

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : «Biologie Marine»

Par

Lizenn DELISLE

Rôle de la température dans l'interaction huître creuse -
Ostreid Herpesvirus de type 1: réponses
transcriptomiques et métaboliques.

Thèse présentée et soutenue à Brest le 18 décembre 2018.

Unité de recherche : LEMAR, IFREMER, Univ Brest, CNRS, IRD, F-29280 Plouzané, France.

Rapporteurs avant soutenance :

Pascal FAVREL
Professeur, Université de Caen, Normandie

Guillaume MITTA
Professeur, Université de Perpignan

Composition du Jury :

Pascal FAVREL
Professeur, Université de Caen, Normandie, Président du jury

Guillaume MITTA
Professeur, Université de Perpignan

Isabelle ARZUL
Cadre de recherche, IFREMER La Tremblade

Richard THIERY
Directeur de recherche, Anses Laboratoire de Sophia-Antipolis

Vianney PICHEREAU
Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Directeur de thèse

Fabrice PERNET
Cadre de recherche, IFREMER Brest, Co-directeur de thèse

Charlotte CORPOREAU
Cadre de recherche, IFREMER Brest / Directeur scientifique

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Messieurs le professeur Pascal Favrel et le professeur Guillaume Mitta d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Madame Isabelle Arzul et Monsieur Richard Thiéry pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Je remercie L'Ifremer et l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) pour le financement de cette thèse.

Je remercie Pierre Boudry directeur de l'unité de physiologie fonctionnelle des organismes marins pour m'avoir accueillie au sein du PFOM.

Je remercie tout particulièrement et chaleureusement mes directeurs et co-directeurs de thèse de m'avoir offert cette chance. Merci Cha, c'est grâce à toi que cette aventure a commencée pour moi il y a maintenant 6 ans, merci d'avoir toujours cru en moi, pour ton soutien, tes encouragements permanents, et ta bonne humeur à toute épreuve. Vive VDAC ! Merci à Fabrice de m'avoir guidé tout au long de cette thèse, merci pour TEMPO, tes conseils, ton exigence, ta disponibilité et pour nos discussions scientifiques, politiques et écologiques. Merci à Vianney, merci pour tes bons conseils, tes encouragements toujours aux bons moments.

Merci Elo, de m'avoir soutenue, encouragée, pour nos échanges scientifiques, mais aussi pour les bons moments passés ensemble à Lyon, à Seattle et au LPI, le jardinage...

Un grand merci Claudie, pour m'avoir appris le labo, les blots (plus de 100...) pour notre amitié, on en a passé des moments ensemble, il faut que ça continue... en bateau ?

Je tiens à remercier Valérian, mon premier camarade de bureau, pour ta bonne humeur quotidienne, pour le poisson, les échanges de spécialistes avicoles et nos bonnes rigolades (le velociraptor, notre fresque murale disparue trop tôt, les santons dresseurs de serpents du bac à sable...).

Merci Elyne, ma nouvelle camarade de bureau, notre belle année passée ensemble, nos grandes discussions et nos messes basses, nos randonnées à vélo et nos parties de badminton, toujours motivée ! Nos échanges de graines et les petits cadeaux, toujours de bonnes attentions.

Je remercie chaleureusement Philippe toujours bienveillant, tes bons conseils et ton soutien, merci pour ton écoute, pour les bons coups de main, les réparations de vélo...

Un grand merci à Amélie, pour nos échanges scientifiques et de navigation, ton écoute et tes bons conseils.

Merci à Arnaud, Christine et Maellen, pour votre savoir de biomol et les bons moments passés au labo

Merci à Bruno de m'avoir transmis une petite partie de ton savoir-faire expérimental, pour ton aide précieuse sur Tempo, ton regard critique sur nos résultats : la clé pour avancer et nos discussions passionnantes.

Je tiens à remercier toute l'équipe d'Argenton pour votre aide précieuse qui permet de réussir les manips et d'avoir de si beaux résultats.

Merci à l'université de Padova et au Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione d'Agripolis. Ce fut une très belle expérience, quel bel outil le RNAseq. Merci à Marianna pour ta patience, pour le temps que tu m'as accordé, et nos fous-rire... Merci à Luca pour ton aide de m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci à toute l'équipe de m'avoir montré un petit bout de l'Italie.

Merci à ma famille m'avoir depuis toujours donné la curiosité, cet amour pour la mer et la force de caractère qui fait avancer.

Merci à Jeff d'être toujours là pour moi, pour ton implication dans ce travail, pour ton aide si précieuse dans cette épreuve, ta patience pour supporter les longues soirées de rédaction et mon mauvais caractère.

Publications présentées dans le manuscrit

1. **Delisle L**, Petton B, Burguin J-F, Morga B, Corporeau C, Pernet F (2018). Temperature modulates disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 71-79.
2. **Delisle L**, Pauletto M, Petton B, Bargelloni L, Pernet F, Fleury E, and Corporeau C. High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinders progress of Ostreid herpes virus (OsHV-1) and promotes survival (in prep).

Publications non présentées dans le manuscrit

3. **Delisle L**, Fuhrmann M, Quéré C, Pauletto M, Pichereau V, Pernet F, Corporeau C (2018). The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* is up accumulated during infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): an indicator of the Warburg Effect. *Mar. Biotechnol.* 20, 87–97.
4. Fuhrmann M, **Delisle L**, Petton B, Corporeau C, Pernet F (2018). Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biol. Open* 7, bio028134.
5. Curd A, Pernet F, Firth L, **Delisle L**, Corporeau C, Nunes F and Dubois S (2018). Connecting organic to mineral: How the physiological state of an ecosystem-engineer is linked to its habitat structure. *Ecol. Indic.* 98, 49–60. <https://doi.org/S1470160X18308161>

Communications orales

Delisle L, Petton B, Burguin JF, Quéré C, Artigaud S, Pichereau V, Corporeau C and Pernet F, High temperature induces a metabolic response in the oyster *Crassostrea gigas* which enhance survival during infection by the ostreid herpesvirus 1: National Shellfisheries Association, Seattle, 2018.

Delisle L, Petton B, Burguin JF, Quéré C, Artigaud S, Pichereau V, Corporeau C, Pernet F, How does high temperature influence the survival of the oyster *Crassostrea gigas* during infection by the Ostreid herpesvirus (OsHV-1)? : Physiomar, Cambridge, 2017.

Delisle L, Petton B, Burguin JF, Quéré C, Artigaud S, Pichereau V, Corporeau C, Pernet F, High temperature induces a metabolic response in the oyster *Crassostrea gigas* which enhance survival during infection by the ostreid herpes virus: Meeting of Vivaldi European project « Preventing and mitigating farmed bivalve diseases », 2017.

Table des matières

Introduction	14
Etat de l'Art	18
I. Influence de la température sur les organismes marins.....	19
1. Aspects moléculaires de l'acclimatation à la température.	22
a. Les protéines et activités enzymatiques	22
b. Les membranes cellulaires	24
2. Aspects cellulaires et physiologiques.....	28
II. Les interactions hôte-pathogène en milieu marin : le rôle clé de la température dans l'émergence, la transmission et la persistance des maladies	30
1. Température, émergence et stabilité des pathogènes	32
• Les virus marins	32
2. La température module la sensibilité de l'hôte face aux pathogènes.....	33
a. La fièvre des homéothermes	33
b. Fièvre comportementale	33
c. Température et sensibilité aux pathogènes chez les invertébrés	35
• Les effets délétères	35
• Les effets bénéfiques	36
III. Le cas spécifique de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> et du virus OsHV-1	37
1. L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	37
2. <i>Crassostrea gigas</i> et la température	38

a.	Tolérance thermique.....	38
b.	Ecophysiologie.....	39
c.	Réponses transcriptomiques et protéiques.....	39
d.	Biogéographie.....	41
3.	Huîtres creuses et pathogènes.....	42
4.	L'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1).....	42
a.	Distribution géographique d'OsHV-1.....	43
b.	Transmission virale.....	43
c.	Structure d'OsHV-1.....	46
d.	Le Génome d'OsHV-1.....	47
e.	Mécanismes d'infection de <i>C. gigas</i> par OsHV-1.....	49
5.	Mécanismes de défense contre les pathogènes chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	52
a.	Réponse immunitaire innée chez <i>C. gigas</i>	52
•	La réponse immunitaire innée à médiation cellulaire.....	53
•	La réponse immunitaire innée à médiation humorale.....	59
b.	Une mémoire immunitaire chez l'huître creuse ?.....	63
•	Amorçage immunitaire « immune priming ».....	63
6.	Effets de la température sur l'interaction <i>C. gigas</i> -OsHV-1.....	64
IV.	Objectifs de thèse.....	66
Chapitre 1 : Modulation de la susceptibilité de <i>C. gigas</i> et de la virulence d'OsHV-1 par l'exposition des huîtres à hautes températures.....		
		69

• Présentation de l'article 1	70
• Conclusion de l'article 1	81
Chapitre 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la réduction des mortalités d'huîtres creuses causées par OsHV-1 à 29°C.	83
• Présentation de l'article 2 (in prep)	84
• Conclusion de l'article 2	111
Discussion générale et perspectives	112
I. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'interaction <i>C. gigas</i> - OsHV-1.	114
1. Caractériser l'effet de la température sur <i>C. gigas</i>	114
2. Identifier la gamme thermique de performance d'OsHV-1.	115
3. Rôle du métabolisme énergétique dans la réplication d'OsHV-1	116
II. Optimisation de l'exposition des huîtres à hautes températures	117
1. Quelle serait la température optimale ?	117
2. Quelle durée d'exposition à haute température ?	119
3. Quand exposer les huîtres aux hautes températures ?	120
4. Des immersions « flash » à haute température ?	120
III. Conclusion.....	121
Références bibliographiques	122
Annexes.....	148

Liste des Figures

Figure 1 : Influence des paramètres environnementaux sur les hôtes et les agents pathogènes dans le milieu marin (Burge et al., 2014).	15
Figure 2 : Courbe hypothétique représentant la performance d'un ectotherme en fonction de sa température interne (Bayne ; 2017).....	20
Figure 3 : Distribution du nombre de molécules en fonction de leur énergie cinétique illustrant la Loi d'Arrhenius (Arrhenius ; 1889)	22
Figure 4 : Schéma hypothétique présentant la relation hypothétique entre la gamme de tolérance thermique définie pour un organisme (en trait plein) et l'expression des HSP inductibles chez une espèce vivant dans la zone intertidale (Tomanek 2008). T_{on} représente la température minimale à laquelle sont induites les HSP qui correspond à des températures hautes de la gamme de tolérance de l'organisme. La concentration des HSP augmente jusqu'à un maximum (T_{peak}) offrant une protection jusqu'aux températures de tolérance hautes critiques de l'espèce (T_{off}).	24
Figure 5 : Effet de la température sur la phase et l'ordre de la bicouche lipidique (Hochachka and Somero, 2002, selon Hazel et al., 1995).....	25
Figure 6: Représentation schématique d'un lipide (A) et de l'organisation des membranes plasmiques (B).....	27
Figure 7 : Evolution du taux métabolique standard mesuré chez <i>Crassostrea virginica</i> exposée à trois températures (Dame, 1972).	28
Figure 8 : La figure présente les performances d'un organisme en fonction de la température (Kassahn et al, 2009) . Les traits pleins font référence à la croissance individuelle et l'abondance des organismes dans la population, les traits pointillés représentent la capacité métabolique aérobie et la ligne alternant pointillés et tirets illustre l'évolution du stress au niveau cellulaire et moléculaire.....	29
Figure 9 : Courbes de performance d'un ectotherme en rouge (réponse immunitaire, croissance, survie) et de son parasite en noir. En A les courbes de performance se superposent, en B elles sont décalées réduisant la zone thermique d'interaction (hachuré bleu), (Adapté d'après Blanford and Thomas, 2003)	31

Figure 10 : Réponse fébrile chez les vertébrés ectothermes (issu de Kluger 1979).....	34
Figure 11: Fenêtres thermiques auxquelles la ponte, la croissance, la nutrition, et la survie sont observées chez <i>C. gigas</i>	38
Figure 12 : Représentation des modèles mathématiques reliant le taux de filtration (à gauche) et la consommation d'Oxygène (à droite) à la température et à la masse d'huîtres (Bougier et al, 1995).....	39
Figure 13 : Classification fonctionnelle des séquences différentiellement exprimées dans les branchies et le manteau d'huîtres <i>C. gigas</i> après 10 jours exposés en eau de mer à 25°C ou à 13°C. (Meistertzheim et al, 2007)	40
Figure 14 : Simulation de la distribution spatiale de la date de ponte le long des côtes européennes lors d'une année froide en 1986 et d'une année chaude 2003. Aucune ponte n'a lieu dans les zones blanches. (Thomas et al, 2016).....	41
Figure 15 : Répartition mondiale d'OsHV-1 et ses variants (Segarra ; 2014).....	43
Figure 16 : Schéma présentant les différentes méthodes expérimentales d'infection des huîtres creuses par OsHV-1. Les cercles orangés représentent les particules virales d'OshV-1, tandis que les bactéries associées apparaissent en vert.	45
Figure 17 : Structure d'une particule virale de type herpesvirus	46
Figure 18 : Reconstruction microscopique de la capsid de l'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1). A : structure extérieure, B : surface intérieure, C : coupe centrale de la capsid (Davison et al., 2005).	47
Figure 19 : Organisation du génome d'OsHV-1 (Davison et al., 2005; Segarra et al., 2015)..	48
Figure 20 : Cycle de multiplication des herpes virus simplex dans une cellule permissive (Pasquier et al., 2013).....	49
Figure 21 : Phagocytose et lyse intracellulaire des microbes.....	54
Figure 22 : Voies de signalisation régulant l'apoptose (Martenot et al., 2017).....	59
Figure 23 : Réponses antivirales chez l'huître creuse déduites à partir de séquences identifiées dans le génome de <i>C. gigas</i> et des systèmes antiviraux connus des insectes et des vertébrés. TIR, Toll/IL1 receptor; Ig, immunoglobulin; DD, death domain; LRR, leucine rich repeat; TM, transmembrane; PKc, protein kinase c; RHD, rel homology domain; IPT,	

immunoglobulin-like fold; RING, RING-finger (really interesting new gene) domain; zf-TRAF, TRAF type zinc finger; MAT, meprin and TRAF-C homology domain; UBL-TBK1-like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins (Green et al., 2015).

