de déterminer la plasticité phénotypique des espèces en établissant des normes de réaction de leur principales fonctions physiologiques et de leur réponse moléculaire sur une large gamme de variations environnementales (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). Cela permet de déterminer les points de bascule phénotypiques et, par synthèse, le seuil de tolérance global de l'espèce au-delà duquel elle doit s'adapter sur le long-terme afin d'éviter le déclin et l'extinction (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010).

L'acidification des océans (AO) est l'un des changements globaux les plus rapides de l'anthropocène (Steffen et al., 2015). Ainsi, la diminution du pH au cours du XXI^e siècle pourrait surpasser tous les changements de pH ayant eu lieu dans l'océan au cours des 300 derniers millions d'années (Caldeira & Wickett, 2003), challengeant l'adaptabilité des mollusques marins (Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). Pourtant, la détermination des normes de réactions reste anecdotique dans la recherche sur l'AO (Bednaršek et al., 2019, 2021;

Dorey et al., 2013; Jager et al., 2016; H.-G. Lee et al., 2019; Ventura et al., 2016). En conséquence, le seuil de tolérance et le potentiel adaptatif restent méconnus chez des espèces modèles, pourtant très étudiées, telle que l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ducker & Falkenberg, 2020) et des espèces peu étudiées telle que l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016). Le déclin de ces espèces d'huîtres aurait pourtant un impact important sur les activités économiques et écosystèmes qui en dépendent (Coen et al., 2007; FranceAgriMer, 2021; IEOM, 2018; J. E. Johnson et al., 2015, 2020; Lemasson et al., 2017).

Dans ce contexte, ce travail de thèse a établi les normes de réaction de l'huître creuse et de l'huître perlière à l'AO en intégrant des approches macro-physiologiques (i.e. taux physiologiques, intégrité de la coquille) et -omiques au niveau moléculaire (i.e. transcriptomique, lipidomique). L'établissement de normes de réaction chez ces espèces d'huître phylogénétiquement proches mais au milieu de vie différent, i.e. intertidal tempéré *versus* subtidal tropical, nous a ainsi permis d'améliorer nos connaissances sur le potentiel adaptatif des espèces à l'AO. Nous avons notamment pu répondre aux questions suivantes :

(1) *quels sont les points de bascule et le seuil de tolérance global à l'AO chez l'huître creuse et l'huître perlière ?*

(2) *la réduction de fitness subie en dessous des points de bascule est-elle réversible ?*

(3) *la plasticité adaptative des espèces aux milieux intertidal tempéré et subtidal tropical conditionne-elle leur capacité de réponse et leur potentiel adaptatif à l'AO ?*

(4) *quels sont les mécanismes régulant la plasticité phénotypique au niveau moléculaire ?*

Dans cette discussion générale nous dresserons un bilan de ces découvertes et nous évaluerons les limites de notre approche. Enfin, nous discuterons de la place à donner aux normes de réaction dans le futur de la recherche sur l'AO (réflexions personnelles).

II. Quels sont les points de bascule et le seuil de tolérance global à l'AO chez l'huître creuse et l'huître perlière ?

II.1. L'huître creuse

La description de la plasticité phénotypique des juvéniles d'huître creuse à l'AO est schématisée sur la figure 1, résumant nos principaux résultats. Nous avons ainsi identifié le seuil de tolérance à l'AO à pH 7.3-6.9 correspondant aux points de bascule mesurés pour la majeure partie des paramètres macro-physiologiques et moléculaires, et en dessous duquel les individus entrent en dépression métabolique. Il est marquant de constater que nos résultats sont similaires à ceux observés par Bamber (1990) lors de sa première détermination d'une norme de réaction au pH chez l'huître creuse, bien que cette étude ait souffert de biais méthodologique et que l'échelle de pH utilisée soit inconnue (voir Gazeau et al., 2013). Au-dessus de pH 7.3-6.9, la valeur des traits phénotypiques des juvéniles reste stable pour la majeure partie des caractères étudiés. Pour l'huître creuse, des points de bascule à pH 7.3-6.9 semblent correspondre à une plasticité adaptative à son milieu de vie, en zone côtière tempérée (Vargas et al., 2017; Waldbusser & Salisbury, 2014). En effet, ce seuil de tolérance correspond aux conditions les plus extrêmes pouvant y être rencontrées, notamment en estuaire, en lien avec des phénomènes d'hypoxie et d'eutrophisation (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). Ce résultat est attendu en cas de plasticité adaptative d'une espèce à son environnement, les points de bascule correspondant alors aux conditions environnementales les plus extrêmes rencontrées dans le milieu de vie (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010).

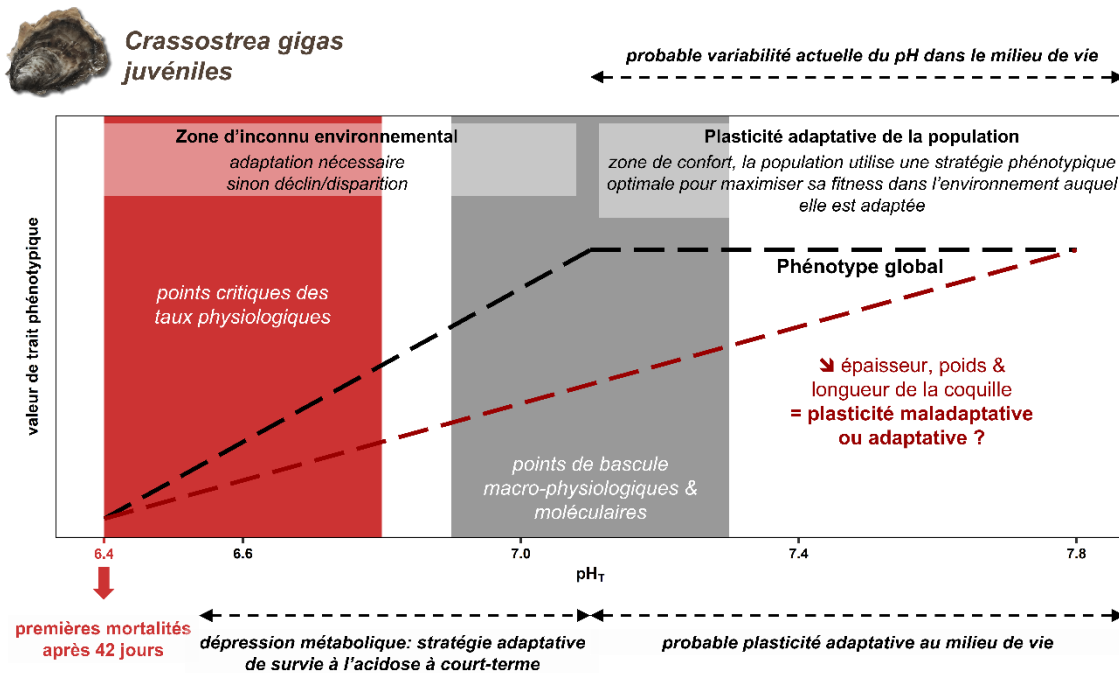


Figure 1. Plasticité phénotypique des juvéniles d’huître creuse exposées à l’acidification des océans pendant 23 jours. La courbe noire synthétise le pattern suivi par les normes de réaction au pH des taux physiologiques (calcification, ingestion, respiration, croissance). La courbe rouge synthétise le pattern suivi par les normes de réaction au pH des paramètres de la coquille (épaisseur, poids et longueur). Les normes de réaction de l’expression des gènes liés aux transporteurs membranaires d’ion suivent également la courbe noire.

Les paramètres de la coquille en terme de poids, de longueur et d’épaisseur constituent toutefois une exception et sont impactés dès que le pH diminue, bien avant que le seuil de tolérance ne soit atteint (Figure 1). Ainsi, la coquille serait le point clé déterminant la sensibilité de l’huître creuse à l’acidification des océans, comme cela est depuis longtemps admis pour les organismes calcifiants (Gazeau et al., 2013). En revanche, contrairement à ce qui était jusqu’à présent suggéré (Ducker & Falkenberg, 2020), ce travail montre que l’impact sur la coquille est découplé de l’altération de la calcification et de la dépression métabolique. Ces résultats correspondent aux hypothèses récentes de Rajan et al. (2021) selon lesquels l’AO serait d’avantage un problème de « dissolution » que de coût énergétique pour le maintien de la « calcification ». Dans tous les cas, l’impact immédiat de l’AO sur la coquille pourrait induire

une augmentation de la vulnérabilité face aux stress physiques et à la prédation avec un impact direct sur la fitness des huîtres (Byrne & Fitzner, 2019; Wright et al., 2018). Dans ce cas, cette diminution linéaire de la longueur, de l'épaisseur et du poids de la coquille serait une plasticité maladaptative de l'huître, la fitness diminuant avec le pH, requérant une adaptation à long-terme afin de limiter l'impact sur la survie des populations.

De telles normes de réaction pour la coquille peuvent sembler surprenantes étant donné que le pH diminue régulièrement en dessous de 7.8 dans le milieu de vie de l'huître creuse (Barton et al., 2012) et peut-être même jusqu'à 7.0 dans des cas extrêmes (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). En effet, dans ce cas, l'huître creuse ne semble pas adaptée à maintenir sa fitness dans son milieu de vie. A l'inverse de la coquille, les normes de réaction des autres paramètres physiologiques et moléculaires sont pourtant cohérentes avec une plasticité adaptative de *C. gigas* à son habitat. On peut donc se demander dans quelle mesure cette diminution des paramètres morphologiques (longueur, poids, épaisseur) de la coquille est une plasticité maladaptative réduisant la fitness de l'huître creuse lorsque le pH diminue. Comme l'a montré une étude récente, le maintien d'une coquille dense, épaisse et de grande taille représente un coût énergétique important pour l'huître creuse et est induit uniquement lorsque l'organisme ressent la présence de prédateurs dans son environnement via la présence de signaux chimiques (i.e. *predator cues*) (Scherer et al., 2018). Aussi, l'épaisseur de la coquille serait d'avantage corrélée à la pression de prédation qu'au pH de l'environnement chez des bivalves tels que la moule *Mytilus edulis* (Telesca et al., 2021). Lorsqu'ils sont soumis à une diminution de pH de 8.0 à 7.8 en présence de prédateurs tels que les bigorneaux perceurs, les juvéniles d'huître creuse sont parfois capables de maintenir la solidité de leur coquille et de rester résistantes à la prédation (Wright et al., 2014) même si cela n'est pas systématique (Wright et al., 2018).

A l'inverse, chez les bivalves (Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005) et notamment chez l'huître creuse (Michaelidis, Haas, et al., 2005a), la dissolution de la coquille peut tamponner le milieu interne, via la libération d'ions HCO_3^- , limitant ainsi l'acidose et son impact sur le métabolisme. Il est donc possible que la diminution de la longueur, de l'épaisseur et du poids de la coquille lorsque le pH diminue, au-dessus des points de bascule, résulte d'une stratégie de l'huître creuse visant à maximiser sa fitness en économisant de l'énergie et limitant l'acidose. Dans ce cas, cette plasticité phénotypique serait bénéfique correspondant à l'hypothèse selon laquelle *C. gigas* possède une plasticité adaptative à son milieu de vie au-dessus de son seuil de tolérance à pH 7.3-6.9. Dans notre contexte expérimental, en l'absence de prédateur, l'huître creuse adapterait alors uniquement sa réaction physiologique afin de maximiser sa fitness via la plasticité phénotypique de la coquille. Il est notable que cette diminution des paramètres de la coquille n'est associée à aucun retard de croissance significatif au-dessus de pH 7.3-6.9.

Pour conclure, il est crucial de déterminer les facteurs environnementaux influant sur la plasticité de la longueur, de l'épaisseur et du poids de la coquille puisque ces paramètres pourraient limiter la résistance de l'huître creuse à l'AO. Il serait possible de répondre à cette question de deux manières. D'une part, le pH de l'hémolymphe pourrait être évalué et la teneur en ions calciums mesurée afin de vérifier si la dissolution de la coquille permet effectivement de limiter l'acidose (Lannig et al., 2010; Michaelidis, Haas, et al., 2005a; Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005). D'autre part, l'exposition de l'huître creuse au pH pourrait se faire en présence de signaux chimiques dégagés par les prédateurs (i.e. *predator cue*) (Wright et al., 2014, 2018) afin de voir si cela influe sur les normes de réaction des paramètres de la coquille. Il serait également nécessaire de mesurer précisément la norme de réaction de l'intégrité du périostracum sur une vaste gamme de pH. En effet, même si nous avons suggéré que l'impact de l'AO sur la coquille pourrait être lié à la délamination du périostracum, nous nous sommes

basés uniquement sur des observations visuelles et sur des indicateurs moléculaires telle que l'expression des gènes liés à la tyrosinase.

II.2. L'huître perlière

La description de la plasticité phénotypique des juvéniles d'huître perlière à l'AO est schématisée sur la figure 2, résumant nos principaux résultats. Comme pour l'huître creuse, nous avons identifié le seuil de tolérance à l'AO à pH 7.3-6.9. Cela correspond aux points de bascule mesurés pour la majeure partie des paramètres macro-physiologique et moléculaire, en dessous desquels ils sont impactés par la diminution du pH. Ce résultat est étonnant chez cette espèce que nous supposons plus sensibles à l'AO de part son caractère sténoèce (Mondal, 2006; O'Connor & Lawler, 2004; Pouvreau, Tiapari, et al., 2000; Yukihiro et al., 1999). En effet, un seuil de tolérance à 7.3-6.9 ne semble pas résulter d'une plasticité adaptative à son milieu de vie en zone subtidale tropicale où il est peu probable que des valeurs de pH aussi basses soient atteintes (Chakraborty et al., 2021; Hofmann et al., 2011; Jiang et al., 2019; Kwiatkowski & Orr, 2018; Wu et al., 2018). Cela ne correspondrait donc pas aux résultats attendus en cas de plasticité adaptative d'une espèce à son environnement (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010).

Un tel seuil de tolérance chez *P. margaritifera* pose deux réflexions importantes sur les normes de réaction et l'AO. D'une part, il est possible que les normes de réaction au pH et les points de bascule ne résultent pas toujours d'une plasticité adaptative d'une espèce à son milieu de vie. Dans ce cas, un tel seuil de tolérance chez *P. margaritifera* pourrait résulter d'une longue histoire évolutive qu'il reste à déterminer. D'autre part, il est également possible qu'à l'échelle locale, certaines populations de *P. margaritifera* soient soumises à des événements extrêmes d'acidification, comme l'huître creuse. L'huître perlière possède en effet une aire de répartition extrêmement vaste s'étendant de la mer rouge, à la Californie, en passant par Madagascar et

l'Indonésie (Gervis & Sims, 1992). Dans certaines zones de l'Indonésie, par exemple, le pH peut descendre jusqu'à 7.0 selon la saison (Proum et al., 2017). De plus les populations de *P. margaritifera* sont génétiquement structurées (Reisser et al., 2019), notamment en Polynésie, ce qui pourrait résulter en des adaptations à des conditions de pH locales qui restent largement méconnues (exemple des populations des îles marquises qui vivent dans des vasques, voir Le Luyer et al., *in revision*, JAE). Il sera possible de répondre à cette question en mettant en place un suivi de pH à l'échelle locale dans les habitats de l'huître perlière. En Polynésie, la mise en place d'un tel suivi du pH a été récemment identifiée comme étant une priorité majeure pour adapter les activités aquacoles aux changements globaux (J. E. Johnson et al., 2015, 2020). Globalement, il est difficile d'interpréter les normes de réaction et points de bascule lorsque la variabilité environnementale reste inconnue (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010). Dans ce cas, cette approche reste toutefois plus adaptée que l'utilisation d'une approche par scénario. En effet, les points de bascule déterminés pourront être intégrés dans des modèles de distribution afin de prédire l'impact des changements globaux à large échelle, une fois que la variabilité environnementale sera connue (Chevin et al., 2010).