Figure 24 : Enzymes du système antioxydant impliquées dans la production et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (en rouge) ou de l'azote (en bleu) présents dans les hémocytes, le compartiment intracellulaire (mitochondrie, peroxyosome, cytoplasme) et extracellulaire chez les bivalves (Richard et al., 2016). 62

Figure 25 : Effet des très hautes températures sur la survie d'huîtres receveuses infectées par cohabitation avec des huîtres donneuses et maintenues à 21°C, 29°C, 31°C ou 33°C. 118

Sigles et Abréviations

AbHV: Abalone Herpes Virus

ADAR-L: Adenosine Deaminase RNA Specific

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ALDH: Aldéhyde Déshydrogénase

ARN: Acide Ribonucléique

ATPase: Adénosine-Triphosphatase

BIR: Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat

CAT: Catalase

DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern

ERA: Espèces Réactives de l'Azote

FAO: Food and Agriculture Organisation

GPx: Glutathions Peroxydases

GST: Glutathion-S-Transférase

HSP: Heat Shock Protein

HSV: Herpes Simplex Virus

IE: Immediate early

IFI44: Interferon Induced Protein 44

iNOS: Oxyde Nitrique Synthase

IR: Région Répétée Interne

ISG: Interferons Stimulating Genes

JAK: Janus Kinase

MDA: Malondialdéhyde

MDH: Malate Déshydrogénase

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NPI: Necrose Pancreatic Infection

NSI: Naissains Standardisés Ifremer

ORF: Open Reading Frame

OSHV-1: Ostreid Herpes Virus de type 1

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern

PC: Phosphatidylcholine

PE: Phosphatidylethanolamine

PGE: Prostaglandine

proPO: pro-Phénoloxydase

qPCR: PCR quantitative

RIG: Retinoic acid-Inducible Gene

RLR: RIG Like Receptors

ERA: Espèces réactives de l'azote

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

SOC: Suppressor of Cytokine

SOD: Superoxyde Dismutase

SPF: Specific Pathogen Free

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STING: Stimulator of Interferon Genes

TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TLR: Toll Like Receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFRSF14: TNF Receptor Superfamily Member 14

TR: Région répétée terminale

TrxP: Thiorédoxine peroxydase

UL: Unique Long

US: Unique Short

VHSV: Viral Hemorrhagic Septicemia Virus

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

WSSV: White Spot Syndrome Virus

La mer est un espace de rigueur et de liberté.

Victor Hugo

Introduction

Les virus, les bactéries et les parasites ont de tout temps influencé le fonctionnement des écosystèmes régulant la structure des communautés ou les interactions trophiques. L'homme par la modification de l'environnement ou les pratiques d'élevage a favorisé dès le néolithique l'émergence de nouvelles niches pour les pathogènes conduisant à d'importantes épizooties (Renaud, 2014).

Depuis une trentaine d'années, les maladies marines s'intensifient et touchent une grande diversité d'organismes, des vertébrés (mammifères ou reptiles) aux invertébrés comme les coraux, les échinodermes ou encore les mollusques (Harvell et al., 2002; McCallum et al., 2004; Ward and Lafferty, 2004). En milieu marin comme terrestre, le risque de maladie dépend de la triple interaction hôte-pathogène-environnement (Figure 1).

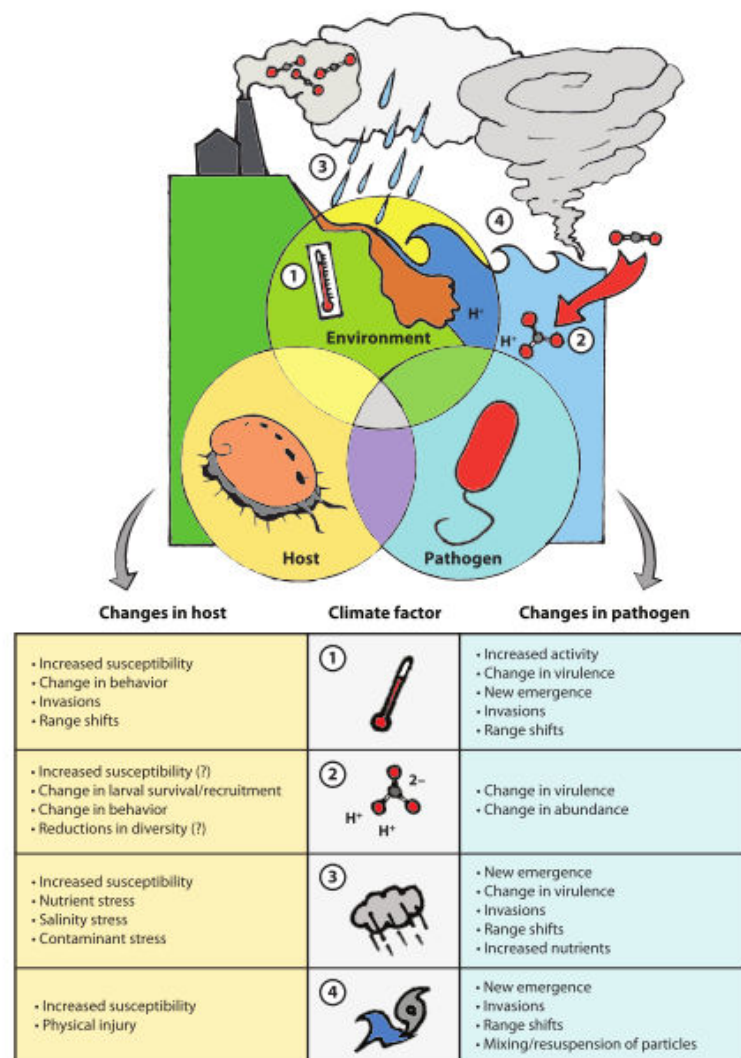


Figure 1 : Influence des paramètres environnementaux sur les hôtes et les agents pathogènes dans le milieu marin (Burge et al., 2014).

Toute modification d'au moins un de ces composants peut faire basculer l'interaction vers un état pathologique ou non (Burge et al., 2014). Le contexte actuel est au changement climatique et se caractérise par une augmentation de la température moyenne, des modifications des précipitations (conduisant à des modifications de salinité), et un nombre grandissant de phénomènes météorologiques extrêmes (GIEC, 2018). De telles modifications des paramètres environnementaux pourraient conduire à l'intensification des épizooties (Burge et al., 2014).

Depuis l'introduction de l'huître creuse dans différents pays du monde comme en France, d'importants phénomènes de mortalités ont été observés chez *C. gigas*. Avant 2008, ces épisodes affectaient parfois jusqu'à 50 % des populations exploitées. Ces mortalités semblent être liées à des infections virales et /ou bactériennes et ont lieu généralement pendant les mois les plus chauds de l'année. L'origine de ces mortalités est multifactorielle et des facteurs de risque ont été identifiés : (i) la température (> 19 °C), (ii) la maturité sexuelle de l'huître (iii) la prédisposition génétique et (iv) la présence d'agents pathogènes, dont l'herpèsvirus OsHV-1 et des bactéries du genre *Vibrio*, (v) des conditions environnementales stressantes (pollution chimique, changement de salinité) (Samain and McCombie, 2008).

Depuis 2008, de sévères épisodes de mortalités affectent les huîtres âgées de moins d'un an dans la majorité des pays producteurs (Clegg et al., 2014; Jenkins et al., 2013; Paul-Pont et al., 2014; Peeler et al., 2012). L'origine de cette mortalité est imputée à l'émergence d'un nouveau variant de l'Ostreid herpèsvirus OsHV-1, le variant μ var (EFSA, 2010; Segarra et al., 2010).

Les génomes de l'huître creuse et d'OsHV-1 ont été séquencés (Davison et al., 2005; Zhang et al., 2012), et de nombreuses études transcriptomiques ont rendu possible la description de ce pathosystème complexe (de Lorgeril et al., 2018; Jouaux et al., 2013; Rosani et al., 2015a; Segarra et al., 2014b). Récemment, la maîtrise de l'infection expérimentale en milieu contrôlé a permis de préciser les rôles d'OsHV-1 et des bactéries associées dans le processus infectieux conduisant à la mort des huîtres (de Lorgeril et al., 2018). Néanmoins, une série de facteurs supplémentaires sont connus pour influencer sur la maladie. Parmi les facteurs environnementaux, la température semble jouer un rôle déterminant dans le déclenchement des mortalités causées par OsHV-1 (Pernet et al., 2014a; Petton et al., 2013; Renault et al., 2014) et constitue une piste d'intérêt dans la gestion et la prévention des risques de mortalité de l'huître creuse.

Cette thèse vise à comprendre l'effet des hautes températures sur l'interaction *C. gigas*-OsHV1 (Chapitre 1), puis à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réduction des mortalités à haute température (Chapitre 2).

Pour répondre à ces objectifs, une infection expérimentale a été réalisée à trois températures (21°C, 26°C et 29°C) et associée à un suivi des mortalités, à des dosages d'ADN viral et à un suivi de l'expression de quelques gènes viraux. Dans un second temps les mécanismes moléculaires mis en jeu chez les huîtres infectées à 29°C et 21°C ont été étudiés par des approches transcriptomiques et biochimiques.

Etat de l'Art

I. Influence de la température sur les organismes marins

Le milieu intertidal, appelé aussi zone de balancement des marées ou estran, désigne la partie du littoral délimitée par les hautes mers de vives eaux et les basses mers de vives eaux. L'alternance des périodes d'immersion et d'exondation s'accompagne pour les organismes qui y vivent d'importantes variations des paramètres environnementaux tels que la température, la salinité, la disponibilité en oxygène ou en nutriments.

La plupart des organismes intertidaux sont **ectothermes stricts**, ainsi leur température corporelle est pratiquement équivalente à celle du milieu extérieur et suit ses fluctuations thermiques. Par opposition, on qualifie d'homéothermes les organismes qui maintiennent une température corporelle stable en régulant leur production de chaleur (endotherme) ou en contrôlant les échanges thermiques avec l'environnement. Les ectothermes stricts ne possèdent aucun moyen anatomique ou physiologique permettant de maintenir un gradient thermique entre leur milieu interne et l'environnement. Cependant, certains organismes intertidaux, mobiles, se déplacent et parviennent à maintenir une température interne plutôt stable ; comme par exemple les crustacés (Lagerspetz and Vainio, 2006), contrairement aux organismes sessiles, tels que les huîtres, définitivement fixés, dits **poïkilothermes**.

Durant les périodes d'immersion, la température interne des organismes poïkilothermes est équivalente à celle de l'eau de mer environnante tandis que lors de l'émersion à marée basse, elle est influencée par les facteurs climatiques tels que la température de l'air, l'orientation du substrat, la vitesse du vent, la couverture nuageuse, le rayonnement solaire et l'humidité. Des études réalisées sur des moules ont montré que la variation de la quantité de chaleur emmagasinée dans un ectotherme était également influencée par sa taille, sa morphologie mais aussi par sa couleur et les composants de la coquille (Helmuth, 2002, 1998). Ainsi, les températures extrêmes rencontrées à marée basse dépassent largement celles atteintes durant les périodes d'immersion.