Nos résultats suggèrent une délamination du périostracum initiée par l'AO à pH 7.7, à proximité de l'umbo, ce qui pourrait avoir un impact sur l'intégrité de la coquille à plus long-terme (Le Moullac, Soyez, Latchere, et al., 2016; Le Moullac, Soyez, Vidal-Dupiol, et al., 2016). La durée d'exposition lors de nos expérimentations (16 jours) n'a toutefois pas suffi à observer des normes de réaction au pH pour la longueur, l'épaisseur et le poids de la coquille. Une exposition à plus long-terme serait donc nécessaire afin d'éclaircir ce point. De même que pour l'huître creuse, si un impact était observé sur ces paramètres morphologiques de la coquille, il faudrait déterminer si cela a un impact négatif (plasticité maladaptative) ou positif (plasticité adaptative) sur la fitness en l'absence et en présence de prédateurs.

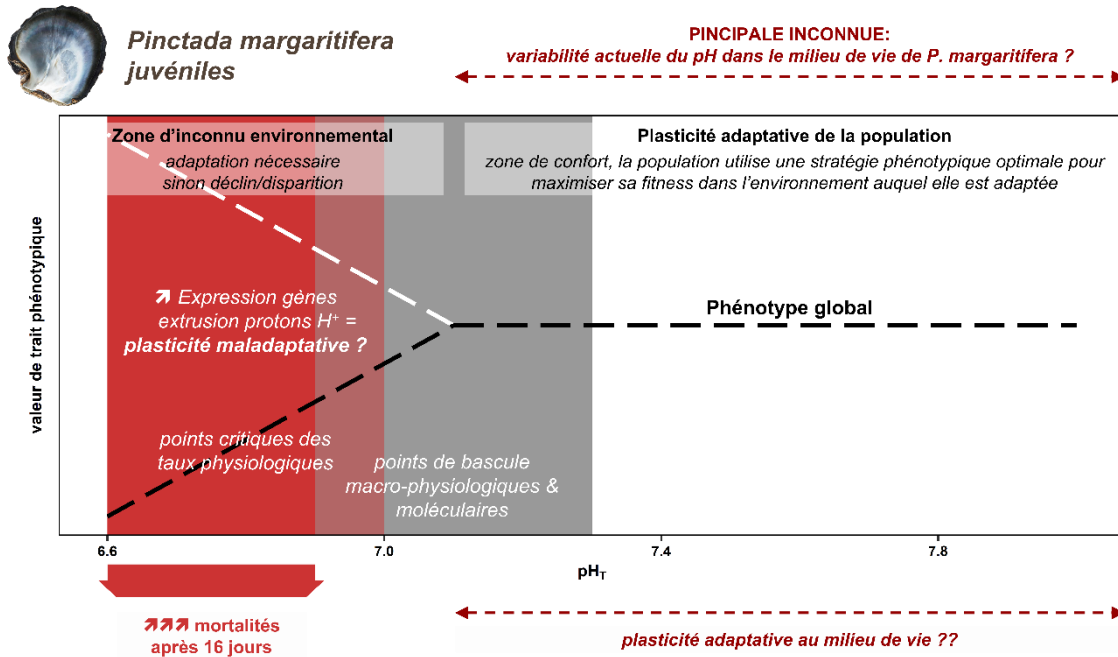


Figure 2. Plasticité phénotypique des juvéniles d’huître perlière exposées à l’acidification des océans pendant 16 jours. La courbe noire synthétise le pattern suivi par les normes de réaction au pH des taux physiologiques (calcification, ingestion), des réserves énergétiques (glucides) et de la survie. La courbe blanche synthétise les normes de réaction de l’expression des gènes liées aux transporteurs membranaires d’ion et plus particulièrement des transporteurs responsables de l’extrusion des protons H^+ .

II.3. Quelles implications pour le futur de ces deux espèces ?

Les implications de ces normes de réaction pour le futur des espèces ne seront connues qu’une fois la variabilité environnementale du pH définie par la mise en place de longues séries temporelles de mesure (Figure 1, Figure 2). Si les points de bascule sont excédés par la diminution du pH, il y aura un mismatch entre la variabilité environnementale et la plasticité phénotypique adaptative des populations. Dans ce cas, une adaptation à long-terme sera requise, résultant à terme en la sélection des génotypes les plus plastiques (Botero et al., 2015), ou en la transmission d’une plasticité transgénérationnelle via des phénomènes non-génétiques (Donelson et al., 2018). Les points de bascule et le seuil de tolérance global pourraient alors diminuer au fil des générations, les espèces devenant plus résistantes à la diminution du pH.

Cela dépendra du potentiel adaptatif de ces deux espèces qui sera davantage discuté dans la partie IV de cette discussion générale.

Un suivi environnemental du pH à long-terme sur les côtes françaises atlantiques et méditerranéennes vient d'être récemment initié par le projet COCORICO2 (« La conchyliculture dans un monde riche en CO₂ »). Les premières données sont disponibles sur le portail internet https://www.ifremer.fr/cocorico2_en/Donnees et montrent que des événements d'acidification à pH 7.0 sont pour l'instant largement minoritaires dans la plupart des écosystèmes. Même si ces événements deviennent plus fréquents, intenses et se répandent spatialement au cours de l'Anthropocène (IPCC, 2019), il est peu probable qu'ils deviennent la norme et devraient concerner des zones précises soumises notamment à des phénomènes d'hypoxie et d'eutrophisation (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). La variabilité saisonnière du pH en zones côtières tempérées fait que l'huître creuse aura des opportunités de récupérer des dommages subis sur la fitness (Gunderson et al., 2016) lorsque le pH repassera au-dessus de son seuil de tolérance à 7.3-6.9. Dans ces zones soumises à des événements d'acidification extrêmes, l'impact évolutif de l'AO dépendra alors de la capacité de récupération des organismes pour les effets survenant au-delà des points de bascule (Bednaršek et al., 2021).

III. La réduction de fitness subie en dessous des points de bascule est-elle réversible ?

Nos résultats montrent que les juvéniles d'huître creuse ne sont pas capables de compenser le retard de croissance induit par 16 jours d'exposition à des conditions de pH inférieures au point de bascule à pH 7.1. Au contraire, le retard de croissance augmente linéairement au cours du temps pendant 42 jours de récupération à pH ambiant (~8.0). Ces

résultats indiquent que l'exposition, même à court-terme, à des conditions excédant les points de bascules peut avoir des répercussions à long-terme sur la fitness des individus. Ces effets sont potentiellement irréversibles. Cela est très préoccupant pour l'avenir des huîtres dans certains écosystèmes où des conditions de pH inférieures à 7.1 peuvent déjà être observées pendant plusieurs semaines (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). En effet, la croissance au stade juvénile est un paramètre critique pour le maintien des populations permettant d'atteindre le plus rapidement possible une « taille-refuge » où l'organisme échappe à la plupart des prédateurs et peut alors investir de l'énergie dans la maturation et la reproduction (K. D. Johnson & Smee, 2012; Kulp et al., 2011; Rodriguez, 2009). Ainsi, un retard de croissance induit par une exposition courte à des pH inférieurs au point de bascule pourrait avoir des conséquences à long-terme sur la fitness des individus. Cela pourrait également retarder l'âge auquel la taille de commercialisation est atteinte (Boudry et al., 2003).

Il conviendrait également de déterminer la capacité de récupération des diminutions de longueur, épaisseur et poids de la coquille, notamment en présence de stimulus environnementaux associés à la présence de prédateurs, i.e. *predator cue*. En effet, nous avons vu dans la partie II que cette diminution pourrait éventuellement être adaptative et favorable au maintien de la fitness lorsque le pH diminue en l'absence de prédateur. En revanche, si les défenses morphologiques de la coquille ne peuvent pas être activées en présence d'un prédateur cela résulterait en une perte de fitness sur le long-terme et aurait des conséquences sur la persistance de l'huître creuse face à l'AO. Cette capacité de récupération et de réparation de la coquille peut-être très efficace chez d'autres espèces de mollusques soumis à des événements d'acidification (Gear et al., 2020; Gurr et al., 2020, 2021; Peck et al., 2018).

Chez l'huître perlière, les capacités de récupération ne devraient pas jouer un rôle important dans la réponse à l'AO. En effet, la variabilité saisonnière et interannuelle du pH est

très faible en zone tropicale subtidale (Chakraborty et al., 2021; Hofmann et al., 2011; Jiang et al., 2019; Kwiatkowski & Orr, 2018; Wu et al., 2018). Ainsi, si son seuil de tolérance est dépassé par la diminution du pH environnemental, il est peu probable qu'elle bénéficie de période de récupération. Seul un suivi environnemental du pH à long-terme nous informera sur la nécessité de s'intéresser aux capacités de récupération de l'huître perlière.

IV. La plasticité adaptative des espèces aux milieux intertidal tempéré et subtidal tropical conditionne-elle leur capacité de réponse et leur potentiel adaptatif à l'AO ?

En dessous du seuil de tolérance et des points de bascule, la plasticité phénotypique sature et ne parvient plus à limiter l'impact des changements environnementaux sur la fitness (Botero et al., 2015; Chevin et al., 2010; Gibert et al., 2019). Cela résulte souvent en une altération de l'homéostasie qui peut impacter les capacités de survie à court-terme. Une adaptation sur le long-terme sera alors requise pour éviter le déclin et l'extinction des espèces et dépendra du potentiel adaptatif des populations. Dans cette partie, nous allons discuter du potentiel adaptatif à l'AO chez l'huître creuse et l'huître perlière. Nous allons également décrire la manière dont la plasticité adaptative à leur milieu de vie, i.e. intertidal tempéré versus subtidal tropical, conditionne leurs stratégies de survie en dessous de leur seuils de tolérance à pH 7.3-6.9.

IV.1. L'huître creuse

En dessous du seuil de tolérance, les juvéniles d'huître creuse entrent en dépression métabolique caractérisée par une diminution généralisée de tous les traits phénotypiques mesurés (Figure 1). Cette stratégie de survie à court-terme vise à économiser de l'énergie afin de maintenir l'homéostasie et d'étendre la capacité de survie au maximum, le temps que les

conditions redeviennent favorables dans le milieu (Michaelidis, Haas, et al., 2005a; Michaelidis, Ouzounis, et al., 2005; Sokolova et al., 2012a). Cela permet notamment de réduire la production de protons H^+ par le métabolisme afin de ne pas aggraver l'acidose (Sokolova et al., 2012a). En condition de dépression métabolique, il est notamment attendu que l'organisme diminue le transport actif d'ions à travers les membranes, qui est l'un des processus cellulaires les plus coûteux énergétiquement (Sokolova et al., 2012a). Dans notre cas, on observe en effet une diminution de l'expression des gènes codant le transport d'ions en dessous de pH 7.3-6.9, et plus particulièrement le transport transmembranaire de cations. L'économie d'énergie est révélée par l'absence de diminution significative des réserves énergétiques glucidiques en dessous du seuil de tolérance pendant les 23 jours d'exposition. Globalement, la réaction phénotypique observée en dessous du seuil de tolérance correspond aux mécanismes mis en place lorsque l'huître creuse expérimente des phénomènes d'acidose extrême à marée basse en zone intertidale où le pH de l'hémolymphe peut descendre à 6.8 (Michaelidis, Haas, et al., 2005b) voire jusqu'à 6.0 (Charlotte Corporeau, *communication personnelle*). Dans ces conditions, elle peut bénéficier de la dissolution de la coquille afin de tamponner la chimie des carbonates et maintenir un pH interne supportable au maintien de son homéostasie (Michaelidis, Haas, et al., 2005a). Cela pourrait être également le cas dans notre étude où la dissolution de la coquille est extrême à bas pH, perforant même la coquille dans les pH inférieurs à 6.6.

Chez les juvéniles de *C. gigas*, les réactions phénotypiques observées en dessous du seuil de tolérance semblent donc être adaptatives et maximiser la fitness et la survie dans des conditions extrêmes de pH. Nous n'avons ainsi observé aucune mortalité pendant les 23 jours d'exposition. Cela a même été le cas dans les conditions les plus extrêmes inférieures à pH 6.8-6.6 où les points critiques étaient atteints résultant en une perte de longueur de la coquille, une perte de masse corporelle, une dissolution nette et un arrêt de la respiration et de l'alimentation.

Une expérience à plus long-terme, utilisant le même design expérimental, a confirmé ces résultats, les premières mortalités survenant uniquement après 42 jours d'exposition à pH 6.4 (Figure 3) (Coline Caillon, stage de Master 2).

Ces résultats nous informent sur le potentiel adaptatif de l'huître creuse à l'AO. Ainsi, la plasticité adaptative de l'huître creuse à son milieu de vie, en zone intertidale tempérée, lui permet d'augmenter considérablement sa survie à court-terme (> 42 jours) lorsque le pH excède son seuil de tolérance. Les événements extrêmes d'acidification surviennent actuellement pendant quelques jours à quelques semaines dans les écosystèmes côtiers (Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). De ce fait, même s'ils deviennent plus fréquents (IPCC, 2019), ces courtes périodes où le pH excèdera le seuil de tolérance des juvéniles ne devraient pas impacter la survie chez cette espèce permettant une adaptation sur le long-terme. Des expérimentations transgénérationnelles devront déterminer si le seuil de tolérance se déplace vers des plus bas pH au fil des générations révélant ainsi une adaptation de l'espèce à l'AO.

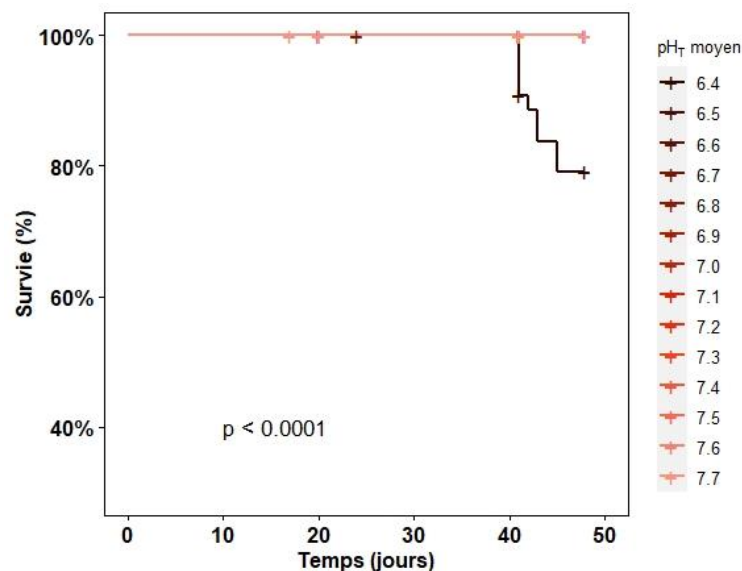


Figure 3. Survie de juvéniles d'huîtres creuses exposées à 14 conditions de pH pendant 42 jours. Les courbes de survie sont estimées à partir du modèle de Kaplan-Meier. Source : Coline Caillon, données non publiées

IV.2. L'huître perlière

Contrairement à l'huître creuse, les juvéniles d'huître perlière n'entrent pas en dépression métabolique en dessous du seuil de tolérance à pH 7.3-6.9, bien qu'on observe également une diminution des paramètres macrophysiologiques mesurés (Figure 2). En effet, sous le seuil de tolérance, *P. margaritifera* augmente l'expression des gènes liés aux transports d'ions et plus particulièrement ceux associés au maintien du gradient transmembranaire de proton H⁺ dont les ATPases transmembranaires. Ces processus sont coûteux énergétiquement (Cyronak et al., 2016; Sokolova et al., 2012a; Strader et al., 2020). De plus, les juvéniles semblent activer leur métabolisme anaérobie via l'augmentation de l'expression de gènes liés au métabolisme des lactates. Cela peut permettre de produire rapidement une grande quantité d'énergie afin d'assurer le coût du transport actif d'ions à travers les membranes (Hüning et al., 2013; Lannig et al., 2010; Sokolova, 2013; Storey et al., 2013; Zhao et al., 2020). Cela est toutefois paradoxal puisque l'anaérobiose produit des ions H⁺ qui doivent être également éliminés (Michaelidis, Haas, et al., 2005a). Cette stratégie phénotypique n'est donc pas viable sur le long-terme, en situation d'acidose, et, en conséquence, les réserves énergétiques glucidiques de l'huître perlière diminuent rapidement en dessous de pH 7.0.

Chez les juvéniles de *P. margaritifera*, les réactions phénotypiques observées en dessous du seuil de tolérance semblent donc être maladaptatives et éloigner le phénotype des valeurs optimales pour le maintien de la fitness et de la survie. Dans ce cas, l'organisme échoue à interpréter les signaux extrêmes envoyés par son environnement et qui sont inédits dans son histoire évolutive. La plasticité phénotypique devient alors maladaptative (Gibert et al., 2019). En effet, l'huître perlière vit en milieu tropical stable et ne subit pas (ou peu) l'influence des marées (Gervis & Sims, 1992; Yukihiro et al., 1999). Elle expérimente donc rarement des phénomènes d'acidose au cours de sa vie. Notre hypothèse est donc que l'huître perlière réagit

activement lorsqu'elle expérimente des phénomènes d'acidose auxquels elle n'est pas adaptée, au prix de l'épuisement de ses réserves énergétiques et d'une mort rapide. Cela se vérifie avec une augmentation rapide et massive des mortalités en dessous de pH 6.9, au bout de 16 jours.

Ces résultats nous informent sur le potentiel adaptatif de l'huître perlière à l'AO. Ainsi la plasticité phénotypique de l'huître perlière, adaptée à son milieu de vie en zone subtidale tropicale, ne lui permet pas d'endurer des phénomènes d'acidose. Cela induit de fortes mortalités à court-terme (<16 jours) lorsque le pH excède son seuil de tolérance. Cela implique que, contrairement à l'huître creuse, si le l'AO excède le seuil de tolérance des juvéniles d'huître perlière, les individus ne pourront pas survivre à court-terme et ne pourront donc probablement pas s'adapter à long-terme. Ces résultats sont donc préoccupants pour l'avenir de l'espèce et des activités économiques associées. La probabilité que des évènements d'acidification extrêmes surviennent doit donc être impérativement déterminée dans le milieu de vie de l'huître perlière par la mise en place d'un suivi temporel du pH à l'échelle locale, comme cela est déjà recommandé (J. E. Johnson et al., 2015, 2020).

V. Quels sont les mécanismes régulant la plasticité phénotypique au niveau moléculaire ?

V.1. Identification de gènes associés à la régulation de la plasticité phénotypique

Les mécanismes, génétiques et non-génétiques régulant la plasticité phénotypique au niveau moléculaire, restent méconnus et doivent être déterminés en intégrant des approches - omiques aux normes de réactions et en les associant aux observation à l'échelle macrophysiologique (Murren et al., 2015; Sommer, 2020). Dans ce travail de thèse, cela a été rendu possible en développant une méthode permettant de synthétiser de vastes jeux de données

transcriptomiques et lipidomiques et d'y détecter des points de bascule. Cette méthode nous a ainsi permis d'identifier des groupes de gènes associés à la réponse plastique des individus en dessous des points de bascule.

Ainsi, chez *C. gigas*, la plasticité phénotypique observée en dessous du seuil de tolérance correspond à la modification de l'expression de 516 gènes, montrant des points de bascule à pH 7.3-6.9 et répartis dans 3 groupes fonctionnels (i.e. 3 clusters de gènes qui covarient, identifiés par *weighted correlation network analysis*, WGCNA). Chez *P. margaritifera*, le seuil de tolérance correspond aux points de bascule dans l'expression de 106 gènes appartenant à 1 groupe fonctionnel (i.e. 1 cluster de gènes identifié par WGCNA). La mobilisation d'un grand nombre de gènes chez l'huître creuse lorsque le pH dépasse son seuil de tolérance est une réaction attendue. En effet, son génome possède un grand nombre de gènes associés à la réponse aux variations environnementales, qui peuvent être liés à son caractère euryhèce (Zhang et al., 2012). A l'inverse, les espèces évoluant dans des milieux stables peuvent avoir perdu ces gènes liés à la plasticité phénotypique et à la réponse aux variations environnementales (Murren et al., 2015). Cela pourrait expliquer que 5 fois moins de gènes soient activés chez *P. margaritifera*, qui est une espèce sténoèce, lorsque son seuil de tolérance au pH est dépassé. Dans ce cas, l'huître creuse et l'huître perlière ne disposent pas des mêmes « bagages » génétiques pour faire face à l'AO lorsque leur seuil de tolérance est dépassé. Des études génétiques plus poussées seront nécessaires pour vérifier ces suppositions. Les groupes fonctionnels de gènes que nous avons identifié, comme étant liés à la plasticité phénotypique lorsque le pH diminue, constitueront une base solide pour mener ces futures études comparatives.

V.2. Rôle des acides gras membranaires dans la réponse à l'acidification des océans

Le remodelage massif des acides gras membranaires est un pattern commun intervenant lorsque le seuil de tolérance physiologique à l'AO est atteint à pH 7.3-6.9 chez l'huître creuse et l'huître perlière. Ce pattern de réaction moléculaire, qui n'avait jamais été identifié auparavant, correspond vraisemblablement à un mécanisme majeur de maintien de l'homéostasie cellulaire dans des pH extrêmes, lorsque le seuil de tolérance est excédé. La composition des membranes en acides gras est connue pour réguler la perméabilité chimique des membranes cellulaires et l'activité des transporteurs transmembranaires d'ions et de solutés influençant ainsi le métabolisme (Hazel & Williams, 1990; Hochachka & Somero, 2002; Hulbert & Else, 1999). L'équilibre acido-basique cellulaire est également dépendant de ces transporteurs d'ions (Cyronak et al., 2016) et pourrait donc également être régulé par la composition des membranes en acides gras. Le rôle du remodelage des acides gras membranaires dans la réponse à l'AO reste à déterminer. Il pourrait être largement répandu chez les organismes calcifiants puisque nous l'avons observé dans deux contextes écologiques très différents, chez une espèce intertidale tempérée et une espèce subtidale tropicale.

V.3. Rôle de l'endocytose/exocytose, de l'ubiquitination des protéines et des acides gras membranaires dans le maintien de la calcification

Chez *P. margaritifera*, la modélisation de l'expression des gènes en fonction du taux de calcification nette nous a permis d'identifier des groupes fonctionnels de gènes impliqués dans le maintien de la calcification. Ainsi, l'huître perlière semble augmenter massivement l'expression de gènes associés aux mécanismes d'exocytose/endocytose pour maintenir la calcification au-delà de son seuil de tolérance au pH. Cela peut permettre d'induire des

processus de biominéralisation intra-vacuolaires qui sont très communs chez les foraminifères (Bentov et al., 2009; Mackinder et al., 2010) mais dont l'importance est peu étudiée dans la réponse d'autres organismes calcifiants à l'AO (Rajan et al., 2021). Dans le même temps, l'augmentation de l'expression des gènes associés à l'ubiquitination des protéines peut également être associé au maintien de la calcification chez l'huître perlière. Ce processus d'ubiquitination des protéines peut notamment favoriser la formation de vésicules (Hershko & Ciechanover, 1998; MacDonald et al., 2012), la cristallisation du carbonate de calcium (Rajan et al., 2021; J. Zhang et al., 2020) et réguler le fonctionnement des transporteurs transmembranaires (Foot et al., 2017). Le remodelage des lipides membranaires peut également être associé à la formation de vésicules (Degreif et al., 2019) et ainsi participer au maintien de la calcification. Plus particulièrement, la contribution de l'acide arachidonique à la composition des membranes augmente linéairement en dessous du seuil de tolérance chez l'huître creuse et l'huître perlière. Or, cet acide gras est un activateur de la formation de vésicules et des processus d'exocytose (Garcia-Martinez et al., 2018; Latham et al., 2007).

Il est probable que l'endocytose/exocytose et l'ubiquitination des protéines soient des processus largement répandus dans le maintien de la biominéralisation, en condition d'acidification, chez les organismes calcifiants. En effet, beaucoup d'autres études ont observé l'augmentation de l'expression de gènes associés à l'ubiquitination des protéines et l'endocytose/exocytose chez les coraux, gastéropodes et bivalves exposés à l'AO (S. L. Carroll & Coyne, 2021; Kaniewska et al., 2015; S. Li et al., 2017b; S. Li, Liu, et al., 2016; Rajan et al., 2021). En revanche, les auteurs n'ont pas discuté de la potentielle implication de ces processus dans la biominéralisation.

VI. Zones d'ombre & perspectives

VI.1. Quels sont les mécanismes de réponse à l'AO au niveau de l'organe et du tissu ?

La plasticité phénotypique peut s'exprimer différemment en fonction du tissu ou de l'organe étudié. Ainsi, la dépression métabolique dans un tissu pourrait éventuellement être compensée par un métabolisme plus actif dans un autre tissu (Lannig et al., 2010). Les points de bascule physiologiques pourraient donc être différents selon l'organe étudié avec des trade-offs métaboliques complexes selon leur fonction dans la réponse physiologique globale à l'AO. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé une approche non ciblée, à l'échelle globale de l'organisme, qui complique également l'identification de mécanismes de réponses à l'AO à l'échelle cellulaire. Par exemple, les gènes que nous avons identifiés comme étant liés à la régulation de la calcification sont également impliqués dans la régulation d'un grand nombre d'autres voies métaboliques. Ainsi, l'ubiquitination des protéines joue un rôle clé dans le catabolisme et la réparation des dommages cellulaires causés par l'AO (S. Li et al., 2017b; S. Li, Liu, et al., 2016). Afin de pouvoir identifier les mécanismes de régulation de la calcification à fine échelle, il pourrait, par exemple, être intéressant de déterminer les normes de réactions aux pH dans le manteau, tissu responsable de la calcification, en lien avec des observations macro-physiologiques sur la structure de la coquille. Pour ce faire, il serait possible de s'inspirer d'approches innovantes telles que celles développées récemment par Rajan et al. (2021) et Yarra et al. (2021).

Rajan et al. (2021) ont suivi l'évolution de la méthylation et de l'expression des gènes du manteau chez l'huître hongkongaise *Crassostrea hongkongensis* exposée à pH 8.0 et 7.4 pendant 136 jours et l'ont associé à un suivi de l'arrangement cristallin et de la résistance de la

coquille. Les résultats de cette étude ont permis de démontrer que l'AO constitue un problème de dissolution de la coquille, mais pas de maintien de la calcification, chez les mollusques. Yarra et al. (2021) ont utilisé une méthode plus ciblée qui a consisté à percer la coquille de la moule *M. edulis* et du pectinidé *Pecten maximus* puis à suivre l'expression des gènes dans la région du manteau au contact direct de la blessure tout au long du processus de réparation. Cela a permis de constituer une « biomineralization toolbox » identifiant les différents gènes activés tout au long du processus de réparation. L'intégration de telles méthodes à l'établissement de normes de réaction sur une large gamme de pH pourrait produire des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes de réponse de la calcification à l'AO.

VI.2. Quel est l'impact de l'ontogénie sur la plasticité phénotypique des huîtres ?

Les coûts induits et constitutif de la plasticité phénotypique varient avec l'ontogénie (Donelson et al., 2018; Murren et al., 2015) et les points de bascule pour les différents traits phénotypiques ne seront donc pas les mêmes en fonction du stade de vie (Botero et al., 2015). Chez les mollusques coquilliers, il est admis que le stade larvaire est le plus sensible à l'AO (voir Gazeau et al., 2013 pour revue). Cela est notamment lié à la formation de la première coquille calcifiée, i.e. *prodissoconch*, au stade larve D qui peut être malformée sous l'effet de l'AO réduisant la capacité des larves à se mouvoir, s'alimenter et survivre. Des anomalies de développement à ce stade se répercutent alors tout au long de la vie de l'individu et peuvent difficilement être compensées (Gazeau et al., 2013; Parker et al., 2013). Il est donc important de déterminer les normes de réaction au pH aux différents stades du cycle de vie, et plus particulièrement au stade larvaire.

Dans une étude complémentaire dont les résultats sont en cours d'analyse, nous avons déterminé les normes de réaction au stade larvaire chez l'huître creuse. Nous avons identifié

des points de bascule à pH 7.7-7.5 en dessous duquel les larves D subissent des anomalies de développement et une réduction de croissance (Figure 4). La littérature sur les larves d'huître creuse concorde avec ces résultats préliminaires. En effet, lorsque le pH est diminué en dessous de 7.7-7.5, les auteurs observent un impact sur la survie, les anomalies de développement, la croissance, l'allongement du stade larvaire, le métabolisme et la calcification chez les larves d'huître creuse (Barros et al., 2013; De Wit et al., 2018; Dineshram et al., 2012, 2015; Durland et al., 2019; Frieder et al., 2017, 2018; Kurihara et al., 2007; Timmins-Schiffman et al., 2013). Les zones côtières tempérées sont soumises à une forte variabilité environnementale saisonnière et interannuelle du pH (Barton et al., 2012; Waldbusser et al., 2015; Waldbusser & Salisbury, 2014). Le succès du recrutement larvaire dépendra donc du match/mismatch des conditions environnementales avec le pH favorable au développement larvaire, comme cela a déjà été constaté pour l'huître creuse (Barton et al., 2012; Waldbusser et al., 2015; Waldbusser & Salisbury, 2014). Selon nos résultats préliminaires, pour que le recrutement ne soit pas impacté, il faudra que le pH environnemental soit supérieur à 7.7-7.5 dans le milieu naturel, correspondant aux points de bascules pour la croissance et les anomalies de développement. L'analyse des autres résultats nous permettra de compléter les normes de réaction au pH chez les larves d'huître creuse et de définir leur seuil de tolérance global.

La détermination des normes de réaction aux différents stades du cycle de vie permettra d'adapter la zootechnie afin de minimiser les effets de l'AO sur les activités aquacoles. Ainsi, en éclosion le pH pourra être maintenu artificiellement au-dessus de 7.7-7.5 afin de supprimer l'effet de l'AO sur le développement larvaire. En effet, la régulation du pH est déjà appliquée avec succès pour améliorer le recrutement larvaire dans certaines éclosions (Barton et al., 2015). Une fois la variabilité environnementale connue, il sera possible d'organiser des transferts de juvéniles afin d'éviter l'exposition à des conditions de pH inférieures à 7.3-6.9

dans des zones sensibles, pendant les événements extrêmes d'acidification. Une fois les normes de réaction au pH établies au stade adulte, le conditionnement des géniteurs et la reproduction pourront être contrôlés dans des bassins à terre afin d'empêcher l'influence de l'AO sur la gamétogénèse et la fécondation.