Le déploiement de capteurs thermiques endogènes dans le naissain d'huître *C. gigas* a permis de montrer qu'en rade de Brest, la température endogène de l'huître pouvait varier de 3.3°C à 39.9°C en période d'exondation (*Com pers. C. Corporeau*).

Les êtres vivants partagent une même base biochimique structurale et sont soumis aux mêmes lois physico-chimiques. Cependant les gammes thermiques tolérées varient selon les organismes considérés.

Pour chaque espèce, il est possible de définir les températures dites optimales, critiques et létales et de déterminer la fenêtre de tolérance thermique. Celle-ci se résume par une courbe asymétrique non linéaire (Figure 2). L'intervalle entre les températures létales constitue la zone de tolérance thermique (Angilletta et al., 2016; Huey and Kingsolver, 1989; Thomas and Blanford, 2003), autrement dit la gamme de températures auxquelles la performance d'un organisme n'est pas nulle (Bale, 1996; Gilchrist, 1995).

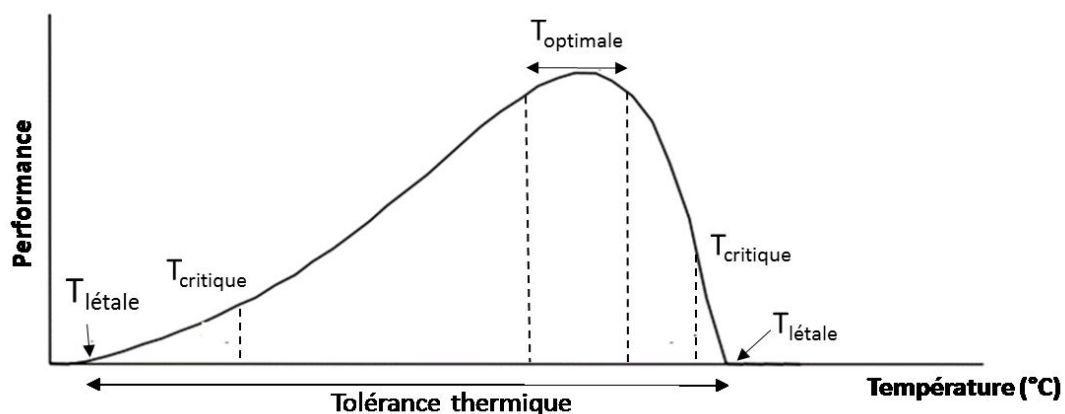


Figure 2 : Courbe hypothétique représentant la performance d'un ectotherme en fonction de sa température interne (Bayne ; 2017)

Les organismes capables de tolérer de grandes variations thermiques sont dits : **eurythermes**, au contraire des **sténothermes** qui ne peuvent vivre que dans une gamme de températures restreinte comme, par exemple, de nombreuses espèces antarctiques.

Chez un organisme, la capacité métabolique standard ou de maintenance représente le coût métabolique nécessaire au maintien des fonctions vitales. Chez les bivalves, cette énergie permet la maintenance des gradients transmembranaires, du système digestif, l'osmorégulation, le turn-over des protéines structurales, la tension du muscle adducteur (fermeture de la coquille), la production de mucus et la réparation de la coquille (Bayne, 2017). Le coût énergétique de la maintenance est incompressible mais peut augmenter lors d'un stress. A ce

coût s'ajoutent ceux de la croissance et de la reproduction qui nécessitent des apports énergétiques importants fournis par les nutriments et les réactions cataboliques associées. L'allocation d'énergie à ces activités varie au cours de la vie des organismes mais également selon les facteurs environnementaux qui peuvent moduler la disponibilité en oxygène et en nutriments du milieu (Kooijman, 2009).

Aux températures optimales, les coûts de la maintenance de l'organisme sont largement couverts, l'oxygène n'est pas limitant et grâce au métabolisme aérobie, de l'énergie est investie dans la croissance et la reproduction. On dit alors que la performance de l'individu est maximale (Kassahn et al., 2009).

Lorsque les températures s'éloignent de l'optimum thermique, des perturbations moléculaires surviennent et sont susceptibles d'altérer le fonctionnement de l'organisme et induisent l'augmentation des coûts de maintien. Ainsi, l'énergie habituellement allouée à la croissance ou à la reproduction est déviée et investie dans la tolérance et la résistance aux stress sous forme de compromis énergétiques (Kooijman, 2009). A long terme, ces compromis énergétiques peuvent entraîner une diminution des réserves énergétiques voire la mort de l'individu.

La majorité des organismes intertidaux sont eurythermes et ont développé des mécanismes variés permettant de maintenir un métabolisme actif lors des variations thermiques imposées par le milieu intertidal. Les réponses des organismes aux variations de paramètres environnementaux sont de deux types. **L'acclimatation** est une réponse individuelle, rapide et réversible qui correspond à la réaction physiologique d'accommodation d'un individu à un changement de son environnement (par exemple un changement de température) sans modification de son patrimoine génétique. A la différence de l'acclimatation, **l'adaptation** est un processus graduel et irréversible qui consiste en des modifications du génotype induites par la sélection naturelle. Elle se traduit par des modifications morphologiques, physiologiques, développementales ou comportementales au sein d'une population. Ces modifications sont héréditaires et peuvent s'installer dans une population lorsqu'elles améliorent les chances de survie et de reproduction de l'individu qui les porte.

1. Aspects moléculaires de l'acclimatation à la température.

Les variations de température affectent profondément la structure et l'activité des protéines, mais également la structure des membranes biologiques (Hochachka and Somero, 2002). Les organismes ont développé de nombreux mécanismes permettant de réguler les réactions chimiques et de stabiliser les molécules, mais ces processus sont coûteux et lorsque les changements de températures sont trop importants ou brutaux la survie des organismes est compromise.

a. Les protéines et activités enzymatiques

La loi d'Arrhenius décrit, de manière générale, que la vitesse des réactions chimiques augmente avec la température (Arrhenius, 1889). L'énergie d'activation représente l'énergie minimale nécessaire pour que deux molécules (exemple enzyme/substrat) réagissent entre-elles (Figure 3). Plus la température est élevée, plus il y a de molécules possédant une énergie cinétique supérieure à l'énergie d'activation requise (zone hachurée bleue > zone hachurée verte, Figure 3). Ainsi, une hausse de la température accroît la proportion de molécules capables de réagir et par conséquent augmente la vitesse de réaction.

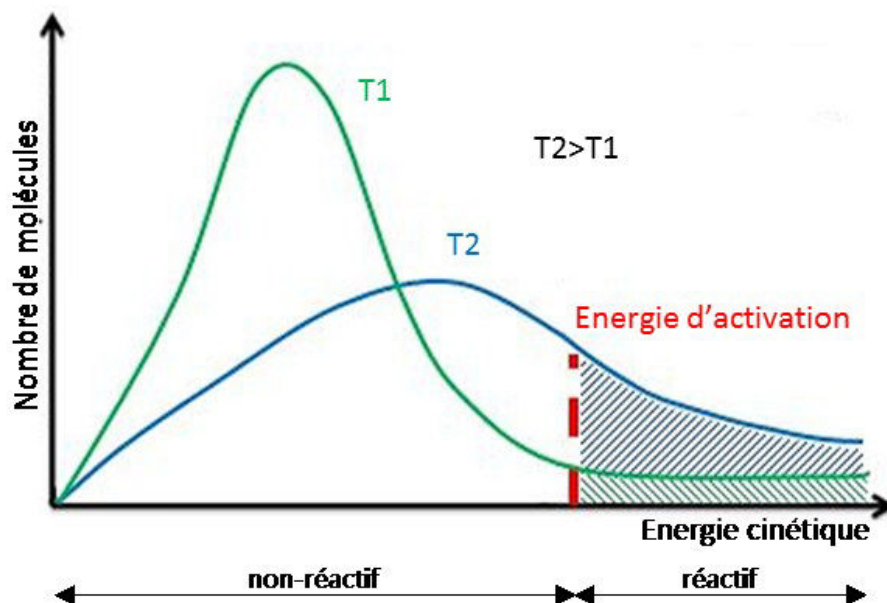


Figure 3 : Distribution du nombre de molécules en fonction de leur énergie cinétique illustrant la Loi d'Arrhenius (Arrhenius ; 1889)

Le Q10 décrit le coefficient de température d'une réaction chimique. C'est le facteur par lequel la vitesse d'une réaction chimique est multipliée lorsque la température est augmentée de 10°C. Pour la plupart des réactions physiologiques comme la respiration, le Q10 se situe entre 2 et 3 (Hochachka and Somero, 2002).

Cette relation reliant la vitesse de réaction enzymatique et la température n'est valable que jusqu'à un certain seuil thermique. Au-delà, l'augmentation de la température induit une augmentation des énergies de vibration et de rotation qui conduit à la rupture des liaisons faibles, impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle, sans rupture des liaisons peptidiques. Elle provoque une perte de l'activité catalytique et biologique, souvent associée à une diminution de la solubilité et une plus grande sensibilité aux protéases (Fagain, 1997). La majorité des protéines sont dénaturées à une température d'environ 100°C ; cependant, la température de dénaturation est influencée par la structure des protéines et la présence par exemple de ponts disulfures qui améliorent leur stabilité.

Afin de maintenir le fonctionnement cellulaire actif, quelle que soit la température, les espèces ont mis en place différentes stratégies de compensation.

De nombreuses enzymes modifient leur conformation à l'état actif, afin de maintenir un équilibre optimal entre rigidité et flexibilité de la structure à des températures normales de fonctionnement. Par exemple, la stabilité de la malate déshydrogénase (MDH) chez des espèces de gastéropodes augmente en fonction de leur distribution verticale sur l'estran (Somero, 2002). Cependant, la stabilité de l'enzyme semble rapidement limitée avec l'augmentation des températures. L'auteur suggère que la stabilité de la MDH serait favorisée aux températures plus basses assurant la fonctionnalité de l'enzyme lors de l'immersion, période d'importantes disponibilités en oxygène, en nutriments et de forte activité métabolique, plutôt que lors de l'émersion.

En réponse aux hautes températures, les organismes synthétisent des protéines chaperonnes inductibles comme les Heat shock protein (HSP). Il s'agit de protéines capables de s'associer de manière transitoire aux protéines partiellement dénaturées en les stabilisant elles empêchent une dénaturation supplémentaire. Les HSPs peuvent ensuite participer à leur renaturation lors du retour à des températures plus basses. Lorsque les protéines sont dénaturées de manière

irréversible, les HSPs facilitent l'insertion des protéines endommagées dans les voies protéolytiques de la cellule (Feder and Hofmann, 1999; Hofmann and Todgham, 2010). Les HSPs sont synthétisées lorsque la température ambiante se rapproche de la limite thermique de l'organisme afin de maintenir non seulement l'intégrité des cellules, mais également la stabilité du pool protéique et des fonctions cellulaires (Hofmann and Todgham, 2010, Figure 4). Chez les espèces intertidales, les HSPs sont induites dès que la température atteint des valeurs hautes de la gamme de tolérance de l'organisme. A partir du seuil thermique d'induction, la concentration des HSPs est augmentée et ce, jusqu'aux températures maximales tolérées par l'organisme (Tomanek, 2008).

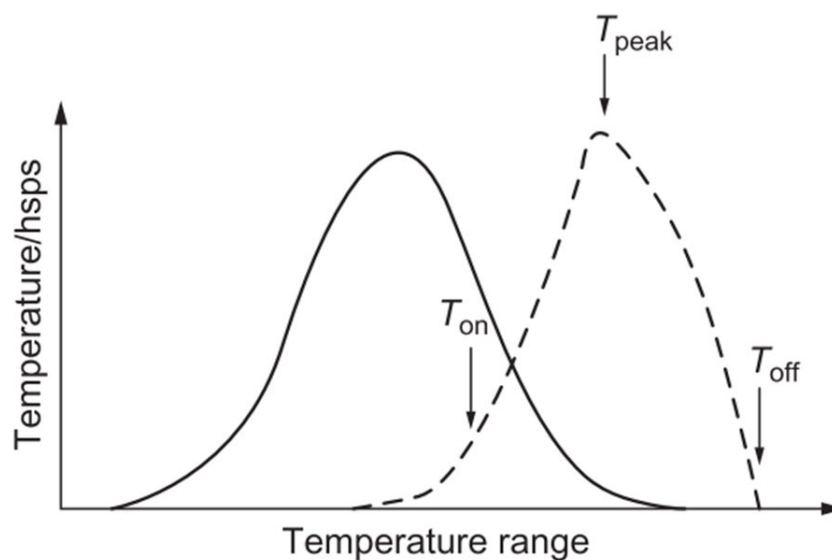


Figure 4 : Schéma hypothétique présentant la relation hypothétique entre la gamme de tolérance thermique définie pour un organisme (en trait plein) et l'expression des HSP inductibles chez une espèce vivant dans la zone intertidale (Tomanek 2008). T_{on} représente la température minimale à laquelle sont induites les HSP qui correspond à des températures hautes de la gamme de tolérance de l'organisme. La concentration des HSP augmente jusqu'à un maximum (T_{peak}) offrant une protection jusqu'aux températures de tolérance hautes critiques de l'espèce (T_{off}).

b. Les membranes cellulaires

Les membranes cellulaires sont des structures particulièrement sensibles à la température (Hazel, 1995). A température physiologique, la bicouche lipidique est fluide (phase liquide cristalline), c'est-à-dire à l'équilibre entre flexibilité et ordre dans la membrane (Figure 5). A faible température, le mouvement des chaînes carbonées des acides gras est réduit : elles

s'alignent et se resserrent. Il en résulte une diminution des activités protéiques liées à la membrane, voire la formation d'agrégats et la dénaturation des membranes à très faible température (passage en phase gel, Figure 5).