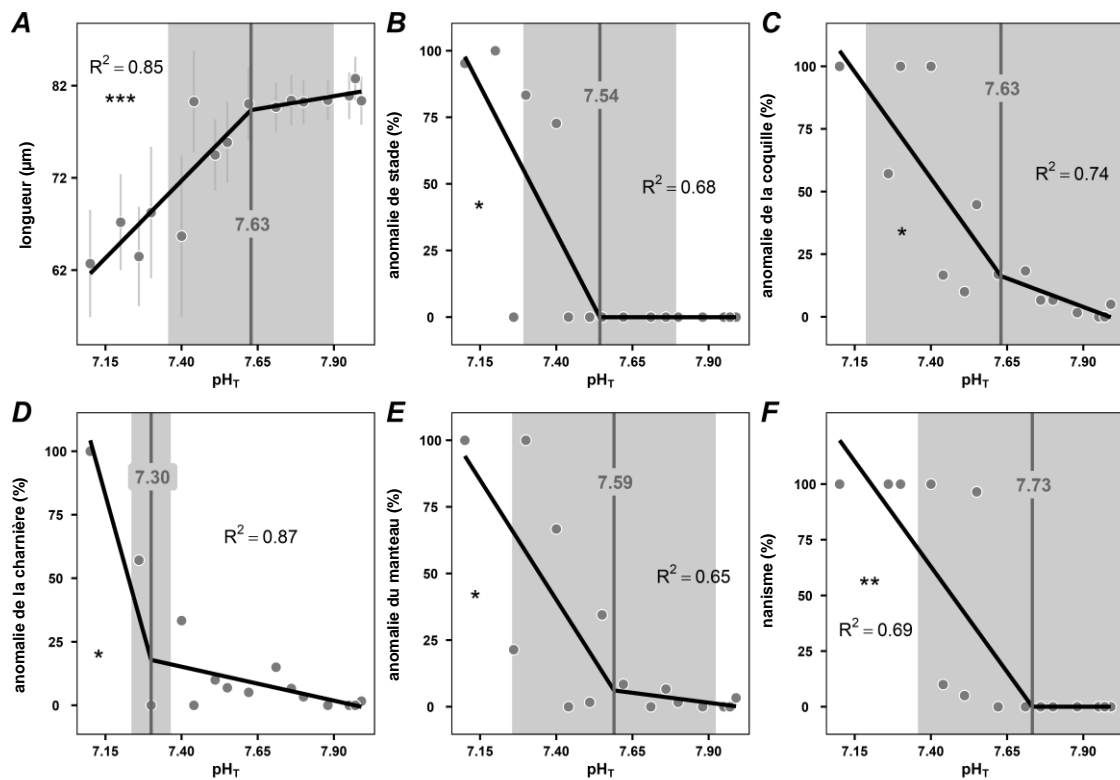


Figure 4. Points de bascule physiologiques dans la croissance et le développement de larves D d'huîtres creuses exposées à l'acidification des océans. (A) longueur, (B) pourcentage de larves n'ayant pas atteint le stade larve-D, (C) malformations de la coquille, (D) malformations de la charnière de la coquille, (E) malformations du manteau et (F) nanisme (retard de croissance). Les données sont des moyennes ± écart-types quand cela est possible. Le point de bascule et son intervalle de confiance à 95% sont représentés en gris. Le niveau de significativité des pentes est représenté à l'aide de symboles ($p < 0.001$ ***, < 0.01 **, < 0.05 *, < 0.1 ·).

VI.3. La plasticité phénotypique est-elle différente chez d'autres populations d'huîtres ?

La plasticité phénotypique exprimée par un individu dépend par définition de son génotype (DeWitt & Scheiner, 2004). Ainsi, la plasticité phénotypique peut varier chez différentes populations génétiquement différenciées d'une espèce évoluant dans une mosaïque d'habitats constituée d'une multitude de conditions de pH, i.e. plasticité adaptative (Vargas et al., 2017). Cette plasticité adaptative peut résulter en des points de bascule et normes de réaction différentes chez plusieurs populations d'une même espèce (Hutchings, 2011). L'huître creuse est une espèce faiblement structurée génétiquement de part les nombreux échanges associés aux pratiques aquacoles entre les différents océans et habitats (Meistertzheim et al., 2013; Sutherland et al., 2020). Les points de bascule physiologiques identifiés dans ce travail de thèse doivent donc être valides pour la majorité des populations d'huître creuse, au moins au niveau Européen. Certaines études viennent toutefois nuancer ce propos et identifient, par exemple, des différences de tolérance à l'OA entre différentes lignées d'huître creuse sélectionnées pour l'aquaculture (Durland et al., 2019). Il serait intéressant de comparer les normes de réaction de ces différentes lignées afin de voir si les points de bascules au pH sont différents et si certaines ont développé une résistance à l'AO. L'huître perlière est structurée génétiquement (Reisser et al., 2019) et des études supplémentaires devront donc déterminer si les points de bascule au pH sont différents chez d'autres populations différenciées.

VI.4. Les normes de réaction peuvent-elles évoluer sur plusieurs générations ?

Les normes de réaction sont hérissables et les points de bascule peuvent donc évoluer selon la pression de sélection exercée par le milieu (Bitter et al., 2021; Botero et al., 2015;

Chevin et al., 2010; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). Si des évènements extrêmes d'acidification dépassent le seuil de tolérance à l'AO dans l'environnement de l'huître creuse et de l'huître perlière, leurs impacts sur la fitness induiront une sélection des normes de réaction les plus adaptées dans la population. Les points de bascule pourraient alors évoluer au cours des générations, augmentant potentiellement la capacité de tolérance de ces espèces à l'AO. Nous avons vu que le potentiel adaptatif de *P. margaritifera* était limité et qu'il est peu probable que sa tolérance puisse être améliorée par sélection (voir partie IV de la discussion générale). En revanche, *C. gigas* semble avoir un potentiel adaptatif plus important à l'AO. Ces suppositions devront être déterminées en exposant les individus sur plusieurs générations et en évaluant l'évolution des points de bascule. Il faudra également étudier la transmission de la plasticité phénotypique par des phénomènes non génétiques (épigénétique, effet maternel) qui pourraient influencer les points de bascule (Donelson et al., 2018).

VI.5. Quels seraient les effets de stress additionnels sur les normes de réaction ?

Dans l'environnement, la valeur optimale d'un trait phénotypique pour la fitness d'un organisme dépend de la pression de sélection exercée par plusieurs facteurs environnementaux (DeWitt & Scheiner, 2004). La norme de réaction d'un caractère phénotypique résulte donc d'un trade-off évolutif afin de maximiser la fitness globale d'un individu. Les normes de réaction seront ainsi multidimensionnelles si plusieurs changements environnementaux ont lieu dans le milieu (Chevin et al., 2010). Cela peut impliquer la présence de plusieurs points de bascule et pente, compliquant drastiquement l'interprétation des résultats observés.

Dans l'anthropocène, l'AO interagit avec d'autres facteurs physico-chimiques qui peuvent avoir des effets antagonistes ou additifs sur la physiologie des organismes (Gunderson et al., 2016; Sokolova, 2013). Il sera donc primordial d'étudier la manière dont évoluent les

points de bascule physiologique dans un environnement complexe et multidimensionnel. Il est par exemple bien connu que les évènements d'acidification extrêmes sont associés à des phénomènes d'hypoxie, d'eutrophisation ou de dessalure (Frankignoulle et al., 1996; Melzner et al., 2013; Wallace et al., 2014). Un exemple d'interaction est que l'AO peut diminuer la tolérance thermique des organismes exposés au réchauffement des océans avec un potentiel impact sur la répartition géographique des espèces (Walther et al., 2009). La température peut modifier les points de bascule physiologiques et rendre les bivalves plus vulnérables à la diminution du pH (Bamber, 1990). La disponibilité en nourriture joue un rôle clé dans le maintien de la calcification lorsque le pH diminue (Leung et al., 2019; Thomsen et al., 2013). Ces facteurs additionnels doivent donc être pris en compte afin de prédire l'avenir des espèces dans un monde changeant.

L'effet d'un stress environnemental sur la physiologie des individus est dose-dépendant et dépend en grande partie du temps d'exposition (Calabrese et al., 2007). Cet effet de dose peut ainsi avoir un effet sur les normes de réaction (Chevin et al., 2010). Une manière de le prendre en compte dans notre expérience aurait été de mettre en place un suivi à haute fréquence du pH dans les bacs d'huîtres. Il aurait ensuite été possible d'intégrer la variation du pH au cours du temps afin d'exprimer une dose d'exposition en pH jour^{-1} . Les normes de réaction au pH jour^{-1} auraient ensuite pu être déterminées.

Pour étudier au mieux la plasticité phénotypique, il faudrait donc établir des normes de réaction via des modèles de régression multiple intégrant l'effet du temps et de multiples facteurs environnementaux (Chevin et al., 2010; Chevin & Lande, 2013). Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons développé une méthode qui permet de déterminer les points de bascule dans l'évolution du poids de l'huître en fonction du temps (facteur 1) et du pH (facteur 2). Il serait possible d'utiliser la même méthode afin d'établir la norme de réaction des organismes

en fonction du pH (facteur 1) et d'un stress additionnel tel que la température (facteur 2). L'effet du temps pourrait alors être intégré au modèle en exprimant les facteurs en pH j^{-1} et $^{\circ}\text{C j}^{-1}$. Les possibilités sont multiples et demandent à être explorées.

VII. Réflexions personnelles

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu développer quelques réflexions et établir des constatations qu'il me semble important de partager ici. En effet, elles permettent de dégager des pistes importantes pour améliorer nos connaissances sur la sensibilité des espèces à l'AO.

Le pH environnemental doit être mesuré à l'échelle locale afin de pouvoir interpréter les résultats des normes de réaction et leurs implications pour le potentiel adaptatif des espèces à l'AO. Toutefois, l'établissement de séries temporelles de mesures de pH est un long processus qui prendra des dizaines d'années avant d'être complété (Wanninkhof et al., 2015). L'AO est un phénomène extrêmement rapide et les changements se produisant à l'échelle de décennie au cours du XXI^e siècle équivalent à ceux intervenant habituellement sur des dizaines de milliers d'années (Caldeira & Wickett, 2003). La recherche ne peut donc pas attendre l'établissement de longues séries temporelles pour déterminer la sensibilité des organismes marins à l'AO et permettre l'établissement de mesures de conservation.

Les normes de réaction au pH doivent être établies car elles s'affranchissent de nos connaissances sur la variabilité environnementale de l'acidification. Elles sont donc les plus adaptées à la poursuite de l'effort de recherche. En effet, elles permettent d'accumuler des résultats sur les seuils de tolérance et le potentiel adaptatif des espèces à la diminution du pH. Ces données sont intemporelles et permettront d'alimenter des modèles de projection sur l'avenir des populations à l'échelle locale, au fur et à mesure que nos connaissances environnementales progressent. Cela permettra d'anticiper l'impact des changements environnementaux et de motiver des décisions politiques de conservation des espèces, des

écosystèmes et des activités économiques dans un monde riche en CO₂. La recherche sur l'AO pourra alors se poursuivre indépendamment des progrès de l'océanographie côtière dont elle dépend pour le moment via l'utilisation des approches scénario (Vargas et al., 2017).

La détermination de normes de réaction au pH pourrait permettre d'adapter l'utilisation des scénario. Il sera toujours préférable d'établir des normes de réaction sur une large gamme de variabilité environnementale, plutôt que d'exposer des organismes à seulement quelques conditions, pour déterminer le potentiel adaptatif des espèces aux changements environnementaux (Bitter et al., 2021; Chevin et al., 2010; Chevin & Lande, 2013; Gibert et al., 2019; Gotthard & Nylin, 1995; Hutchings, 2011). En effet, les approches scénario sont un sous échantillonnage des normes de réaction dont elles ne permettent pas d'apprécier la forme, et qui sont basées sur des à-priori environnementaux qui s'avèrent bien souvent incorrects (Chevin et al., 2010). L'établissement de normes de réaction holistiques est toutefois complexe et nécessite le maintien d'organismes dans une quinzaine, voire plusieurs dizaines, de conditions environnementales. Cela pose des contraintes financières, matérielles et logistiques importantes et difficiles à surmonter. De plus, ces contraintes seront de plus en plus fortes à mesure que les normes de réaction se complexifieront avec l'intégration des multistress et des effets transgénérationnels. Il convient donc de déterminer des méthodes alternatives permettant d'alléger ces contraintes et de ne pas limiter l'effort de recherche. D'après moi, il serait possible d'utiliser dans un premier temps les normes de réaction pour identifier le seuil de tolérance et la zone d'inconnu environnemental au-delà de laquelle l'espèce doit s'adapter. Il serait ensuite possible de sélectionner quelques conditions environnementales clés telles que par exemple le pH dans la zone d'optimum physiologique, le pH au seuil de tolérance, le pH aux points critiques et quelques conditions intermédiaires. Ces conditions pourront ensuite être utilisées dans des

approches classiques, de type « scénario », avec des répliques, afin d'étudier l'évolution de la sensibilité des espèces en condition de multistress et sur plusieurs générations.

Il est nécessaire d'établir un consensus terminologique sur les normes de réaction et les points de bascule. En effet, au cours de mes recherches bibliographiques, j'ai constaté la présence d'une dizaine de termes différents pour définir les mêmes concepts que sont les points de bascules et régressions linéaires segmentées. Cela complique la mutualisation des résultats entre les différents domaines de recherche sur les changements globaux puisque les publications d'intérêt sont difficiles à identifier. De même, il n'existe pas de définition unique des point de bascule, points critique et seuil de tolérance compliquant l'étude de ces concepts.

BILAN DE LA THESE

I. Publications

Publié (1)

Lutier, M., Di Poi, C., Gazeau, F., Appolis, A., Le Luyer, J., & Pernet, F., 2022. « Revisiting tolerance to ocean acidification: insights from a new framework combining physiological and molecular tipping points of Pacific oyster ». *Global Change Biology*, 28(10), 3333-3348, <https://doi.org/10.1111/gcb.16101>

En préparation (3)

Lutier, M., Pernet, F., & Di Poi, C., *in prep.* « Is the tipping point a point of no return for oyster growth under ocean acidification ? ».

Lutier, M., Pernet, F., Briandy, A., Le Grand J., Belliard C., Quéré C., Le Roy V., Vanaa, V., Di Poi, C., Le Luyer, J., *in prep.* « Identify new mechanisms involved in the response of calcifiers to ocean acidification through the holistic determination of tipping points in the pearl oyster ».

Lutier, M., Pernet, F., & Di Poi, C., *in prep.* « Assessing physiological tipping points of Pacific oyster larvae exposed to ocean acidification ».

II. Présentations orales à des conférences nationales



Colloque d'Ecophysiologie Animale, 4^e édition (CEPA4), Rennes, Octobre 2019.