Au contraire, lorsque la température augmente, les mouvements des chaînes carbonées sont accrus : les phospholipides adoptent une forme conique par l'augmentation de l'angle des chaînes carbonées au niveau de la tête polaire. Il en résulte une augmentation de la fluidité membranaire et donc des activités métaboliques associées. Une hausse trop importante de la température induit une dénaturation de la membrane (Figure 5) et son passage en phase hexagonale inversée (Hochachka and Somero, 2002).

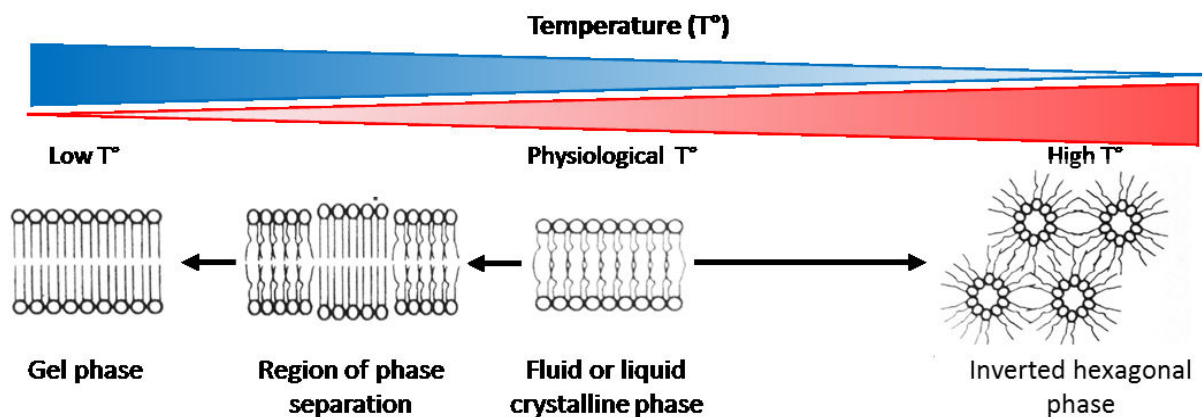


Figure 5 : Effet de la température sur la phase et l'ordre de la bicouche lipidique (Hochachka and Somero, 2002, selon Hazel et al., 1995)

Afin de préserver les activités des protéines membranaires quelle que soit la température du milieu, les organismes tentent de maintenir leurs membranes en phase liquide cristalline par l'**adaptation homéovisqueuse** (Hayward et al., 2007; Sinensky, 1974). Le maintien de la fluidité des membranes lors de changements de température s'effectue principalement par des modifications de composition lipidique dans la bicouche, au niveau des classes de phospholipides, des espèces moléculaires d'acides gras mais aussi du contenu en cholestérol.

En réponse à des températures supérieures à la température optimale, les organismes ont tendance à augmenter la quantité de Phosphatidylcholine (PC) de forme cylindrique au détriment de la Phosphatidylethanolamine (PE) de forme conique (Hochachka and Somero,

2002). De plus, l'indice d'insaturation (nombre de double liaisons pour 100 moles d'acides gras) de la PC et la PE est négativement corrélé avec la température d'adaptation des organismes (Logue et al., 2000). Finalement, une augmentation du contenu en cholestérol permet de compenser l'hyperfluidité de la membrane survenant lors d'une augmentation soudaine de la température (Crockett, 1998).

Plusieurs études ont mis en évidence la réponse homéovisqueuse des membranes en réponse à des variations de température chez des espèces de bivalves intertidaux, telles que la moule *Mytilus californianus* (Williams and Somero, 1996), la praire *Mercenaria mercenaria* (Parent et al., 2008), l'huître américaine *Crassostrea virginica* et la moule bleu *Mytilus edulis* (Pernet et al., 2008), montrant principalement des changements dans l'indice d'insaturation des phospholipides et une augmentation des acides gras 20:5 (n-3) et 22:6 (n-3) à basses températures.

En 1999, une étude suggère pour la première fois que la composition des membranes pouvait réguler l'activité métabolique globale des organismes (Hulbert and Else, 1999). En effet, la fluidité des membranes influence la vitesse de réaction des protéines membranaires telles que les pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase par exemple. Ainsi, les espèces possédant plus d'acides gras polyinsaturés dans leurs membranes et plus particulièrement du 22:6 (n-3) ont des taux métaboliques de base supérieurs aux espèces qui en ont moins (Hulbert, 2007; Hulbert and Else, 2000, 1999). Ces hypothèses ont été vérifiées chez la truite où la teneur en 22:6 (n-3) dans le régime alimentaire influence les lipides membranaires et augmente l'activité mitochondriale (Guderley et al., 2008).

Les membranes lipidiques

Les membranes sont des barrières physiques délimitant les différents compartiments cellulaires, ainsi que la limite entre l'organisme et le milieu extérieur. Elles jouent un rôle d'interface abritant les transporteurs et gouvernant les mouvements transmembranaires de molécules et elles interviennent dans les processus bioénergétiques tels que l'établissement de gradients de protons et d'électrons dans la chaîne respiratoire par exemple.

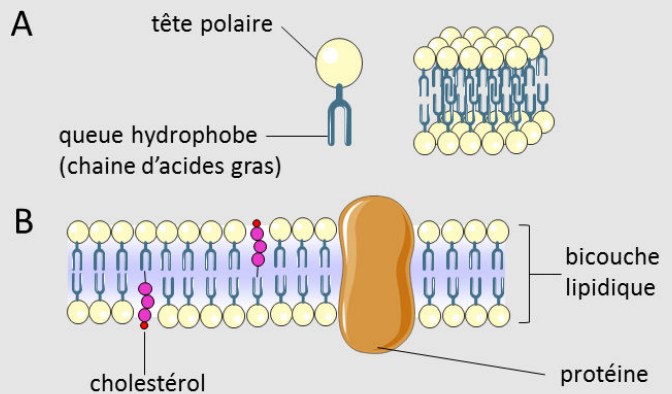


Figure 6: Représentation schématique d'un lipide (A) et de l'organisation des membranes plasmiques (B)

Composition des membranes : Les membranes sont constituées d'un assemblage de lipides (phospholipides, glycolipides et cholestérols) et de protéines. Elles sont organisées en double feuillet (bicouche), liés ensemble par des liaisons non-covalentes (Figure 6, B). Les phospholipides sont constitués d'une tête polaire hydrophile, orientée vers l'extérieur et d'une queue hydrophobe (chaînes d'acides gras saturés ou insaturés) orientée vers l'intérieur (Figure 6, A). Il existe une grande diversité de phospholipides dans les membranes biologiques : ils diffèrent par la nature de leur tête polaire (phospho-choline, phospho-éthanolamine, sérine et phospho-inositol) et par les acides gras qui les composent. Les différents types de phospholipides sont organisés en micro-domaines fonctionnels. Chaque micro-domaine présente une fluidité compatible avec les changements de conformation des protéines. Il s'agit de zones privilégiées pour l'activité des protéines qui sont indispensables à la signalisation cellulaire, aux processus d'exocytose et à l'entrée de différents virus (Brogden et al., 2015; Brugger et al., 2006; Xie et al., 2012).

Fluidité des membranes : La fluidité d'une membrane est influencée par le niveau d'insaturation des résidus acides gras des phospholipides, la teneur en cholestérol et la nature des têtes polaires des phospholipides. En effet, l'incorporation de phospholipides avec une chaîne d'acide gras insaturée fluidifie la membrane. Au contraire, le cholestérol rigidifie la membrane en gênant la diffusion latérale des éléments lorsqu'il est présent en grande quantité, alors qu'il fluidifie la membrane en gênant les interactions de Van der Waals en quantité normale.

2. Aspects cellulaires et physiologiques

Il existe un concept d'intolérance thermique lié à l'oxygène chez de nombreux organismes comme les mollusques. En effet, le manque d'oxygène cellulaire constitue souvent la première cause d'intolérance à la température, alors même qu'il est disponible en quantité suffisante dans l'environnement (Pörtner, 2010; Pörtner et al., 2004).

La hausse des températures entraîne chez les organismes une augmentation de la vitesse des réactions chimiques et physiologiques, ainsi que des coûts de maintien des structures cellulaires. Il en résulte chez les organismes une hausse de la demande cellulaire en oxygène et en énergie comme l'illustre la Figure 7. Pour répondre à cette demande, les organismes accroissent leurs capacités cardiaques et respiratoires (Bayne, 2017; Pörtner, 2001)

Species	Conditions	Standard metabolic rate ($\mu\text{mol.gDW}_{-1}.\text{h}^{-1}$)
<i>Crassostrea virginica</i>	Oysters unfed for 2 days after 7-21 days at 35 psu	10°C: 8.7 20°C: 14.3 30°C: 20.0

Figure 7 : Evolution du taux métabolique standard mesuré chez *Crassostrea virginica* exposée à trois températures (Dame, 1972).

Alors que la demande en oxygène continuera d'augmenter avec la hausse des températures, les possibilités d'adaptation cardiaques et respiratoires atteignent un plateau. Il apparaît alors un déséquilibre entre l'augmentation de la demande cellulaire en oxygène et la capacité de distribution par le système cardiorespiratoire (Frederich and Pörtner, 2000). Les températures auxquelles cette dette survient sont qualifiées de « **températures de péjus** », (Figure 8, Kassahn et al., 2009). Le métabolisme aérobie est alors réduit et entraîne une diminution de l'énergie disponible pour les fonctions de croissance et de reproduction. Lorsque les températures s'éloignent encore de l'optimum thermique, une hypoxie sévère survient, le métabolisme bascule alors en anaérobie signifiant l'atteinte des **températures critiques** (Kassahn et al., 2009). Le passage à l'anaérobiose s'accompagne de l'arrêt de la croissance et de la reproduction. L'hypoxie produit un stress oxydant et l'accumulation d'espèces réactives

de l'oxygène (ROS) qui provoquent l'induction de la réponse antioxydante. Aux températures létales (Figure 8), les systèmes de défense et de compensation sont inhibés, les structures cellulaires sont directement endommagées par la température et les ROS. De plus, la dette en oxygène est maximale et entraîne la mort de l'organisme.

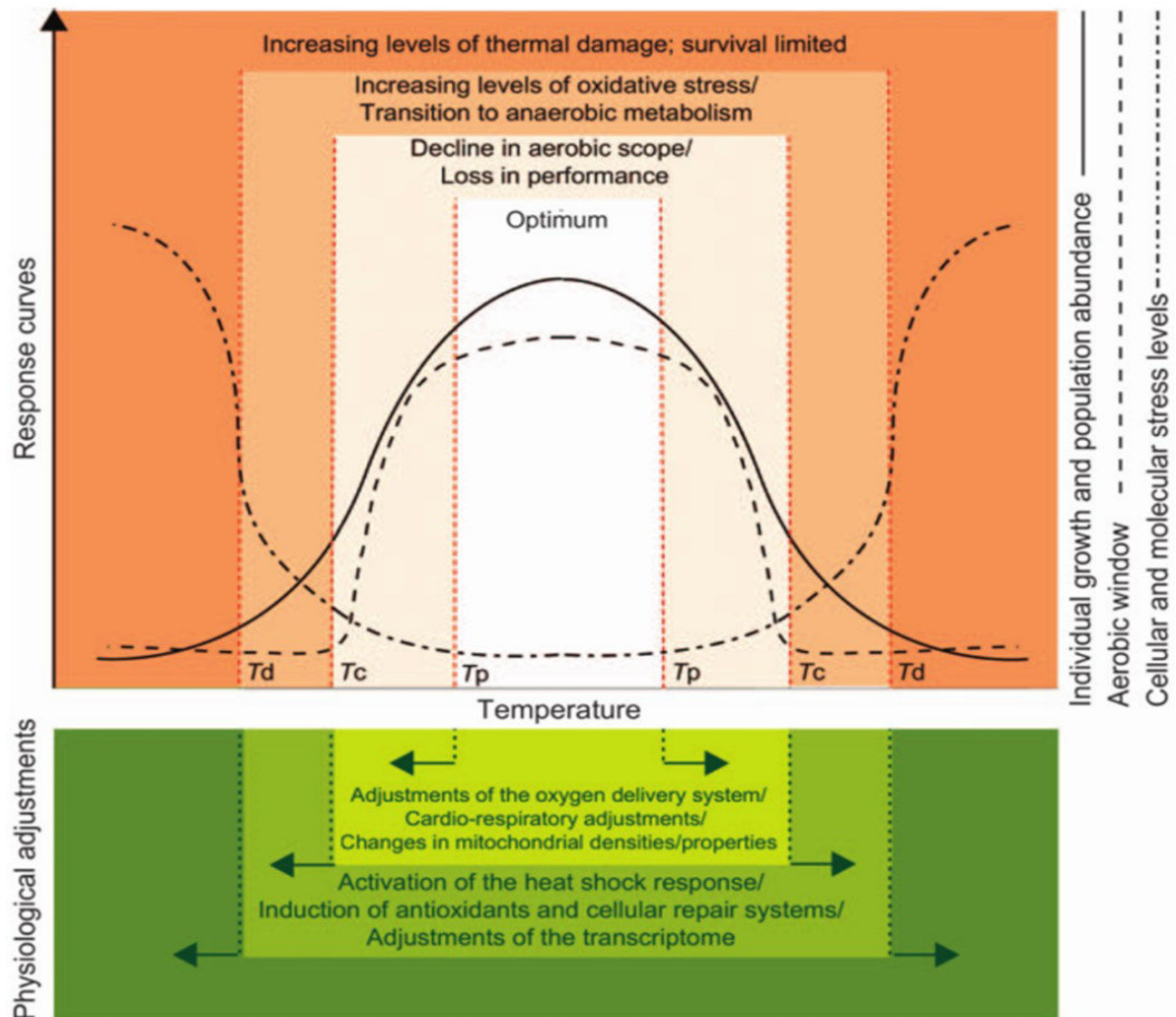


Figure 8 : La figure présente les performances d'un organisme en fonction de la température (Kassahn et al, 2009) . Les traits pleins font référence à la croissance individuelle et l'abondance des organismes dans la population, les traits pointillés représentent la capacité métabolique aérobie et la ligne alternant pointillés et tirets illustre l'évolution du stress au niveau cellulaire et moléculaire.

Dans la fenêtre d'optimum thermique, la croissance, l'abondance des individus et la capacité métabolique aérobie sont maximales, tandis que le niveau de stress est minimal. Au-delà de l'optimum thermique, et à partir des températures de pejus (T_p) la croissance et l'abondance des organismes déclinent avec la chute de la capacité métabolique aérobie. Entre les T_p et les températures critiques (T_c) la performance des organismes est fortement réduite pour atteindre son minimum aux températures létales (T_d). Au niveau cellulaire et moléculaire, la disponibilité en oxygène est largement réduite et l'organisme subit un important stress oxydant à partir des T_p et qui augmente avec l'éloignement de l'optimum thermique. Au-delà des températures critiques, le stress est maximal, le métabolisme passe en anaérobie pour compenser la réduction du métabolisme aérobie, la survie des organismes est limitée dans le temps. La partie basse de la figure résume les ajustements physiologiques mis en place par les organismes en réponse aux variations de température. Lorsque le stress est modéré (vert clair) les ajustements tels que l'adaptation du rythme cardiaque, de transport d'oxygène ou la capacité/densité des mitochondries permettent de compenser la diminution de l'oxygène cellulaire. Lorsque le stress s'intensifie (températures comprises entre T_c et T_d , vert moyen) les systèmes de défense (heat shock protéines) et de réparation des dommages sont induits et le transcriptome est ajusté. Au-delà des températures létales, les capacités défensives et de réparation sont dépassées, les dommages cellulaires augmentent et entraînent la mort de l'organisme.

II. Les interactions hôte-pathogène en milieu marin : le rôle clé de la température dans l'émergence, la transmission et la persistance des maladies

Les êtres vivants produisent de la matière (molécules, cellules, organes), des procédés (réactions chimiques, enzymatiques) du travail au sens physique (déplacements, soins aux juvéniles) et des réalisations matérielles (nid, galeries). Ces richesses suscitent des convoitises et de nombreux êtres vivants tentent de se les approprier par différentes stratégies d'interaction. Le parasitisme est l'une de ces stratégies, et consiste à retirer de l'énergie à un autre organisme (hôte) sans qu'il soit mort, sans qu'il soit une proie et sans qu'il n'en retire un quelconque avantage (Combes et al., 2018).

La finalité de l'interaction entre l'hôte et le parasite dépend à la fois de l'aptitude du parasite à coloniser son hôte et de la capacité de l'hôte à se défendre. Un hôte est qualifié de **susceptible** ou **réceptif** lorsqu'il permet la multiplication d'un pathogène ou à l'inverse de **réfractaire**. Une cellule est dite **permissive** lorsqu'elle permet à un pathogène d'assurer un cycle de réplication complet. Le terme **infection** qualifie l'invasion d'un organisme vivant (hôte) par un autre organisme ou virus (agent pathogène ou parasite). L'**infectivité** caractérise la capacité d'un agent pathogène à s'établir dans un hôte. Une **pathologie** ou **maladie** se définit comme l'ensemble des perturbations physiologiques et lésions induites par l'installation et la multiplication d'un agent pathogène dans un hôte. La **virulence** d'un agent pathogène mesure sa capacité à produire une maladie en conditions contrôlées. La **pathogénicité** est une notion épidémiologique qui décrit la capacité d'un agent pathogène avec une virulence connue à déclencher une maladie chez différents hôtes ou sous différentes conditions environnementales.

En milieu marin comme terrestre, les conditions environnementales telles que la température modulent fortement le risque d'émergence de pathogènes et leurs interactions avec leurs hôtes (Burge et al., 2014; Harvell et al., 2002). Les effets de la température sur une interaction hôte/pathogène dépendent à la fois de la variabilité thermique environnementale mais aussi des profils de tolérance thermique individuels de l'hôte et du pathogène. Ces profils de tolérance

thermique et de performance de l'hôte et du pathogène varient selon des courbes non linéaires et asymétriques qui peuvent être superposées (Figure 9, A) ou décalées (Figure 9, B). Lorsque les courbes de performance de l'hôte et du parasite sont décalées (Figure 9, B) l'effet de la température sur l'interaction hôte pathogène est beaucoup plus complexe que dans le cas précédent. Dans l'exemple présenté sur la Figure 9, les températures élevées favorisent l'hôte à la fois en optimisant ses réponses de défense et en limitant directement la croissance des agents pathogènes, ainsi la mortalité due aux agents pathogènes est réduite. Au contraire, les températures plus basses optimisent la croissance des agents pathogènes et réduisent l'efficacité de la défense de l'hôte induisant une potentielle augmentation des mortalités (Blanford and Thomas, 1999; Elliot et al., 2002).

Lors de l'étude de l'effet de la température sur une interaction hôte-pathogène, il apparaît donc essentiel de définir préalablement les gammes de tolérance thermique de chacune des parties.

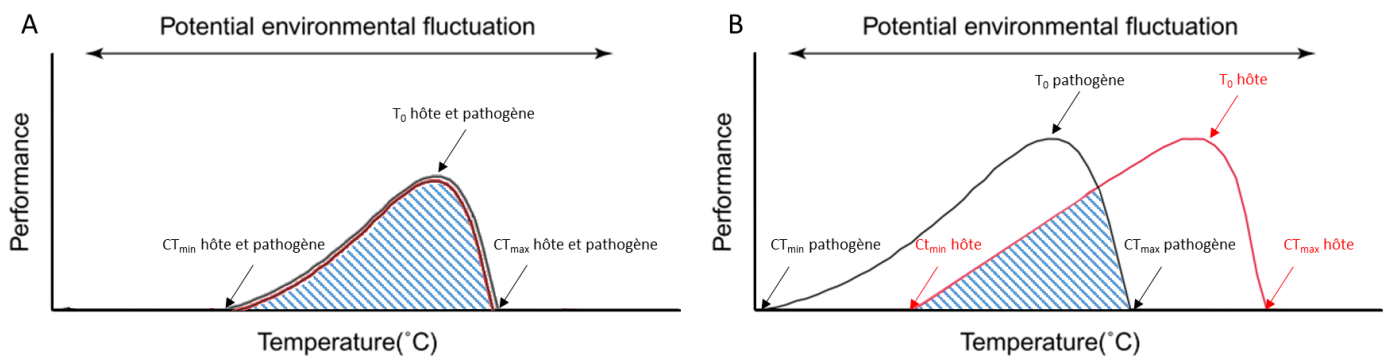


Figure 9 : Courbes de performance d'un ectotherme en rouge (réponse immunitaire, croissance, survie) et de son parasite en noir. En A les courbes de performance se superposent, en B elles sont décalées réduisant la zone thermique d'interaction (hachuré bleu), (Adapté d'après Blanford and Thomas, 2003)

1. Température, émergence et stabilité des pathogènes

De manière générale, la transmission et le développement des parasites augmente avec l'élévation de la température vers les limites de tolérance de l'hôte. Par exemple, la prolifération de parasites infectant les coquillages tels que *Perkinsus marinus*, *Haplosporidium nelsoni*, *Martelia refrigens*, et *M. cochillia*, est accentuée par l'augmentation saisonnière de la température et les aires de répartition géographique de ces pathogènes se décalent vers le nord avec la hausse des températures moyennes (revu par Guo and Ford, 2016).

- *Les virus marins*

Il existe très peu d'informations concernant l'effet de la température sur l'abondance, l'émergence et la persistance des virus marins. De rares données concernent les températures d'inactivation de virus de diatomées et de micro-algues (Danovaro et al., 2011; Mojica and Brussaard, 2014). Ces travaux semblent indiquer que ces virus sont particulièrement résistants aux variations de température et tolèrent des gammes de températures plus larges que celles de leurs hôtes respectifs.

Au contraire, la persistance du virus de la septicémie hémorragique (VHSV) qui infecte principalement les salmonidés, et l'infectivité de l'Abalone herpes virus (AbHV), semblent réduites par l'augmentation des températures (Corbeil et al., 2012; Parry and Dixon, 1997).

En effet, la température peut altérer la nature physique des virus, principalement composés de protéines (capside) et de membranes ou enveloppes lipidiques dans le cas des virus enveloppés. La température affecte la conformation structurale des protéines, l'activité enzymatique et la fluidité des lipides membranaires, et peut entraîner leur dénaturation ou rupture. Ainsi la persistance des virus est directement liée à la vulnérabilité de ses structures face à la température (Dimmioc, 1967; You et al., 2010).

2. La température module la sensibilité de l'hôte face aux pathogènes

a. La fièvre des homéothermes

La fièvre est une augmentation de la température corporelle qui survient chez les homéothermes en réponse à une infection. Elle est due à un dérèglement du centre thermorégulateur qui place la température d'équilibre à un niveau plus élevé qu'à la normale. La fièvre s'observe chez tous les homéothermes et est généralement causée par l'induction de la réponse inflammatoire. L'induction de la fièvre débute par la reconnaissance de pathogènes (virus, bactéries et champignons) par les récepteurs immunitaires qui activent alors les macrophages et cellules dendritiques qui libèrent des prostaglandines de type E2 (PGE2), des cytokines pyrogènes (Interleukines 1 et 6), ainsi que des Tumor necrosis factor (TNF) qui agissent pour induire la réponse fébrile. L'effet bénéfique de la fièvre sur les réactions immunitaires de l'hôte passe par l'optimisation de l'activité des cellules immunitaires et la stimulation de l'immunité innée et adaptative (Evans et al., 2015). De plus, l'hyperthermie permet dans certains cas de sortir de la zone de tolérance thermique du pathogène et induit l'inhibition de la croissance, de l'activité infectieuse et la dénaturation de ses protéines (Blatteis, 2003; Rodbard et al., 1980).

b. Fièvre comportementale

A la différence des homéothermes, les ectothermes ne possèdent pas la capacité d'augmenter physiologiquement (thermogenèse) ou de maintenir leur température interne. Mais en réponse à une infection (mimée par injection de pathogènes ; Figure 10), par la fièvre comportementale, les ectothermes augmentent leur température interne de quelques degrés au-dessus de leur température optimale, en se déplaçant vers des zones plus chaudes ou en accentuant leur activité physique (Evans et al., 2015; Kluger, 1979; Rakus et al., 2017). Cette adaptation semble conservée chez la majorité des ectothermes depuis les vertébrés (poissons, amphibiens, reptiles) jusqu'aux arthropodes et annélides et permet dans de nombreux exemples d'augmenter significativement la survie de l'hôte (Kluger, 1979; Rakus et al., 2017).