Journées de la recherche en Polynésie Française, Université de la Polynésie Française, Puna'auia, Tahiti, Janvier 2020

III. Enseignements



Université de Bretagne Occidentale, Faculté des Sciences , Brest. 64 heures de TP/TD sur l'année universitaire 2020-2021 en :

- Biologie animale
- Biologie Végétale
- Ecologie
- Embryologie

IV. Encadrement de stages



Alexis Appolis, Licence 3, Université de la Rochelle, « Identification du pH seuil perturbant la structure de la coquille chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ». Avril-mai 2019



Klervi Lugué, Master 2, Universidade do Algarve, « Estimation of the pH threshold affecting the shell formation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ». Novembre-décembre 2019



Coline Caillon, Master 2, Sorbonne université, « Caractérisation des normes de réaction physiologique de l’huître creuse *Crassostrea gigas* et de l’huître plate *Ostrea edulis* exposées à une large gamme de pH. Janvier-mai 2020



Rannou Maxime, Licence 3, Université de Bretagne Occidentale, « Détermination du pH seuil perturbant la structure des coquilles d’huitres perlières (*Pinctada margaritifera*) par une approche en tipping-point ». Mars-avril 2021



Julie Landier, Licence 2, Université Paris-Saclay, « Plasticité de la coquille de l’huître creuse à l’acidification des océans ». Avril-mai 2021

V. Sciences et sociétés



Fête de la science, 2019, Brest.

REFERENCES

-A-

- Alagarwami, K., Dharmaraj, S., Chellam, A., & Velayudhan, T. S. (1989). Larval and juvenile rearing of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). *Aquaculture*, 76(1–2), 43–56.
- Ali, M., Nicieza, A., & Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4(2), 147–190. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x>
- Alma, L., Kram, K. E., Holtgrieve, G. W., Barbarino, A., Fiamengo, C. J., & Padilla-Gamiño, J. L. (2020). Ocean acidification and warming effects on the physiology, skeletal properties, and microbiome of the purple-hinge rock scallop. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 240, 110579. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110579>
- Aminot, A., & K  rouel, R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines* (MEDD, Editions Quae). Ifremer. <https://www.quae.com/produit/924/9782759200238/dosage-automatique-des-nutriments-dans-les-eaux-marines>
- Asmus, R. M., & Asmus, H. (1991). Mussel beds: Limiting or promoting phytoplankton? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 148(2), 215–232.
- Aubret, F., & Shine, R. (2010). Fitness costs may explain the post-colonisation erosion of phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 735–739. <https://doi.org/10.1242/jeb.040576>
- Auzoux-Bordenave, S., Wessel, N., Badou, A., Martin, S., M’Zoudi, S., Avignon, S., Roussel, S., Huchette, S., & Dubois, P. (2019). Ocean acidification impacts growth and shell

mineralization in juvenile abalone (*Haliotis tuberculata*). *Marine Biology*, 167(1), 11.
<https://doi.org/10.1007/s00227-019-3623-0>

-B-

Bamber, R. N. (1987). The effects of acidic sea water on young carpet-shell clams *Venerupis decussata* (L.) (Mollusca: Veneracea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 108(3), 241–260. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90088-8)

Bamber, R. N. (1990). The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 143(3), 181–191.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(90\)90069-O](https://doi.org/10.1016/0022-0981(90)90069-O)

Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chícharo, L., & Matias, D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 440, 200–206.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.12.014>

Barton, A., Hales, B., Waldbusser, G. G., Langdon, C., & Feely, R. A. (2012). The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, shows negative correlation to naturally elevated carbon dioxide levels: Implications for near-term ocean acidification effects. *Limnology and Oceanography*, 57(3), 698–710. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.3.0698>

Barton, A., Waldbusser, G. G., Feely, R. A., Weisberg, S. B., Newton, J. A., Hales, B., Cudd, S., Eudeline, B., Langdon, C. J., & Jefferds, I. (2015). Impacts of coastal acidification on the Pacific Northwest shellfish industry and adaptation strategies implemented in response. *Oceanography*, 28(2), 146–159.

Bayne, B. L. (2017). *Biology of Oysters* (Vol. 41). Academic Press.

Bednaršek, N., Calosi, P., Feely, R. A., Ambrose, R., Byrne, M., Chan, K. Y. K., Dupont, S., Padilla-Gamiño, J. L., Spicer, J. I., Kessouri, F., Roethler, M., Sutula, M., & Weisberg,

- S. B. (2021). Synthesis of Thresholds of Ocean Acidification Impacts on Echinoderms. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.602601>
- Bednaršek, N., Feely, R. A., Howes, E. L., Hunt, B. P. V., Kessouri, F., León, P., Lischka, S., Maas, A. E., McLaughlin, K., Nezhlin, N. P., Sutula, M., & Weisberg, S. B. (2019). Systematic Review and Meta-Analysis Toward Synthesis of Thresholds of Ocean Acidification Impacts on Calcifying Pteropods and Interactions With Warming. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00227>
- Ben Kheder, R., Quéré, C., Moal, J., & Robert, R. (2010). Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices: Part B: Effects of temporary food deprivation. *Aquaculture*, 308(3), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.030>
- Benner, I., Diner, R. E., Lefebvre, S. C., Li, D., Komada, T., Carpenter, E. J., & Stillman, J. H. (2013). *Emiliana huxleyi* increases calcification but not expression of calcification-related genes in long-term exposure to elevated temperature and p CO₂. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1627), 20130049.
- Bentov, S., Brownlee, C., & Erez, J. (2009). The role of seawater endocytosis in the biomineralization process in calcareous foraminifera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21500–21504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906636106>
- Bitter, M. C., Wong, J. M., Dam, H. G., Donelan, S. C., Kenkel, C. D., Komoroske, L. M., Nickols, K. J., Rivest, E. B., Salinas, S., & Burgess, S. C. (2021). Fluctuating selection and global change: A synthesis and review on disentangling the roles of climate amplitude, predictability and novelty. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1957), 20210727.

- Bohman, V. R. (1955). Compensatory growth of beef cattle: The effect of hay maturity. *Journal of Animal Science*, *14*(1), 249–255.
- Bonamour, S., Chevin, L.-M., Charmantier, A., & Teplitsky, C. (2019). Phenotypic plasticity in response to climate change: The importance of cue variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1768), 20180178.
- Botero, C. A., Weissing, F. J., Wright, J., & Rubenstein, D. R. (2015). Evolutionary tipping points in the capacity to adapt to environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(1), 184–189.
- Boudry, P., Collet, B., McCombie, H., Ernande, B., Morand, B., Heurtebise, S., & Gerard, A. (2003). Individual growth variation and its relationship with survival in juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture International*, *11*(5), 429–448.
- Boulais, M., Chenevert, K. J., Demey, A. T., Darrow, E. S., Robison, M. R., Roberts, J. P., & Volety, A. (2017). Oyster reproduction is compromised by acidification experienced seasonally in coastal regions. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9.
- Boulais, M., Suquet, M., Arsenault-Pernet, E. J., Malo, F., Queau, I., Pignet, P., Ratiskol, D., Le Grand, J., Huber, M., & Cosson, J. (2018). PH controls spermatozoa motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, *7*(3), bio031427. <https://doi.org/10.1242/bio.031427>
- Boyd, P. W., Cornwall, C. E., Davison, A., Doney, S. C., Fourquez, M., Hurd, C. L., Lima, I. D., & McMinn, A. (2016). Biological responses to environmental heterogeneity under future ocean conditions. *Global Change Biology*, *22*(8), 2633–2650. <https://doi.org/10.1111/gcb.13287>
- Bradshaw, A. D. (1959). Population differentiation in *Agrostis tenuis* Sibth: I. Morphological differentiation. *New Phytologist*, *58*(2), 208–227.

- Brainerd, E. L. (1994). Pufferfish inflation: Functional morphology of postcranial structures in *Diodon holocanthus* (Tetraodontiformes). *Journal of Morphology*, 220(3), 243–261.
- Bressan, M., Chinellato, A., Munari, M., Matozzo, V., Mancini, A., Marčeta, T., Finos, L., Moro, I., Pastore, P., Badocco, D., & Marin, M. G. (2014). Does seawater acidification affect survival, growth and shell integrity in bivalve juveniles? *Marine Environmental Research*, 99, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.04.009>
- Brodie, J. F., Aslan, C. E., Rogers, H. S., Redford, K. H., Maron, J. L., Bronstein, J. L., & Groves, C. R. (2014). Secondary extinctions of biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(12), 664–672.
- Brooks, C. (1999). *Is the laboratory growth of Pacific oyster spat, Crassostrea gigas, exposed to varying salinities, predictive of their growth in the estuary?*
- Browman, H. I. (2017). Towards a broader perspective on ocean acidification research. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), 889–894. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsx073>
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., & Gouilletquer, P. (2009). History, status, and future of oyster culture in France. *Journal of Shellfish Research*, 28(4), 813–820.
- Byrne, M., & Fitzner, S. (2019). The impact of environmental acidification on the microstructure and mechanical integrity of marine invertebrate skeletons. *Conservation Physiology*, 7(1), coz062. <https://doi.org/10.1093/conphys/coz062>

-C-

- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M. G., Chiueh, C. C., & Clarkson, T. W. (2007). Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 122–128.

- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, *425*(6956), 365–365. <https://doi.org/10.1038/425365a>
- Calosi, P., Putnam, H. M., Twitchett, R. J., & Vermandele, F. (2019). Marine metazoan modern mass extinction: Improving predictions by integrating fossil, modern, and physiological data. *Annual Review of Marine Science*, *11*, 369–390.
- Carrier-Belleau, C., Pascal, L., Nozais, C., & Archambault, P. (2022). Tipping points and multiple drivers in changing aquatic ecosystems: A review of experimental studies. *Limnology and Oceanography*, *67*(S1), S312–S330. <https://doi.org/10.1002/lno.11978>
- Carroll, J. L., & Wells, R. M. (1995). Strategies of anaerobiosis in New Zealand infaunal bivalves: Adaptations to environmental and functional hypoxia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, *29*(2), 137–146.
- Carroll, S. L., & Coyne, V. E. (2021). A proteomic analysis of the effect of ocean acidification on the haemocyte proteome of the South African abalone *Haliotis midae*. *Fish & Shellfish Immunology*, *117*, 274–290. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.008>
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (2020). Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(24), 13596–13602.
- Chadwick, M., Harper, E. M., Lemasson, A. J., Spicer, J. I., & Peck, L. S. (2019). Quantifying susceptibility of marine invertebrate biocomposites to dissolution in reduced pH. *Royal Society Open Science*, *6*(6), 190–252. <https://doi.org/10.1098/rsos.190252>
- Chakraborty, K., Valsala, V., Bhattacharya, T., & Ghosh, J. (2021). Seasonal cycle of surface ocean pCO₂ and pH in the northern Indian Ocean and their controlling factors. *Progress in Oceanography*, *198*, 102683. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2021.102683>

- Chan, K. Y. K., & Tong, C. S. D. (2020). Temporal variability modulates pH impact on larval sea urchin development. *Conservation Physiology*, 8(1), coaa008. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa008>
- Chevin, L.-M., & Lande, R. (2013). Evolution of discrete phenotypes from continuous norms of reaction. *The American Naturalist*, 182(1), 13–27.
- Chevin, L.-M., Lande, R., & Mace, G. M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. *PLoS Biology*, 8(4), e1000357.
- Churchill, F. B. (1974). William Johannsen and the genotype concept. *Journal of the History of Biology*, 5–30.
- Clark, M. S. (2020). Molecular mechanisms of biomineralization in marine invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 223(11). <https://doi.org/10.1242/jeb.206961>
- Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Amaral, A., Vieira, F., Batista, F. M., Reis, J., & Power, D. M. (2013). Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and Evolution*, 3(10), 3283–3297. <https://doi.org/10.1002/ece3.719>
- Coen, L., Brumbaugh, R. D., Bushek, D., Grizzle, R., Luckenbach, M., & al, et. (2007). Ecosystem services related to oyster restoration. *Marine Ecology Progress Series*, 341, 303–307.
- Coleman, D., Byrne, M., & Davis, A. (2014). Molluscs on acid: Gastropod shell repair and strength in acidifying oceans. *Marine Ecology Progress Series*, 509, 203–211. <https://doi.org/10.3354/meps10887>
- Collard, M., Eeckhaut, I., Dehairs, F., & Dubois, P. (2014). Acid–base physiology response to ocean acidification of two ecologically and economically important holothuroids from

- contrasting habitats, *Holothuria scabra* and *Holothuria parva*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(23), 13602–13614.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichefet, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W. J., Johns, T., & Krinner, G. (2013). Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. In *Climate Change 2013-The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1029–1136). Cambridge University Press.
- Comeau, S., Edmunds, P. J., Spindel, N. B., & Carpenter, R. C. (2013). The responses of eight coral reef calcifiers to increasing partial pressure of CO₂ do not exhibit a tipping point. *Limnology and Oceanography*, 58(1), 388–398. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.1.0388>
- Corliss, B. H., & Honjo, S. (1981). Dissolution of deep-sea benthonic foraminifera. *Micropaleontology*, 356–378.
- Crutzen, P. J. (2006). The “anthropocene.” In *Earth system science in the anthropocene* (pp. 13–18). Springer.
- Crutzen, P. J., & Stoermer, E. F. (2000). The “Anthropocene.” *Global Change Newsletter*, 41(17).
- Cunha, S. R., & Mohler, P. J. (2011). Ankyrin-based cellular pathways for cardiac ion channel and transporter targeting and regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(2), 166–170.
- Cyronak, T., Schulz, K. G., & Jokiel, P. L. (2016). The Omega myth: What really drives lower calcification rates in an acidifying ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3), 558–562. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv075>

-D-

- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. (Vol. 2). Books, Incorporated, Pub.
- Davis, R. (2011). Inventing the present: Historical roots of the Anthropocene. *Earth Sciences History*, 30(1), 63–84.
- Dawkins, R. (1982). *The extended phenotype: The gene as the unit of selection*.
- de Paiva, J. N. S., Walles, B., Ysebaert, T., & Bouma, T. J. (2018). Understanding the conditionality of ecosystem services: The effect of tidal flat morphology and oyster reef characteristics on sediment stabilization by oyster reefs. *Ecological Engineering*, 112, 89–95.
- De Wit, P., Durland, E., Ventura, A., & Langdon, C. J. (2018). Gene expression correlated with delay in shell formation in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to experimental ocean acidification provides insights into shell formation mechanisms. *BMC Genomics*, 19(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4519-y>
- Degreif, D., Cucu, B., Budin, I., Thiel, G., & Bertl, A. (2019). Lipid determinants of endocytosis and exocytosis in budding yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(7), 1005–1016.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., & Samain, J.-F. (2003). Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species—*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*, 206(17), 3053–3064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00518>
- DeWitt, T. J., & Scheiner, S. M. (2004). *Phenotypic plasticity: Functional and conceptual approaches*. Oxford University Press.

- DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(2), 77–81.
- Dickson, A. G., Sabine, C. L., & Christian, J. R. (2007). *Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements* (PICES Special Publication 3). North Pacific Marine Science Organization. https://www.ncei.noaa.gov/access/ocean-carbon-data-system/oceans/Handbook_2007.html
- Dineshram, R., Q., Q., Sharma, R., Chandramouli, K., Yalamanchili, H. K., Chu, I., & Thiyagarajan, V. (2015). Comparative and quantitative proteomics reveal the adaptive strategies of oyster larvae to ocean acidification. *PROTEOMICS*, *15*(23–24), 4120–4134. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500198>
- Dineshram, R., Wong, K. K., Xiao, S., Yu, Z., Qian, P. Y., & Thiyagarajan, V. (2012). Analysis of Pacific oyster larval proteome and its response to high-CO₂. *Marine Pollution Bulletin*, *64*(10), 2160–2167.
- Dmitriew, C. M. (2011). The evolution of growth trajectories: What limits growth rate? *Biological Reviews*, *86*(1), 97–116. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00136.x>
- Donelson, J. M., Salinas, S., Munday, P. L., & Shama, L. N. (2018). Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here? *Global Change Biology*, *24*(1), 13–34.
- Dorey, N., Lançon, P., Thorndyke, M., & Dupont, S. (2013). Assessing physiological tipping point of sea urchin larvae exposed to a broad range of pH. *Global Change Biology*, *19*(11), 3355–3367. <https://doi.org/10.1111/gcb.12276>
- Doroudi, M. S., & Southgate, P. C. (2003). Embryonic and larval development of *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Research*, *23*(2), 101–107.

- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ducker, J., & Falkenberg, L. J. (2020). How the Pacific Oyster Responds to Ocean Acidification: Development and Application of a Meta-Analysis Based Adverse Outcome Pathway. *Frontiers in Marine Science*. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2020.597441>
- Durland, E., Waldbusser, G., & Langdon, C. (2019). Comparison of larval development in domesticated and naturalized stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to high pCO₂ conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 621, 107–125.
- E-**
- Ellis, R. P., Widdicombe, S., Parry, H., Hutchinson, T. H., & Spicer, J. I. (2015). Pathogenic challenge reveals immune trade-off in mussels exposed to reduced seawater pH and increased temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 462, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.10.015>
- Ertl, N. G., O'Connor, W. A., & Elizur, A. (2019). Molecular effects of a variable environment on Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*: Thermal and low salinity stress, and their synergistic effect. *Marine Genomics*, 43, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.10.003>
- Espinel-Velasco, N., Hoffmann, L., Agüera, A., Byrne, M., Dupont, S., Uthicke, S., Webster, N. S., & Lamare, M. (2018). Effects of ocean acidification on the settlement and metamorphosis of marine invertebrate and fish larvae: A review. *Marine Ecology Progress Series*, 606, 237–257. <https://doi.org/10.3354/meps12754>

Evans, S., & Langdon, C. (2006). Effect of dietary restriction during juvenile development on adult performance of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 259(1), 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.035>

-F-

Falconer, D. S., & Latyszewski, M. (1952). The environment in relation to selection for size in mice. *Journal of Genetics*, 51(1), 67–80.

FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief. Sustainability in action*. Rome.

FAO. (2021). *FAO Fisheries & Aquaculture—Cultured Aquatic Species Information Programme—Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en#tcNA0089

Feng, D., Li, Q., Yu, H., Kong, L., & Du, S. (2017). Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: Characterization of genetic bases regulating shell formation. *Scientific Reports*, 7(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/srep45754>

Fitzer, S. C., Phoenix, V. R., Cusack, M., & Kamenos, N. A. (2014). Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation. *Scientific Reports*, 4(1), 6218. <https://doi.org/10.1038/srep06218>

Foot, N., Henshall, T., & Kumar, S. (2017). Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiological Reviews*, 97(1), 253–281.

FranceAgriMer. (2021). *Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2021*.

Frankignoulle, M., Bourge, I., & Wollast, R. (1996). Atmospheric CO₂ fluxes in a highly polluted estuary (the Scheldt). *Limnology and Oceanography*, 41(2), 365–369.

- Frieder, C. A., Applebaum, S. L., Pan, T.-C. F., Hedgecock, D., & Manahan, D. T. (2017). Metabolic cost of calcification in bivalve larvae under experimental ocean acidification. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), 941–954.
- Frieder, C. A., Applebaum, S. L., Pan, T.-C. F., & Manahan, D. T. (2018). Shifting balance of protein synthesis and degradation sets a threshold for larval growth under environmental stress. *The Biological Bulletin*, 234(1), 45–57.
- Frieder, C. A., Gonzalez, J. P., Bockmon, E. E., Navarro, M. O., & Levin, L. A. (2014). Can variable pH and low oxygen moderate ocean acidification outcomes for mussel larvae? *Global Change Biology*, 20(3), 754–764. <https://doi.org/10.1111/gcb.12485>

-G-

- Gabriel, W. (2005). How stress selects for reversible phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4), 873–883. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00959.x>
- Garcia-Martinez, V., Gimenez-Molina, Y., Villanueva, J., Darios, F. D., Davletov, B., & Gutiérrez, L. M. (2018). Emerging evidence for the modulation of exocytosis by signalling lipids. *Febs Letters*, 592(21), 3493–3503.
- Gattuso, J.-P., & Hansson, L. (2011). *Ocean acidification*. Oxford university press.
- Gazeau, F., Alliouane, S., Bock, C., Bramanti, L., López Correa, M., Gentile, M., Hirse, T., Pörtner, H.-O., & Ziveri, P. (2014). Impact of ocean acidification and warming on the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Frontiers in Marine Science*, 1. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2014.00062>
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J.-P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pörtner, H.-O., & Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160(8), 2207–2245. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2219-3>

- Gazeau, F., Urbini, L., Cox, T. E., Alliouane, S., & Gattuso, J.-P. (2015). Comparison of the alkalinity and calcium anomaly techniques to estimate rates of net calcification. *Marine Ecology Progress Series*, 527, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps11287>
- Gervis, M. H., & Sims, N. A. (1992). *The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia pteriidae)* (Vol. 21). WorldFish.
- Gibert, P., Debat, V., & Ghalambor, C. K. (2019). Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 34–40.
- Gienapp, P., & Merilä, J. (2018). Evolutionary responses to climate change. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*.
- Gifford, S., Dunstan, H., O'Connor, W., & Macfarlane, G. R. (2005). Quantification of in situ nutrient and heavy metal remediation by a small pearl oyster (*Pinctada imbricata*) farm at Port Stephens, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 50(4), 417–422.
- Gobler, C. J., & Talmage, S. C. (2013). Short-and long-term consequences of larval stage exposure to constantly and ephemerally elevated carbon dioxide for marine bivalve populations. *Biogeosciences*, 10(4), 2241–2253.
- Gotthard, K., & Nylin, S. (1995). Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: A selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos*, 3–17.
- Grabowski, J. H., Brumbaugh, R. D., Conrad, R. F., Keeler, A. G., Opaluch, J. J., Peterson, C. H., Piehler, M. F., Powers, S. P., & Smyth, A. R. (2012). Economic valuation of ecosystem services provided by oyster reefs. *Bioscience*, 62(10), 900–909.
- Grear, J., Pimenta, A., Booth, H., Horowitz, D. B., Mendoza, W., & Liebman, M. (2020). In situ recovery of bivalve shell characteristics after temporary exposure to elevated pCO₂. *Limnology and Oceanography*, 65(10), 2337–2351. <https://doi.org/10.1002/lno.11456>

- Griffith, A. W., & Gobler, C. J. (2017). Transgenerational exposure of North Atlantic bivalves to ocean acidification renders offspring more vulnerable to low pH and additional stressors. *Scientific Reports*, 7(1), 11394. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11442-3>
- Gunderson, A. R., Armstrong, E. J., & Stillman, J. H. (2016). Multiple Stressors in a Changing World: The Need for an Improved Perspective on Physiological Responses to the Dynamic Marine Environment. *Annual Review of Marine Science*, 8(1), 357–378. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033953>
- Gurr, S. J., Trigg, S. A., Vadopalas, B., Roberts, S. B., & Putnam, H. M. (2021). Repeat exposure to hypercapnic seawater modifies growth and oxidative status in a tolerant burrowing clam. *The Journal of Experimental Biology*, 224(13), jeb233932. <https://doi.org/10.1242/jeb.233932>
- Gurr, S. J., Vadopalas, B., Roberts, S. B., & Putnam, H. M. (2020). Metabolic recovery and compensatory shell growth of juvenile Pacific geoduck *Panopea generosa* following short-term exposure to acidified seawater. *Conservation Physiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa024>

-H-

- Hannan, K. D., Jeffrey, J. D., Hasler, C. T., & Suski, C. D. (2016). The response of two species of unionid mussels to extended exposure to elevated carbon dioxide. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 201, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.07.009>
- Harley, C. D. (2006). Effects of physical ecosystem engineering and herbivory on intertidal community structure. *Marine Ecology Progress Series*, 317, 29–39.

- Hazel, J. R., & Williams, E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29(3), 167–227. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(90\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(90)90002-3)
- Hector, K. L., & Nakagawa, S. (2012). Quantitative analysis of compensatory and catch-up growth in diverse taxa. *Journal of Animal Ecology*, 81(3), 583–593.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 425–479.
- Hettinger, A., Sanford, E., Hill, T. M., Lenz, E. A., Russell, A. D., & Gaylord, B. (2013). Larval carry-over effects from ocean acidification persist in the natural environment. *Global Change Biology*, 19(11), 3317–3326. <https://doi.org/10.1111/gcb.12307>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. (2002). Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30(3), 215–216. <https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030030071>
- Hofmann, G. E., Smith, J. E., Johnson, K. S., Send, U., Levin, L. A., Micheli, F., Paytan, A., Price, N. N., Peterson, B., Takeshita, Y., Matson, P. G., Crook, E. D., Kroeker, K. J., Gambi, M. C., Rivest, E. B., Frieder, C. A., Yu, P. C., & Martz, T. R. (2011). High-Frequency Dynamics of Ocean pH: A Multi-Ecosystem Comparison. *PLOS ONE*, 6(12), e28983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028983>
- Holeski, L. M., Hillstrom, M. L., Whitham, T. G., & Lindroth, R. L. (2012). Relative importance of genetic, ontogenetic, induction, and seasonal variation in producing a multivariate defense phenotype in a foundation tree species. *Oecologia*, 170(3), 695–707.
- Horimoto, N., Nabekura, J., & Ogawa, T. (1997). Arachidonic acid activation of potassium channels in rat visual cortex neurons. *Neuroscience*, 77(3), 661–671.

- Hoshijima, U., & Hofmann, G. E. (2019). Variability of Seawater Chemistry in a Kelp Forest Environment Is Linked to in situ Transgenerational Effects in the Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00062>
- Hulbert, A. J., & Else, P. L. (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of Theoretical Biology*, 199(3), 257–274. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1999.0955>
- Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H.-O., Philipp, E. E. R., & Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: Implications for shell formation and energy metabolism, link to supplementary material [Data set]. In *Supplement to: Hüning, AK et al. (2013): Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: Implications for shell formation and energy metabolism. Marine Biology*, 160(8), 1845-1861, <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1930-9>. PANGAEA. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.823198>
- Hurst, T. P., Spencer, M. L., Sogard, S. M., & Stoner, A. W. (2005). Compensatory growth, energy storage and behavior of juvenile Pacific halibut *Hippoglossus stenolepis* following thermally induced growth reduction. *Marine Ecology Progress Series*, 293, 233–240. <https://doi.org/10.3354/meps293233>
- Hutchings, J. A. (2011). Old wine in new bottles: Reaction norms in salmonid fishes. *Heredity*, 106(3), 421–437.

-I-

IEOM. (2018). *Rapport annuel 2018 de l'IEOM - Polynésie Française*.

- IPBES. (2019). *Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services* [E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (eds.)]. IPBES, Bonn, Germany. 56 pp. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6417333>
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- IPCC. (2019). *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, N.M. Weyer (eds.)]. In. press.
- IPCC. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. In. press.
- IPCC. (2022). *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. In. press.

-J-

- Jager, T., Ravagnan, E., & Dupont, S. (2016). Near-future ocean acidification impacts maintenance costs in sea-urchin larvae: Identification of stress factors and tipping points using a DEB modelling approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.09.016>
- Jiang, L.-Q., Carter, B. R., Feely, R. A., Lauvset, S. K., & Olsen, A. (2019). Surface ocean pH and buffer capacity: Past, present and future. *Scientific Reports*, 9(1), 18624. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55039-4>
- Johannsen, W. (1909). Elemente der exakten Erblchkeitslehre. *Fischer*.
- Johnson, J. E., Allain, V., Basel, B., Bell, J. D., Chin, A., Dutra, L. X., Hooper, E., Loubser, D., Lough, J., & Moore, B. R. (2020). Impacts of climate change on marine resources in the Pacific Island region. In *Climate change and impacts in the Pacific* (pp. 359–402). Springer.
- Johnson, J. E., Bell, J. D., & Gupta, A. S. (2015). *Pacific islands ocean acidification vulnerability assessment*. SPREP Apia, Somoa.
- Johnson, K. D., & Smee, D. L. (2012). Size matters for risk assessment and resource allocation in bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, 462, 103–110.

-K-

- Kaniewska, P., Chan, C.-K. K., Kline, D., Ling, E. Y. S., Rosic, N., Edwards, D., Hoegh-Guldberg, O., & Dove, S. (2015). Transcriptomic Changes in Coral Holobionts Provide Insights into Physiological Challenges of Future Climate and Ocean Change. *PLOS ONE*, 10(10), e0139223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139223>

- Kapsenberg, L., Miglioli, A., Bitter, M. C., Tambutté, E., Dumollard, R., & Gattuso, J.-P. (2018). Ocean pH fluctuations affect mussel larvae at key developmental transitions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1893), 20182381. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2381>
- Keppel, A. G., Breitbart, D. L., & Burrell, R. B. (2016). Effects of Co-Varying Diel-Cycling Hypoxia and pH on Growth in the Juvenile Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *PLOS ONE*, 11(8), e0161088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161088>
- Klopfenstein, D. V., Zhang, L., Pedersen, B. S., Ramírez, F., Warwick Vesztrocy, A., Naldi, A., Mungall, C. J., Yunes, J. M., Botvinnik, O., Weigel, M., Dampier, W., Dessimoz, C., Flick, P., & Tang, H. (2018). GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. *Scientific Reports*, 8(1), 10872. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28948-z>
- Knauer, J., & Southgate, P. C. (1999). A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7(3–4), 241–280. <https://doi.org/10.1080/10641269908951362>
- Ko, G. W. K., Dineshram, R., Campanati, C., Chan, V. B. S., Havenhand, J., & Thiagarajan, V. (2014). Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature, and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environmental Science & Technology*, 48(17), 10079–10088. <https://doi.org/10.1021/es501611u>
- Kohn, A. J., & Leviten, P. J. (1976). Effect of habitat complexity on population density and species richness in tropical intertidal predatory gastropod assemblages. *Oecologia*, 25(3), 199–210.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., Duarte, C. M., & Gattuso, J.-P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms:

- Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, 19(6), 1884–1896. <https://doi.org/10.1111/gcb.12179>
- Kulp, R. E., Politano, V., Lane, H. A., Lombardi, S. A., & Paynter, K. T. (2011). Predation of juvenile *Crassostrea virginica* by two species of mud crabs found in the Chesapeake Bay. *Journal of Shellfish Research*, 30(2), 261–266.
- Kurihara, H., Kato, S., & Ishimatsu, A. (2007). Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology*, 1(1), 91–98.
- Kwiatkowski, L., & Orr, J. C. (2018). Diverging seasonal extremes for ocean acidification during the twenty-first century. *Nature Climate Change*, 8(2), 141–145.
- L-**
- Lacoste, I., Brochiero, E., & Ehrenfeld, J. (1993). Control of Na⁺ and H⁺ transports by exocytosis/endocytosis phenomena in a tight epithelium. *The Journal of Membrane Biology*, 134(3), 197–212.
- Langdon, C. J., & Waldock, M. J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* Spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61(2), 431–448. <https://doi.org/10.1017/S0025315400047056>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Lannig, G., Eilers, S., Pörtner, H. O., Sokolova, I. M., & Bock, C. (2010). Impact of Ocean Acidification on Energy Metabolism of Oyster, *Crassostrea gigas*—Changes in Metabolic Pathways and Thermal Response. *Marine Drugs*, 8(8), 2318–2339. <https://doi.org/10.3390/md8082318>