Chez certaines espèces de sauterelles et de criquets, les comportements de thermorégulation sont modifiés lors d'infections pour atteindre une nouvelle température optimale de 2°C à 5°C au-dessus de la température optimale habituelle (Thomas and Blanford, 2003). Les sangsues (annélides) injectées avec des lipo-polysaccharides bactériens fréquentent plus intensément les

zones chauffées à 29.6°C que les zones à 20.5°C fréquentées par les animaux témoins (Cabanac, 1989). De même l'injection d'une souche atténuée de la bactérie pathogène *Aeromonas hydrophila* dans la cavité branchiale ou dans l'abdomen de l'écrevisse *Cambarus bartoni* induit une augmentation du préférendum thermique de 22.1°C à 24°C (Casterlin and Reynolds, 1980, 1977). La fièvre comportementale a aussi été observée chez des mollusques gastéropodes en réponse à l'injection d'acide polyinosinic-polycytidylic (Poly (I :C)), un ARN double brin semblable à celui de certains virus (Zbikowska et al., 2013).

Du point de vue des mécanismes moléculaires, les prostaglandines et les cytokines ont été identifiées chez de nombreux ectothermes vertébrés et invertébrés (Ruggeri and Thoroughgood, 1985; Stanley-Samuelson, 1987). L'injection de PGE1 dans le céphalothorax des scorpions ou chez les écrevisses induit une réponse de fièvre comportementale chez ces invertébrés (Cabanac et al., 1980; Casterlin and Reynolds, 1980).

	Species	Activator of fever*	Investigators
BIRDS	<i>Gallus domesticus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (iv)	van Miert and Frens (1968)
	<i>Gallus domesticus</i>	<i>Salmonella abortus equi</i> endotoxin (ant. hypothal.)	Pittman <i>et al.</i> (1976)
	<i>Gallus domesticus</i>	Prostaglandin E ₁ (ant. hypothal.)	Pittman <i>et al.</i> (1976)
	<i>Columba livia</i>	<i>Pasteurella multocida</i> (iv, ip)	D'Alecy and Kluger (1975)
REPTILES	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (intracardiac, [ic])	Vaughn <i>et al.</i> (1974)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i> (ic)	Kluger (1978a)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	<i>Citrobacter diversus</i> (ic)	Kluger (1978b)
	<i>Dipsosaurus dorsalis</i>	lizard or rabbit-derived endogenous pyrogen (ic)	Bernheim and Kluger (1977)
	<i>Iguana iguana</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ic)	Kluger (1978a)
AMPHIBIANS	<i>Hyla cinerea</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (sc)	Kluger (1977)
	<i>Rana pipiens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Casterlin and Reynolds (1977b)
	<i>Rana catesbeiana</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Casterlin and Reynolds (1977b)
	<i>Rana esculenta</i>	<i>Mycobacterium sp.</i> (ip)	Myhre <i>et al.</i> (1977)
	<i>Rana esculenta</i>	frog-derived endogenous pyrogen (ip)	Myhre <i>et al.</i> (1977)
	<i>Rana esculenta</i>	Prostaglandin E ₁ (diencephalon)	Myhre <i>et al.</i> (1977)
FISHES	<i>Micropterus salmoides</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds <i>et al.</i> (1976)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds <i>et al.</i> (1976)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (ip)	Reynolds <i>et al.</i> (1978a)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ip)	Reynolds <i>et al.</i> (1978a)
	<i>Carassius auratus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ip)	Reynolds and Covert (1977)
	<i>Carassius auratus</i>	<i>E. coli</i> endotoxin (ip)	Reynolds <i>et al.</i> (1978b)

* Stimulus used by investigators to induce fever.

Figure 10 : Réponse fébrile chez les vertébrés ectothermes (issu de Kluger 1979)

c. Température et sensibilité aux pathogènes chez les invertébrés

- *Les effets délétères*

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'une élévation de la température au-delà des températures optimales pouvait induire une augmentation de la demande en oxygène cellulaire et de l'énergie nécessaire à la maintenance (Bayne, 2017; Dame, 1972; Kooijman, 2009). Or la réponse immunitaire des organismes est intimement liée aux ressources énergétiques disponibles. Lorsque celles-ci sont limitées, il existe un compromis entre l'énergie allouée à la réponse immunitaire et celle investie dans la reproduction et la croissance. Ainsi, il a été mis en évidence que l'activation et l'utilisation du système immunitaire sont des processus aux coûts énergétiques importants et sont difficilement maintenues simultanément avec d'autres processus coûteux (Moret et al., 2014).

Chez les mollusques, la réponse aux pathogènes repose en partie sur l'activité des cellules immunitaires, les hémocytes (voir III.5). Ils sont impliqués dans la dégradation, la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers grâce aux enzymes hydrolytiques présentes dans les hémocytes, mais aussi par leur capacité de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'exposition de mollusques marins à des hautes températures induit une forte mortalité des hémocytes, ainsi que la diminution de leurs capacités de phagocytose, d'étalement, de leur locomotion et de leur activité lysosomale impliquée dans la dégradation des pathogènes (Chen et al., 2007; Fisher, 1988; Gagnaire et al., 2006; Hégaret et al., 2003; Monari et al., 2007; Paillard et al., 2004; Wang et al., 2012; Yu et al., 2009). Ces données suggèrent que les hautes températures augmentent la sensibilité des mollusques aux infections bactériennes. Cependant, des résultats contradictoires montrent par exemple que chez la moule l'activité phagocytaire et le nombre total d'hémocytes étaient augmentés à 15°C par rapport à celle des moules maintenues à 10°C (Ellis et al., 2011; Parry and Pipe, 2004)

- Les effets bénéfiques

L'effet bénéfique des hautes températures sur l'interaction du White Spot syndrome virus (WSSV) et des crustacés tels que *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Procambarus clarkii*, *Penaeus monodon*, *Pacifastacus leniusculus* est l'un des mieux défini parmi les invertébrés marins. La réplication du WSSV est optimale lorsque la température de l'eau de mer avoisine les 27°C (Rahman et al., 2006). A cette température, les cheptels de crustacés sont décimés à 100% en 8 jours environ (Vidal et al., 2001). Lorsque les crustacés sont maintenus dans une eau de mer à 32°C (hyperthermie) pendant l'infection par WSSV, la survie est supérieure à 80% (Vidal et al., 2001). La réduction des mortalités ne semble pas liée à une inactivation ou à la dégradation du WSSV et la température ne modifie pas l'efficacité du virus (Granja et al., 2006; Jiravanichpaisal et al., 2004; Vidal et al., 2001). Or, l'exposition à 32°C limite la réplication du WSSV dès le début de l'infection (Du et al., 2006; You et al., 2010). Ainsi, il est proposé que la température puisse moduler les premières étapes d'adsorption du virus, de synthèse des protéines et d'acides nucléiques pour le virus ou encore les activités enzymatiques nécessaires à la réplication virale (Guan et al., 2003). Durant cette hyperthermie, la température ne semble pas modifier la réponse immunitaire des crustacés (You et al., 2010). Cependant, le nombre de cellules apoptotiques augmente avec la température et cet effet semble limiter la réplication virale de WSSV (Granja et al., 2003; Wu et al., 2015). Par la suite, il a été montré que les gènes viraux s'exprimaient à 2 heures et à 4 heures post infection chez les crustacés infectés à 32°C, avec un niveau de transcription plus important à 32°C qu'à 25°C, mais sans synthèse de protéines virales à 32°C. Cette étude suggère une inhibition de la synthèse des protéines virales à hautes températures (Lin et al., 2011) et propose l'implication des protéines HSP70 et de l'Aldéhyde déshydrogénase (ALDH) de l'hôte dans la répression de la synthèse et du repliement des protéines du WSSV. Ces résultats sont confirmés par le knockdown des gènes hsp70 et ALDH qui restaurent l'infection et les mortalités subséquentes, même à haute température (Lin et al., 2011; Wu et al., 2015). A l'heure actuelle, les traitements thermiques sont utilisés en production de crustacés pour limiter les mortalités causées par le white spot syndrome virus.

III. Le cas spécifique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et du virus

OsHV-1

Les huîtres ont toujours été consommées sur le littoral, comme en témoignent des vestiges retrouvés en Charente Maritime datant du néolithique. Au moyen Age, les gisements naturels d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) de Normandie, de Cancale ou d'Aquitaine sont largement exploités et approvisionnent toute la France. C'est au XVII^{ème} siècle que les premières cultures d'huîtres ont lieu sur la côte Atlantique. Le naissain sauvage est récolté puis mis en croissance dans les bassins de marais salants, mais à cette époque les bancs naturels sont très appauvris. En 1860, pour préserver les gisements d'huîtres plates, Napoléon III encourage l'importation d'huîtres portugaises, *Crassostrea angulata*. Cette espèce est robuste et dotée d'une croissance rapide et rapidement, elle s'acclimate en Gironde. La production de l'huître portugaise est rentable et supprime rapidement celle de l'huître plate locale (*Ostrea edulis*). L'ostréiculture française est alors prolifique. Mais à partir de 1967, des épidémies surviennent attribuées à un virus de type iridovirus telles que la maladie des branchies et la maladie hémocytaire qui vont complètement éradiquer l'huître portugaise (Comps, 1988). Dans ces mêmes années, les bancs d'huîtres plates sont réduits et subissent d'importantes épizooties telles que la martelliose ou la bonnamiose. Pour pallier à ces pertes, l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*, huître creuse) est introduite et distribuée dans les différents bassins ostréicoles entre 1971 et 1975 (Grizel and Héral, 1991).

1. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

L'huître creuse est un mollusque bivalve constitué d'un corps mou et protégé par une coquille à deux valves asymétriques. Les valves sont reliées par la charnière et par un muscle adducteur composé d'une part de fibres musculaires lisses et d'autre part de fibres striées. La coquille se ferme en période d'exondation et lors de stress. L'huître creuse est un hermaphrodite protandre. L'émission des gamètes a lieu en été, lorsque la température de l'eau de mer dépasse les 16°C à 18°C. Une vingtaine de jour après la fécondation, l'huître mesure environ 300 µm et ressemble en tout point à un adulte, elle est définitivement fixée à son substrat où elle poursuivra son développement.

Les jeunes huîtres sont communément appelées « naissain » avant l'acquisition de leur maturité sexuelle, environ au bout d'un an. Elles atteignent une taille commercialisable au bout d'environ trois ans. *Crassostrea gigas* est aujourd'hui largement exploitée en France avec environ 130 000 tonnes d'huîtres produites chaque année. Initialement originaire du Japon, l'huître creuse se retrouve aujourd'hui le long des côtes de presque tous les continents (FAO).

2. *Crassostrea gigas* et la température

a. Tolérance thermique

Comme la majorité des espèces intertidales l'huître creuse est ectotherme et eurytherme. Les fourchettes de tolérance thermique varient selon les régions d'origine de l'huître creuse et de ses stades de développement. On définit que chez l'adulte, les températures moyennes permettant la croissance se situent entre 11°C et 34°C, et entre 20°C et 25°C pour la ponte (Bayne, 2017). Pour les populations de la côte Atlantique française, la croissance a lieu à des températures comprises entre 3.5°C et 24.5°C et la ponte à des températures entre 18°C et 22.5°C (Figure 11, Bayne, 2017). Pour des larves, la croissance est maximale autour de 31°C (Bayne, 2017). Pour le naissain utilisé au laboratoire pour les analyses expérimentales (Naissain Standardisé Ifremer ou NSI), la majorité des individus cessent de s'alimenter aux alentours de 33°C et l'alimentation devient nulle à 35°C. Lorsque la température est augmentée de 1°C toutes les 48h, la majorité des huîtres NSI meurt vers 39°C, les dernières huîtres survivent jusqu'à 41°C (Com pers M. Alumno-Bruscia).