- Latham, C. F., Osborne, S. L., Cryle, M. J., & Meunier, F. A. (2007). Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *Journal of Neurochemistry*, *100*(6), 1543–1554. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04286.x>
- Le Luyer, J., Auffret, P., Quillien, V., Leclerc, N., Reisser, C., Vidal-Dupiol, J., & Ky, C.-L. (2019). Whole transcriptome sequencing and biomineralization gene architecture associated with cultured pearl quality traits in the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. *BMC Genomics*, *20*(1), 1–11.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Latchere, O., Vidal-Dupiol, J., Fremery, J., Saulnier, D., Lo Yat, A., Belliard, C., Mazouni-Gaertner, N., & Gueguen, Y. (2016). *Pinctada margaritifera* responses to temperature and pH: Acclimation capabilities and physiological limits. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *182*, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.011>
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Vidal-Dupiol, J., Belliard, C., Fievet, J., Sham-Koua, M., Lo-Yat, A., Saulnier, D., Gaertner-Mazouni, N., & Gueguen, Y. (2016). Impact of pCO₂ on the energy, reproduction and growth of the shell of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *182*, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.011>
- Lee, H.-G., Stumpp, M., Yan, J.-J., Tseng, Y.-C., Heinzl, S., & Hu, M. Y.-A. (2019). Tipping points of gastric pH regulation and energetics in the sea urchin larva exposed to CO₂ - induced seawater acidification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *234*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.018>

- Lee, S. W., Hong, S. M., & Choi, C. S. (2006). Characteristics of calcification processes in embryos and larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Marine Science*, 78(2), 309–317.
- Lee, Y. H., Jeong, C.-B., Wang, M., Hagiwara, A., & Lee, J.-S. (2020). Transgenerational acclimation to changes in ocean acidification in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 153, 111006. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111006>
- Lemasson, A. J., Fletcher, S., Hall-Spencer, J. M., & Knights, A. M. (2017). Linking the biological impacts of ocean acidification on oysters to changes in ecosystem services: A review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 492, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.01.019>
- Lemasson, A. J., Hall-Spencer, J. M., Fletcher, S., Provstgaard-Morys, S., & Knights, A. M. (2018). Indications of future performance of native and non-native adult oysters under acidification and warming. *Marine Environmental Research*, 142, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.10.003>
- Leung, J. Y. S., Doubleday, Z. A., Nagelkerken, I., Chen, Y., Xie, Z., & Connell, S. D. (2019). How calorie-rich food could help marine calcifiers in a CO₂-rich future. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1906), 20190757. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0757>
- Lewis, S. L., & Maslin, M. A. (2015). Defining the anthropocene. *Nature*, 519(7542), 171–180.
- Li, L., Lu, W., Sui, Y., Wang, Y., Gul, Y., & Dupont, S. (2015). Conflicting effects of predator cue and ocean acidification on the mussel *Mytilus coruscus* byssus production. *Journal of Shellfish Research*, 34(2), 393–400.
- Li, S., Huang, J., Liu, C., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L., & Zhang, R. (2016). Interactive effects of seawater acidification and elevated temperature on the transcriptome and

- biomineralization in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Environmental Science & Technology*, 50(3), 1157–1165.
- Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zhang, S., Zheng, G., Xie, L., & Zhang, R. (2016). Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO₂ and temperature. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10.
- Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L., & Zhang, R. (2015). Interactive effects of seawater acidification and elevated temperature on biomineralization and amino acid metabolism in the mussel *Mytilus edulis*. *The Journal of Experimental Biology*, 218(Pt 22), 3623–3631. <https://doi.org/10.1242/jeb.126748>
- Li, S., Liu, C., Zhan, A., Xie, L., & Zhang, R. (2017a). Influencing mechanism of ocean acidification on byssus performance in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7696–7706.
- Li, S., Liu, C., Zhan, A., Xie, L., & Zhang, R. (2017b). Influencing mechanism of ocean acidification on byssus performance in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7696–7706.
- Liu, W., Yu, Z., Huang, X., Shi, Y., Lin, J., Zhang, H., Yi, X., & He, M. (2017). Effect of ocean acidification on growth, calcification, and gene expression in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Marine Environmental Research*, 130, 174–180.
- Lord, J. P., & Whitlatch, R. B. (2012). Inducible defenses in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin in response to the presence of the predatory oyster drill *Urosalpinx cinerea* Say in Long Island Sound. *Marine Biology*, 159(6), 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1896-7>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265–275.

Lutier, M., Di Poi, C., Gazeau, F., Appolis, A., Le Luyer, J., & Pernet, F. (2022). Revisiting tolerance to ocean acidification: Insights from a new framework combining physiological and molecular tipping points of Pacific oyster. *Global Change Biology*, 28(10), 3333–3348. <https://doi.org/10.1111/gcb.16101>

-M-

MacDonald, C., Buchkovich, N. J., Stringer, D. K., Emr, S. D., & Piper, R. C. (2012). Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Reports*, 13(4), 331–338.

Mackinder, L., Wheeler, G., Schroeder, D., Riebesell, U., & Brownlee, C. (2010). Molecular Mechanisms Underlying Calcification in Coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*, 27(6–7), 585–595. <https://doi.org/10.1080/01490451003703014>

Manríquez, P. H., González, C. P., Brokordt, K., Pereira, L., Torres, R., Lattuca, M. E., Fernández, D. A., Peck, M. A., Cucco, A., & Antognarelli, F. (2019). Ocean warming and acidification pose synergistic limits to the thermal niche of an economically important echinoderm. *Science of The Total Environment*, 693, 133469.

Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenec-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., & Montagnani, C. (2012). Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 20986–20991.

Mathis, J. T., Cross, J. N., & Bates, N. R. (2011). Coupling primary production and terrestrial runoff to ocean acidification and carbonate mineral suppression in the eastern Bering Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 116(C2).

- Matz, M. V. (2018). Fantastic Beasts and How To Sequence Them: Ecological Genomics for Obscure Model Organisms. *Trends in Genetics: TIG*, 34(2), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.002>
- McLean, R. (1983). Gastropod shells: A dynamic resource that helps shape benthic community structure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 69(2), 151–174.
- Meistertzheim, A.-L., Arnaud-Haond, S., Boudry, P., & Thébault, M.-T. (2013). Genetic structure of wild European populations of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* due to aquaculture practices. *Marine Biology*, 160(2), 453–463. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2102-7>
- Melzner, F., Thomsen, J., Koeve, W., Oschlies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Hansen, H. P., & Körtzinger, A. (2013). Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology*, 160(8), 1875–1888. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1954-1>
- Michaelidis, B., Haas, D., & Grieshaber, M. K. (2005a). Extracellular and intracellular acid-base status with regard to the energy metabolism in the oyster *Crassostrea gigas* during exposure to air. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3), 373–383.
- Michaelidis, B., Haas, D., & Grieshaber, M. K. (2005b). Extracellular and Intracellular Acid-Base Status with Regard to the Energy Metabolism in the Oyster *Crassostrea gigas* during Exposure to Air. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3), 373–383. <https://doi.org/10.1086/430223>
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., & Pörtner, H. (2005). *Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels (Mytilus galloprovincialis)*. <https://doi.org/10.3354/MEPS293109>

- Miossec, L., Le Deuff, R.-M., & Gouilletquer, P. (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report*, 299.
- Molnar, J. L., Gamboa, R. L., Revenga, C., & Spalding, M. D. (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(9), 485–492.
- Monaco, C. J., & Helmuth, B. (2011). Tipping points, thresholds and the keystone role of physiology in marine climate change research. In *Advances in marine biology* (Vol. 60, pp. 123–160). Elsevier.
- Mondal, S. K. (2006). *Effect of temperature and body size on food utilization in the marine pearl oyster Pinctada fucata (Bivalvia: Pteridae)*.
- Mucci, A., Canuel, R., & Zhong, S. (1989). The solubility of calcite and aragonite in sulfate-free seawater and the seeded growth kinetics and composition of the precipitates at 25 C. *Chemical Geology*, 74(3–4), 309–320.
- Muggeo, V. M. R. (2020). *segmented: Regression Models with Break-Points / Change-Points Estimation* (1.3-1) [R]. <https://CRAN.R-project.org/package=segmented>
- Murren, C. J., Auld, J. R., Callahan, H., Ghalambor, C. K., Handelsman, C. A., Heskell, M. A., Kingsolver, J. G., Maclean, H. J., Masel, J., & Maughan, H. (2015). Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: Limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity*, 115(4), 293–301.

-N-

- Nelson, W. J., & Veshnock, P. J. (1987). Ankyrin binding to (Na⁺⁺ K⁺) ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature*, 328(6130), 533–536.

- Nicieza, A. G., & Metcalfe, N. B. (1997). Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: Responses to depressed temperature and food availability. *Ecology*, 78(8), 2385–2400.
- Nicoglou, A. (2015). The evolution of phenotypic plasticity: Genealogy of a debate in genetics. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 50, 67–76.
- Noble, D. W., Stenhouse, V., & Schwanz, L. E. (2018). Developmental temperatures and phenotypic plasticity in reptiles: A systematic review and meta-analysis. *Biological Reviews*, 93(1), 72–97.
- Nudelman, F., Shimoni, E., Klein, E., Rousseau, M., Bourrat, X., Lopez, E., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: An environmental-and cryo-scanning electron microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 162(2), 290–300.

-O-

- O'Connor, W. A., & Lawler, N. F. (2004). Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture*, 229(1–4), 493–506.
- O'Donnell, M. J., George, M. N., & Carrington, E. (2013). Mussel byssus attachment weakened by ocean acidification. *Nature Climate Change*, 3(6), 587–590.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., ... Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437(7059), 681–686.
<https://doi.org/10.1038/nature04095>

-P-

- Pack, K. E., Rius, M., & Mieszkowska, N. (2021). Long-term environmental tolerance of the non-indigenous Pacific oyster to expected contemporary climate change conditions. *Marine Environmental Research*, *164*, 105226.
- Padilla, D. K., & Savedo, M. M. (2013). A systematic review of phenotypic plasticity in marine invertebrate and plant systems. *Advances in Marine Biology*, *65*, 67–94.
- Palmer, A. (1992). Calcification in marine molluscs: How costly is it? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(4), 1379–1382. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1379>
- Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Pörtner, H. O., Scanes, E., & Wright, J. M. (2013). Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology*, *2*(2), 651–692.
- Peck, V. L., Oakes, R. L., Harper, E. M., Manno, C., & Tarling, G. A. (2018). Pteropods counter mechanical damage and dissolution through extensive shell repair. *Nature Communications*, *9*(1), 264. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02692-w>
- Peck, V. L., Tarling, G. A., Manno, C., Harper, E. M., & Tynan, E. (2016). Outer organic layer and internal repair mechanism protects pteropod *Limacina helicina* from ocean acidification. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *127*, 41–52.
- Peñaloza, C., Gutierrez, A. P., Eöry, L., Wang, S., Guo, X., Archibald, A. L., Bean, T. P., & Houston, R. D. (2021). A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *GigaScience*, *10*(3). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab020>

- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., & Pernet, F. (2015). Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, *6*(3), 205–222. <https://doi.org/10.3354/aei00125>
- Pickering, T. D., Ponia, B., Hair, C. A., Southgate, P. C., Poloczanska, E., Patrona, L. D., Teitelbaum, A., Mohan, C. V., Phillips, M. J., & Bell, J. D. (2011). *Vulnerability of aquaculture in the tropical Pacific to climate change*. Secretariat of the Pacific Community.
- Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., & Bodoy, A. (2000). Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquatic Living Resources*, *13*(1), 37–48.
- Pouvreau, S., Tiapari, J., Gangnery, A., Lagarde, F., Garnier, M., Teissier, H., Haumani, G., Buestel, D., & Bodoy, A. (2000). Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia). *Aquaculture*, *184*(1–2), 133–154.
- Proum, S., Harley, C. D., Steele, M., & Marshall, D. J. (2017). Aerobic and behavioral flexibility allow estuarine gastropods to flourish in rapidly changing and extreme pH conditions. *Marine Biology*, *164*(5), 1–14.
- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*, *21*(6), 2122–2140. <https://doi.org/10.1111/gcb.12833>
- Putnam, H., Roberts, S., & Spencer, L. H. (2017). *Capacity for adaptation and acclimatization to ocean acidification in geoduck through epigenetic mechanisms*. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4990889.v1>

Py, C., Elizondo-González, R., & Peña-Rodríguez, A. (2022). Compensatory growth: Fitness cost in farmed fish and crustaceans. *Reviews in Aquaculture*.

-R-

Rajan, K. C., Meng, Y., Yu, Z., Roberts, S. B., & Vengatesen, T. (2021). Oyster biomineralization under ocean acidification: From genes to shell. *Global Change Biology*, *n/a(n/a)*. <https://doi.org/10.1111/gcb.15675>

Ramesh, K., Hu, M. Y., Melzner, F., Bleich, M., & Himmerkus, N. (2020). Intracellular pH regulation in mantle epithelial cells of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Comparative Physiology B*, *190*(6), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01303-3>

Reisser, C., Lo, C., Schikorski, D., Sham Koua, M., Planes, S., & Ky, C.-L. (2019). Strong genetic isolation of the black-lipped pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in the Marquesas archipelago (French Polynesia). *Scientific Reports*, *9*(1), 11420. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47729-w>

Rico-Villa, B., Pouvreau, S., & Robert, R. (2009). Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, *287*(3), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.054>

Rodriguez, L. F. (2009). Impact of a native predatory whelk on cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) crops in San Quintin Bay, Mexico. *Aquaculture Research*, *40*(4), 419–427.

Rose, J. M., Blanchette, C. A., Chan, F., Gouhier, T. C., Raimondi, P. T., Sanford, E., & Menge, B. A. (2020). Biogeography of ocean acidification: Differential field performance of transplanted mussels to upwelling-driven variation in carbonate chemistry. *PloS One*, *15*(7), e0234075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234075>

- Ross, P. M., Parker, L., O'Connor, W. A., & Bailey, E. A. (2011). The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water*, 3(4), 1005–1030.
- Rudnick, G. (1987). Acidification of Intracellular organelles. In *Membrane Transport Processes in Organized Systems* (pp. 25–38). Springer.
- S-**
- Scherer, A. E., Bird, C. E., McCutcheon, M. R., Hu, X., & Smee, D. L. (2018). Two-tiered defense strategy may compensate for predator avoidance costs of an ecosystem engineer. *Marine Biology*, 165(8), 131. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3391-2>
- Schlichting, C., & Pigliucci, M. (1998). *Phenotypic evolution: A reaction norm perspective*.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulte, P. M., Healy, T. M., & Fanguie, N. A. (2011). Thermal Performance Curves, Phenotypic Plasticity, and the Time Scales of Temperature Exposure. *Integrative and Comparative Biology*, 51(5), 691–702. <https://doi.org/10.1093/icb/icr097>
- Seebacher, F., White, C. R., & Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61–66.
- Shi, X., Xiang, S., Cao, J., Zhu, H., Yang, B., He, Q., & Ying, M. (2019). Kelch-like proteins: Physiological functions and relationships with diseases. *Pharmacological Research*, 148, 104404.
- Smith, S. V., & Key, G. S. (1975). Carbon dioxide and metabolism in marine environments. *Limnology and Oceanography*, 20(3), 493–495. <https://doi.org/10.4319/lo.1975.20.3.0493>

- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Sokolova, I. M. (2021). Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: Linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape. *Journal of Experimental Biology*, 224(Suppl 1). <https://doi.org/10.1242/jeb.236802>
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012a). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012b). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sommer, R. J. (2020). Phenotypic plasticity: From theory and genetics to current and future challenges. *Genetics*, 215(1), 1–13.
- Sörensen, S. P. L. (1909). Ergänzung zu der Abhandlung: Enzymstudien II: Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochem. Z.*, 22, 352–356.
- Southgate, P. C., & Beer, A. C. (1997). Hatchery and early nursery culture of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.). *Journal of Shellfish Research*, 16(2), 561–567.
- Southgate, P. C., & Lucas, J. (2011). *The pearl oyster*. Elsevier.