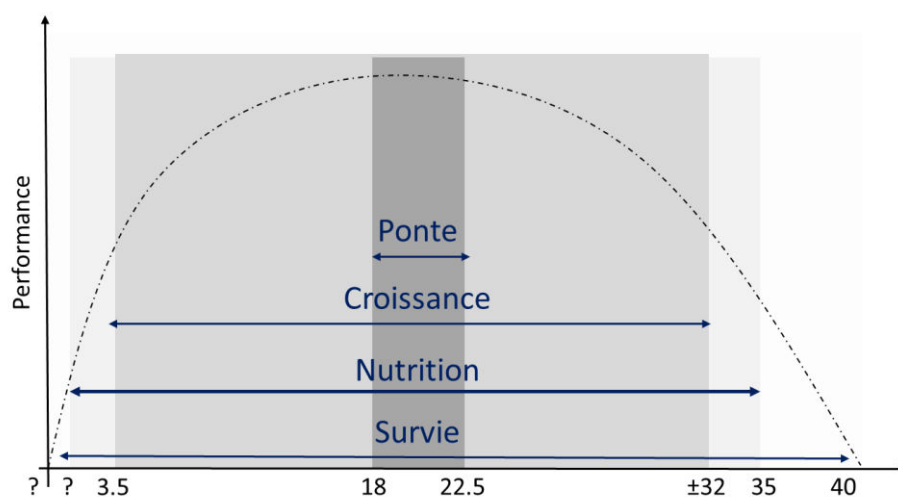


Figure 11: Fenêtres thermiques auxuelles la ponte, la croissance, la nutrition, et la survie sont observées chez *C. gigas*.

b. Ecophysiologie

Conformément à la majorité des organismes, le rythme cardiaque, la consommation d'oxygène et la filtration augmentent avec la hausse de la température de l'eau de mer chez *C. gigas*. Comme l'illustre la Figure 12, l'augmentation de ces paramètres se maintient de 5 à 20°C (Bougrier et al., 1995; Friedman et al., 1999; Lowe, 1974). Au-delà de 20°C, le taux de filtration diminue alors que la consommation d'oxygène et le rythme cardiaque augmentent. En conséquence, la croissance se poursuit jusqu'à 30°C puis décline avec la température (Bougrier et al., 1995).

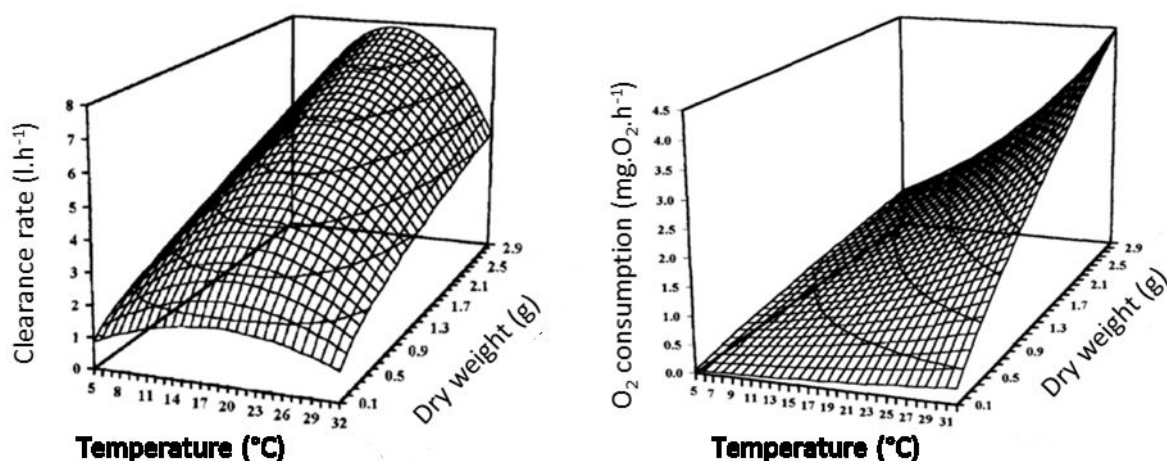


Figure 12 : Représentation des modèles mathématiques reliant le taux de filtration (à gauche) et la consommation d'Oxygène (à droite) à la température et à la masse d'huîtres (Bougrier et al, 1995)

c. Réponses transcriptomiques et protéiques

Les nouvelles techniques de séquençage d'ADN (NGS), facilitant l'accès aux génomes d'organismes non modèles, et le développement associé des approches post-génomiques (eg. transcriptomique et protéomique globale) ont permis d'apporter une vue globale des mécanismes induits chez les bivalves en réponse aux hautes températures.

Le séquençage du génome de l'huître creuse a mis en évidence la présence de 88 gènes codant des HSP70 (HSP de taille de 70 kDa) contre seulement 17 chez l'Homme et 39 chez l'oursin.

La grande quantité de gènes HSPs chez l'huître pourrait expliquer sa grande tolérance aux variations de température (Zhang et al., 2012). Certains de ces gènes sont massivement surexprimés en réponse à un stress thermique : en moyenne, l'expression des transcrits codant les HSPs est augmentée de 13.9 fois lors de l'exposition à des hautes températures (Zhang et al., 2012). L'expression et le seuil d'induction des HSPs varient selon les saisons, à mesure que les températures du milieu évoluent (Jackson et al., 2011). Chez *C. gigas*, les HSPs sont plus exprimées en été qu'en hiver. A titre d'exemple, l'HSP69 est induite à 33°C–37°C en janvier et plutôt à 40°C-43°C en août (Hamdoun et al., 2003). L'exposition des huîtres à une température de 25°C induit des changements protéomiques et transcriptomiques majeurs (Figure 12; Clark et al., 2013b; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2015). Cette température modifie l'expression de certains gènes du métabolisme énergétique, et induit l'activation des processus cataboliques (lipolyse), l'augmentation du métabolisme aérobie et des flux de glucose et d'acides gras (Clark et al., 2013; Meistertzheim et al., 2007; Zhang et al., 2015b). La température induit l'expression de gènes impliqués dans les processus transcriptionnels et traductionnels, dans l'activation des processus de réparation de l'ADN et de réorganisation du cytosquelette (Meistertzheim et al., 2007; Zhang et al., 2015b). Les flux énergétiques semblent majoritairement dirigés vers la réponse au stress et les processus de réparation cellulaire (membranes lipidiques, ADN) au détriment de la croissance tissulaire.

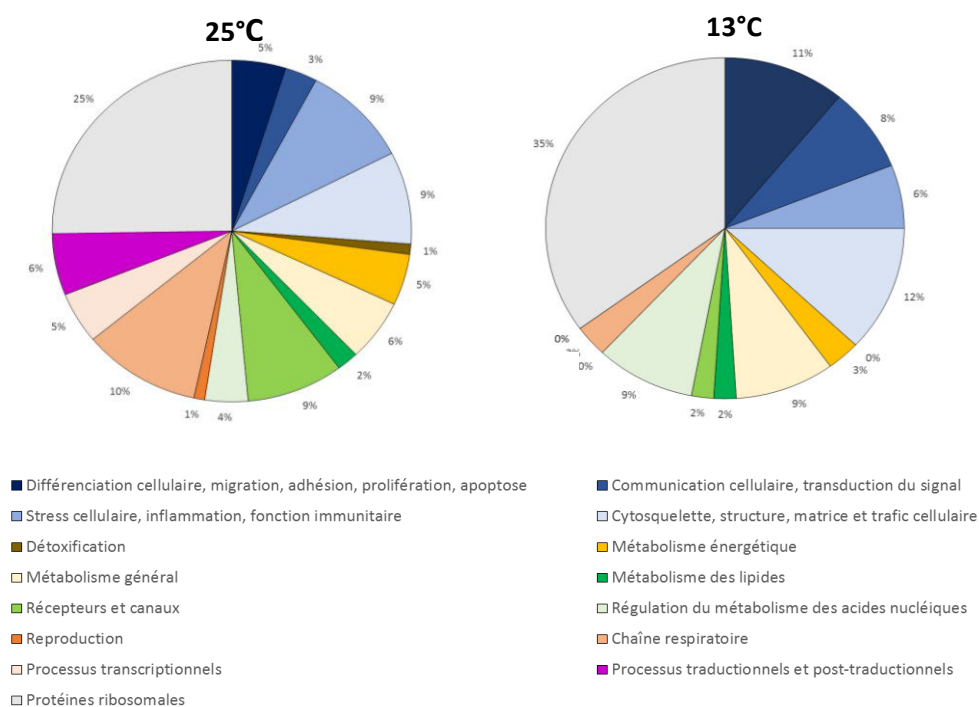


Figure 13 : Classification fonctionnelle des séquences différentiellement exprimées dans les branchies et le manteau d'huîtres *C. gigas* après 10 jours exposés en eau de mer à 25°C ou à 13°C. (Meistertzheim et al., 2007)

d. Biogéographie

La température par son effet sur la physiologie des organismes aux niveaux moléculaire, cellulaire et physiologique, détermine la qualité des habitats et sous-tend la répartition biogéographique des espèces (Hochachka and Somero, 2002). Les travaux de Thomas et al. (2016) illustrent le rôle majeur de la température dans l'évolution des zones de répartition de *Crassostrea gigas* en France (Thomas et al., 2016). Au moment de son introduction en Europe dans les années 1970, Bourgneuf (Estuaire de la Loire) constituait la limite nord de la zone de reproduction de *C. gigas*. Dès 1990, des reproductions naturelles ont été décrites en Allemagne, au Danemark en Suède et en Norvège, et aujourd'hui des populations d'huîtres creuses naturelles sont présentes de Gibraltar à la Norvège (Figure 14). La ponte est influencée par la température: sa survenue dans les différentes populations européennes d'huîtres creuses suit un gradient Sud-Nord correspondant à l'augmentation saisonnière des températures (Figure 14). L'augmentation moyenne de la température de l'eau de mer a déjà induit un déplacement de la niche de reproduction et de croissance des larves de *C. gigas* de 1400 km en 30 ans (Thomas et al., 2016).

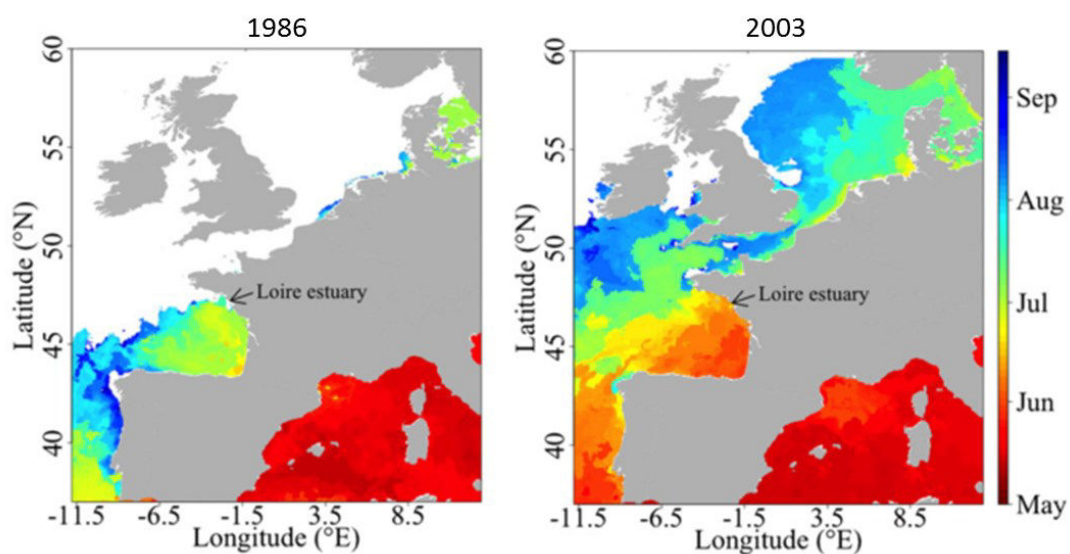


Figure 14 : Simulation de la distribution spatiale de la date de ponte le long des côtes européennes lors d'une année froide en 1986 et d'une année chaude 2003. Aucune ponte n'a lieu dans les zones blanches. (Thomas et al., 2016).

3. Huîtres creuses et pathogènes

Fixées dans un milieu ouvert, les huîtres sont largement exposées à de nombreux agents pathogènes. Depuis son introduction, *C. gigas* est affectée par des phénomènes de mortalités massives survenant à différents stades de son développement et principalement en été. En France à partir de 2008, les épisodes de mortalités se sont fortement aggravés, décimant parfois jusqu'à 100% des jeunes huîtres. Plusieurs agents pathogènes ont été isolés à de nombreuses reprises à partir d'huîtres creuses lors d'épisodes de mortalités (Garnier et al., 2008, 2007; Lemire et al., 2015; Petton et al., 2015b), et identifiés comme agents responsables des mortalités : l'ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1) et plus particulièrement l'haplotype μ Var, ainsi que des bactéries du genre *Vibrio* spp, telles que *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. tubiashii* ou *V. Crassostrae*.