- Steffen, W., Broadgate, W., Deutsch, L., Gaffney, O., & Ludwig, C. (2015). The trajectory of the Anthropocene: The Great Acceleration. *The Anthropocene Review*, 2(1), 81–98. <https://doi.org/10.1177/2053019614564785>
- Steffen, W., Rockström, J., Richardson, K., Lenton, T. M., Folke, C., Liverman, D., Summerhayes, C. P., Barnosky, A. D., Cornell, S. E., & Crucifix, M. (2018). Trajectories of the Earth System in the Anthropocene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(33), 8252–8259.
- Steinberg, C. E. W. (2018). Dietary Restriction, Starvation, Compensatory Growth – ‘Short-Term Fasting Does Not Kill You: It Can Make You Stronger.’ In C. E. W. Steinberg (Ed.), *Aquatic Animal Nutrition: A Mechanistic Perspective from Individuals to Generations* (pp. 137–287). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91767-2_4
- Storey, K. B., Lant, B., Anozie, O. O., & Storey, J. M. (2013). Metabolic mechanisms for anoxia tolerance and freezing survival in the intertidal gastropod, *Littorina littorea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4), 448–459.
- Strader, M. E., Wong, J. M., & Hofmann, G. E. (2020). Ocean acidification promotes broad transcriptomic responses in marine metazoans: A literature survey. *Frontiers in Zoology*, 17(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12983-020-0350-9>
- Sutherland, B. J., Rycroft, C., Ferchaud, A.-L., Saunders, R., Li, L., Liu, S., Chan, A. M., Otto, S. P., Suttle, C. A., & Miller, K. M. (2020). Relative genomic impacts of translocation history, hatchery practices, and farm selection in Pacific oyster *Crassostrea gigas* throughout the Northern Hemisphere. *Evolutionary Applications*, 13(6), 1380–1399.

Sutton, A. J., Feely, R. A., Sabine, C. L., McPhaden, M. J., Takahashi, T., Chavez, F. P., Friederich, G. E., & Mathis, J. T. (2014). Natural variability and anthropogenic change in equatorial Pacific surface ocean pCO₂ and pH. *Global Biogeochemical Cycles*, *28*(2), 131–145.

-T-

Takeshita, Y., Frieder, C. A., Martz, T. R., Ballard, J. R., Feely, R. A., Kram, S., Nam, S., Navarro, M. O., Price, N. N., & Smith, J. E. (2015). Including high-frequency variability in coastal ocean acidification projections. *Biogeosciences*, *12*(19), 5853–5870.

Telesca, L., Peck, L. S., Backeljau, T., Heinig, M. F., & Harper, E. M. (2021). A century of coping with environmental and ecological changes via compensatory biomineralization in mussels. *Global Change Biology*, *27*(3), 624–639. <https://doi.org/10.1111/gcb.15417>

Thielley, M. (1993). *Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière Pinctada margaritifera (L) var. Cumingii (Jameson), (mollusques, bivalves). Comparaison avec le cycle de Pinctada maculata (Gould)*. Université française du pacifique.

Thomsen, J., Casties, I., Pansch, C., Körtzinger, A., & Melzner, F. (2013). Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: Laboratory and field experiments. *Global Change Biology*, *19*(4), 1017–1027. <https://doi.org/10.1111/gcb.12109>

Timmins-Schiffman, E., Coffey, W. D., Hua, W., Nunn, B. L., Dickinson, G. H., & Roberts, S. B. (2014). Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics*, *15*(1), 951. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-951>

- Timmins-Schiffman, E., O'Donnell, M. J., Friedman, C. S., & Roberts, S. B. (2013). Elevated pCO₂ causes developmental delay in early larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, *160*(8), 1973–1982.
- Tisdell, C., & Poirine, B. (2008). Economics of pearl farming. *The Pearl Oyster*, *473*, 495.
- Tresguerres, M., Clifford, A. M., Harter, T. S., Roa, J. N., Thies, A. B., Yee, D. P., & Brauner, C. J. (2020). Evolutionary links between intra- and extracellular acid–base regulation in fish and other aquatic animals. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, *333*(6), 449–465. <https://doi.org/10.1002/jez.2367>
- Tresguerres, M., & Hamilton, T. J. (2017). Acid–base physiology, neurobiology and behaviour in relation to CO₂-induced ocean acidification. *Journal of Experimental Biology*, *220*(12), 2136–2148. <https://doi.org/10.1242/jeb.144113>
- Triebenbach, S. P., Smoker, W. W., Beckman, B. R., & Focht, R. (2009). Compensatory growth after winter food deprivation in hatchery-produced coho salmon and chinook salmon smolts. *North American Journal of Aquaculture*, *71*(4), 384–399.
- V-**
- Vargas, C. A., Lagos, N. A., Lardies, M. A., Duarte, C., Manríquez, P. H., Aguilera, V. M., Broitman, B., Widdicombe, S., & Dupont, S. (2017). Species-specific responses to ocean acidification should account for local adaptation and adaptive plasticity. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(4), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0084>
- Ventura, A., Schulz, S., & Dupont, S. (2016). Maintained larval growth in mussel larvae exposed to acidified under-saturated seawater. *Scientific Reports*, *6*(1), 23728. <https://doi.org/10.1038/srep23728>
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., & Rodriguez, E. M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab

Chasmagnathus granulata (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 121–129.

-W-

- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L., Gray, M. W., Miller, C. A., Gimenez, I., & Hutchinson, G. (2015). Ocean Acidification Has Multiple Modes of Action on Bivalve Larvae. *PLOS ONE*, 10(6), e0128376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128376>
- Waldbusser, G. G., & Salisbury, J. E. (2014). Ocean Acidification in the Coastal Zone from an Organism's Perspective: Multiple System Parameters, Frequency Domains, and Habitats. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 221–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172238>
- Wallace, R. B., Baumann, H., Grear, J. S., Aller, R. C., & Gobler, C. J. (2014). Coastal ocean acidification: The other eutrophication problem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 148, 1–13.
- Walther, K., Sartoris, F.-J., Bock, C., & Pörtner, H.-O. (2009). Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. *Biogeosciences*, 6(10), 2207–2215.
- Wang, X., Wang, M., Jia, Z., Song, X., Wang, L., & Song, L. (2017). A shell-formation related carbonic anhydrase in *Crassostrea gigas* modulates intracellular calcium against CO₂ exposure: Implication for impacts of ocean acidification on mollusk calcification. *Aquatic Toxicology*, 189, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.009>
- Wang, X., Wang, M., Wang, W., Liu, Z., Xu, J., Jia, Z., Chen, H., Qiu, L., Lv, Z., Wang, L., & Song, L. (2020). Transcriptional changes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reveal essential role of calcium signal pathway in response to CO₂-driven acidification. *The*

- Science of the Total Environment*, 741, 140177.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140177>
- Wanninkhof, R., Barbero, L., Byrne, R., Cai, W.-J., Huang, W.-J., Zhang, J.-Z., Baringer, M., & Langdon, C. (2015). Ocean acidification along the Gulf Coast and East Coast of the USA. *Continental Shelf Research*, 98, 54–71.
- Welladsen, H. M., Heimann, K., & Southgate, P. C. (2011). The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on activity and byssus production of the Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Journal of Shellfish Research*, 30(1), 85–88.
- West-Eberhard, M. J. (1989). Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 249–278.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.001341>
- Woltereck, R. (1909). Weitere experimentelle Untersuchungen über Artveränderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. *Verh. D. Tsch. Zool. Ges.*, 1909, 110–172.
- Wood, S. N. (2001). Minimizing Model Fitting Objectives That Contain Spurious Local Minima by Bootstrap Restarting. *Biometrics*, 57(1), 240–244.
<https://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2001.00240.x>
- Wright, J. M., Parker, L. M., O'Connor, W. A., Scanes, E., & Ross, P. M. (2018). Ocean acidification affects both the predator and prey to alter interactions between the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and the whelk *Tenguella marginalba* (Blainville, 1832). *Marine Biology*, 165(3), 46. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3302-6>
- Wright, J. M., Parker, L. M., O'Connor, W. A., Williams, M., Kube, P., & Ross, P. M. (2014). Populations of Pacific oysters *Crassostrea gigas* respond variably to elevated CO₂ and

predation by *Morula marginalba*. *The Biological Bulletin*, 226(3), 269–281.
<https://doi.org/10.1086/BBLv226n3p269>

Wu, H. C., Dissard, D., Douville, E., Blamart, D., Bordier, L., Tribollet, A., Le Cornec, F., Pons-Branchu, E., Dapoigny, A., & Lazareth, C. E. (2018). Surface ocean pH variations since 1689 CE and recent ocean acidification in the tropical South Pacific. *Nature Communications*, 9(1), 1–13.

-X-

Xiang, L., Etxeberria, E., & Van den Ende, W. (2013). Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *The FEBS Journal*, 280(4), 979–993.

-Y-

Yan, L., Li, Y., Wang, Z., Su, J., Yu, R., Yan, X., Ma, P., & Cui, Y. (2018). Stress response to low temperature: Transcriptomic characterization in *Crassostrea sikamea* × *Crassostrea angulata* hybrids. *Aquaculture Research*, 49(10), 3374–3385.
<https://doi.org/10.1111/are.13801>

Yang, F., Yao, T., Huo, Z., Zhang, Y., Yan, X., & Zhang, G. (2010). Effects of starvation on growth, survival, and body biochemical composition among different sizes of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 30(3), 135–140.
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2010.04.003>

Yarra, T., Blaxter, M., & Clark, M. S. (2021). A Bivalve Biomineralization Toolbox. *Molecular Biology and Evolution*, 38(9), 4043–4055. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab153>

Yukihira, H., Klumpp, D. W., & Lucas, J. S. (1999). Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. *Marine Ecology Progress Series*, 182, 161–173.

-Z-

- Zhang, Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, *490*(7418), 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Zhang, J., Luo, S., Gu, Z., Deng, Y., & Jiao, Y. (2020). Genome-wide DNA methylation analysis of mantle edge and mantle central from pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Marine Biotechnology*, *22*(3), 380–390.
- Zhang, X.-S. (2006). The phenotypic variance within plastic traits under migration-mutation-selection balance. *Evolution*, *60*(6), 1125–1136.
- Zhao, X., Guo, C., Han, Y., Che, Z., Wang, Y., Wang, X., Chai, X., Wu, H., & Liu, G. (2017). Ocean acidification decreases mussel byssal attachment strength and induces molecular byssal responses. *Marine Ecology Progress Series*, *565*, 67–77.
- Zhao, X., Han, Y., Chen, B., Xia, B., Qu, K., & Liu, G. (2020). CO₂-driven ocean acidification weakens mussel shell defense capacity and induces global molecular compensatory responses. *Chemosphere*, *243*, 125415. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125415>
- Zu Ermgassen, P. S., Thurstan, R. H., Corrales, J., Alleway, H., Carranza, A., Dankers, N., DeAngelis, B., Hancock, B., Kent, F., & McLeod, I. (2020). The benefits of bivalve reef restoration: A global synthesis of underrepresented species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *30*(11), 2050–2065.

Titre : Plasticité phénotypique des huîtres à l'acidification des océans en milieux tempérés et tropicaux

Mots clés : acidification des océans, huître, normes de réaction, plasticité phénotypique, point de bascule

Résumé : La plasticité phénotypique est la première ligne de défense des espèces face aux changements globaux, tamponnant leur impact sur la fitness individuelle. Toutefois, cet effet tampon est limité par un point de bascule au-delà duquel les espèces devront s'adapter ou disparaître. Ces points de bascule sont déterminés en modélisant les normes de réaction des traits phénotypiques sur une large gamme de variations environnementales. Cette approche reste anecdotique dans l'étude des effets de l'acidification des océans (AO) sur les organismes marins. En conséquence, les points de bascule restent méconnus chez l'huître creuse et l'huître perlière dont le déclin aurait un impact économique et écologique majeur. Ce travail de thèse établit les premières normes de réaction holistiques, à l'échelle macrophysiologique (taux physiologiques, paramètres de la coquille) et moléculaire (transcriptomique, lipidomique), d'organismes exposés à une vaste gamme de pH en milieux tempérés et tropicaux.

De cette manière, nous avons identifié un seuil de tolérance à pH 7.3-6.9 en dessous duquel la fitness des juvéniles d'huître creuse et d'huître perlière est impactée. Une exposition à court-terme à des pH excédant les points de bascule aura un impact à long-terme sur la fitness de l'huître creuse qui ne peut notamment pas compenser le retard de croissance subi. Le seuil de tolérance à l'AO est déjà atteint aujourd'hui dans le milieu de vie de l'huître creuse lors d'événements extrêmes d'acidification, qui devraient s'accroître dans le futur menaçant les populations sauvages et aquacoles. Les conditions actuelles de pH rencontrées par l'huître perlière restent méconnues requérant la mise en place d'un suivi du pH à large échelle afin de pouvoir conclure sur le futur de l'espèce.

Title : Phenotypic plasticity of oysters to ocean acidification in temperate and tropical environments

Keywords : ocean acidification, oyster, phenotypic plasticity, reaction norms, tipping point

Abstract : Phenotypic plasticity is the first defense of organisms against global changes, buffering their impact on individual fitness. However, this buffering capacity is limited by the tipping point beyond which species will have to adapt or disappear. These tipping points are determined by modeling the reaction norms for phenotypic traits over a wide range of environmental conditions. This approach is used anecdotally to study the impacts of ocean acidification (OA) on marine organisms. Therefore, tipping points remain unknown for the Pacific oyster and the pearl oyster whose population decline would have a great economic and environmental impact. This thesis work establishes the first holistic reaction norms, at macrophysiological (physiological rates, shell parameters) and molecular scales (transcriptomic, lipidomic), in organisms exposed to a wide range of pH in temperate and tropical environments.

Thus, we identified a tolerance threshold at pH 7.3-6.9 below which the fitness of Pacific oyster and that of pearl oyster are impacted. Short-term exposure to pH below the tipping points will have a long-term impact on the Pacific oyster which will not be able to compensate for growth stunting. The tolerance threshold to OA is already reached in habitats of the Pacific oyster during extreme acidification events which must increase in the future, threatening natural and farmed populations. The ambient pH conditions encountered by pearl oysters remain unknown, requiring the establishment of large-scale pH monitoring in order to conclude on the future of the species.