Récemment, une étude de grande ampleur a pu éclaircir l'implication de ces différents pathogènes dans le déroulement de la maladie, en comparant des huîtres de familles sensibles et résistantes à la mortalité (de Lorgeril et al., 2018). Les résultats montrent qu'OsHV-1 cible dans un premier temps les hémocytes pour sa réplication. L'infection virale déstabilise la réponse immunitaire de l'huître vis-à-vis des bactéries induisant une baisse de la synthèse de peptides antimicrobiens. Il en résulte une importante modification du microbiote qui conduit à la colonisation de l'huître par des bactéries opportunistes des genres *Vibrio* ou *Arcobacter* et finalement à une septicémie qui finira par entraîner la mort de l'huître (de Lorgeril et al., 2018).

4. L'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1)

C'est en 1972 aux USA que pour la première fois la détection d'un virus de type herpès est associée aux mortalités d'huîtres adultes *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972). A partir des années 1991, des virus similaires sont identifiés en France lors de mortalités importantes de larves et de naissains (Nicolas et al., 1992; Renault and Novoa, 2004). En 1995, un virus est isolé à partir d'un lot de larves infectées provenant d'écloseries françaises (Le Deuff and Renault, 1999) et le génome est séquencé (Davison et al., 2005). Par ses caractéristiques structurales et génomiques, le virus est alors classé premier membre de la famille des Malacoherpesviridae, ordre des Herpesvirales et nommé Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Davison, 2002; Davison et al., 2005).

a. Distribution géographique d'OsHV-1

A partir de 2008, l'ampleur des épisodes de mortalités s'intensifie et touche spécifiquement les jeunes huîtres âgées de moins d'un an dès que la température de l'eau de mer dépasse 16°C (Pernet et al., 2012; Petton et al., 2013). Ces mortalités s'expliquent par l'émergence d'un micro-variant du virus nommé OsHV-1 μ Var (EFSA, 2015, 2010; Segarra et al., 2010). En 2008, OsHV-1 μ Var est identifié en France (Martenot et al., 2011; Renault et al., 2012; Segarra et al., 2010) et en Irlande (Peeler et al., 2012) puis en Grande-Bretagne en 2010 (EFSA, 2010; Lynch et al., 2012). Par la suite, OsHV-1 ainsi que des variants sont détectés en Espagne lors d'importants épisodes de mortalités (Roque et al., 2012), au Portugal (Batista et al., 2015) puis en Italie (Dundon et al., 2011), aux Pays-Bas (Gittenberger et al., 2016) en Scandinavie (Mortensen et al., 2016), puis en Nouvelle-Zélande et en Australie (Paul-pont et al., 2014) et enfin en Asie (Hwang et al., 2013). Ainsi OsHV-1 μ Var est actuellement distribué sur l'ensemble des côtes européennes, en Asie, sur les côtes du continent américain, et en Océanie (Figure 15) (EFSA, 2015).

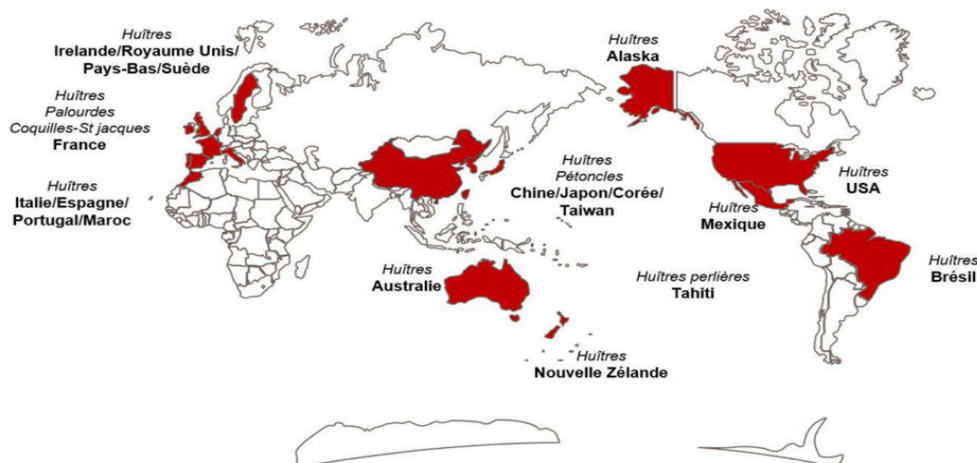


Figure 15 : Répartition mondiale d'OsHV-1 et ses variants (Segarra ; 2014)

b. Transmission virale

L'eau est la voie majeure de transmission d'OsHV-1 entre différents individus (Paul-Pont et al., 2013; Sauvage et al., 2009; Schikorski et al., 2011), et de fortes quantités d'ADN viral sont

détectées dans les bassins d'huîtres infectées par OsHV-1. Le maintien d'huîtres saines dans de l'eau de mer ayant contenu des huîtres infectées suffit à induire une infection virale et la mort (Fuhrmann et al., 2016; Schikorski et al., 2011).

Afin d'infecter des huîtres lors d'expérimentation en laboratoire, plusieurs techniques sont possibles. Les huîtres peuvent être soit directement injectées avec une suspension virale, soit infectées selon des techniques de balnéation dans une eau infectieuse (Schikorski et al., 2011). Or pour ces deux techniques, les dynamiques infectieuses, les doses virales nécessaires, et la persistance virale dans le milieu demeurent mal connues, alors que ces données sont essentielles à la standardisation des méthodes d'infection et à l'interprétation des résultats. De récents travaux menés au laboratoire ont analysé précisément les paramètres de transmission d'OsHV-1 et des *vibrios* associés lors de la technique de cohabitation, pendant laquelle des huîtres infectées en mer (donneurs) sont mises en cohabitation avec des animaux sains (receveurs) (Petton et al., in prep.). Une heure et 30 minutes de cohabitation suffisent à détecter l'ADN viral et à induire des mortalités chez les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les donneurs. Ces résultats mettent aussi en évidence que la quantité d'ADN viral dans l'eau de mer atteint son maximum dès 48h de cohabitation et devient nulle après environ 170 heures. La mortalité des receveurs augmente avec le temps d'exposition aux donneurs selon une relation dose-réponse et diminue avec les renouvellements d'eau qui limitent l'accumulation de particules virales dans le milieu. Les mortalités des receveurs surviennent environ 96 heures après le début de la cohabitation et se stabilisent après 135 heures, le maximum est atteint après 160h à 180h.

La Figure 16 présente les différentes méthodes d'infection des huîtres par OsHV-1 actuellement utilisées. La première méthode consiste à injecter des huîtres donneuses avec une suspension virale pour les placer ensuite en cohabitation avec les huîtres à infecter dans un même bac expérimental. Bien que les huîtres donneuses soient injectées avec une suspension virale purifiée, aucune étude actuelle ne porte sur la transmission de la microflore et des bactéries pathogènes associées à cette injection. La seconde méthode est très similaire à la première, exception faite que les huîtres donneuses sont naturellement infectées par les pathogènes en milieu naturel (virus et bactéries). Une troisième technique consiste à infecter des huîtres en milieu naturel puis de les disposer dans un bassin différent de celui des receveurs, l'infection était alors réalisée par transfert de l'eau de mer contenant les pathogènes vers les huîtres receveuses. Cette technique permet de réduire la dose virale transmise aux receveurs. Dans de nombreuses études, les huîtres sont infectées par l'injection d'une suspension virale directement dans le muscle adducteur, permettant principalement de synchroniser l'infection entre les animaux étudiés et de standardiser la dose virale injectée. Cette dernière méthode s'affranchit des voies naturelles d'entrée du virus dans son hôte et des barrières biologiques et physiques hôtes qui s'opposent à l'infection virale comme par exemple le mucus. L'injection d'une suspension virale est donc peu représentative de l'infection en milieu naturel.

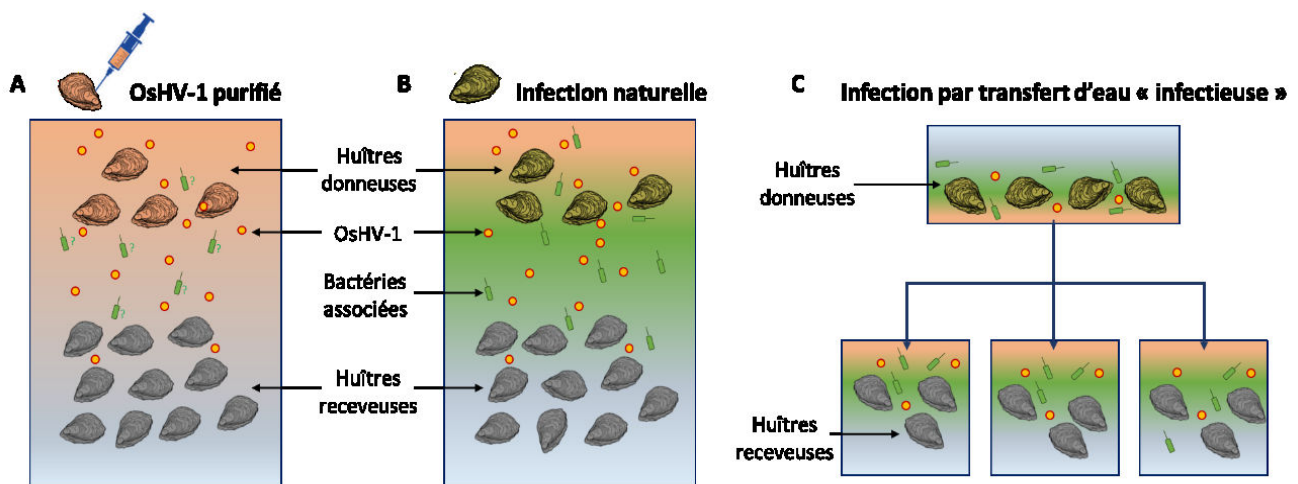


Figure 16 : Schéma présentant les différentes méthodes expérimentales d'infection des huîtres creuses par OsHV-1. Les cercles orangés représentent les particules virales d'OsHV-1, tandis que les bactéries associées apparaissent en vert.

c. Structure d'OsHV-1

De manière générale, toutes les particules virales (virions) possèdent une structure caractéristique dont les rôles principaux sont la protection du génome pendant les phases extracellulaires du cycle viral mais aussi la reconnaissance des potentielles cellules hôtes permettant la multiplication virale. Les éléments composant un virion sont l'enveloppe, la capside (de capsa : boîte) et le génome (Figure 17).

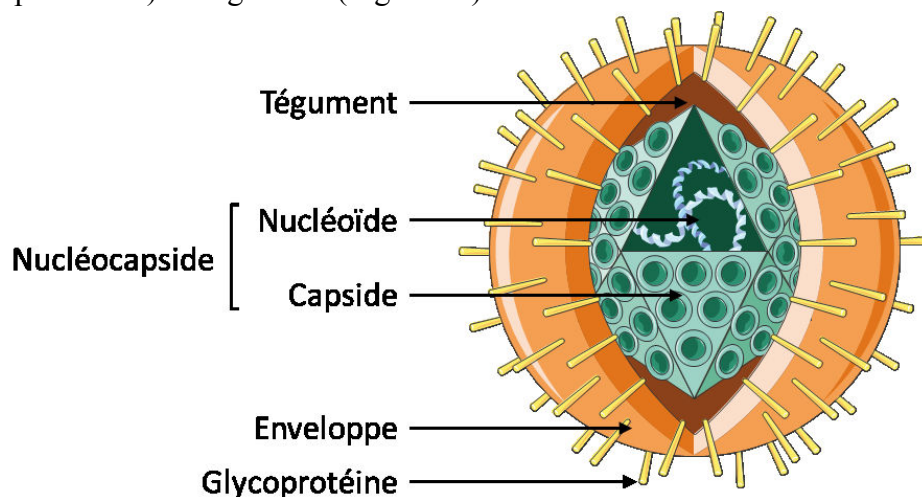


Figure 17 : Structure d'une particule virale de type herpesvirus

L'enveloppe n'est présente que chez les espèces de virus enveloppés comme les herpesvirus : elle est constituée d'une bicouche lipidique qui provient des membranes cellulaires de l'hôte à partir desquelles le bourgeonnement du virus s'est effectué. La composition lipidique de ces membranes n'est actuellement pas décrite pour les herpesvirus. Chez l'homme, dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le lipidome de l'enveloppe virale a révélé que la composition s'apparentait à celle des micro-domaines membranaires que sont les radeaux lipidiques, caractérisés par la présence en grandes quantités de lipides saturés, de phosphatidylserine, de plasményl-éthanolamine, de cholestérol et de sphingolipides (Brugger et al., 2006). L'enveloppe virale comporte aussi des protéines d'origine hôte ou virale impliquées dans les interactions avec les récepteurs cellulaires de l'hôte. Les herpesvirus possèdent une matrice (tégument) constituée de protéines virales, présente sous la bicouche lipidique, qui stabilise l'enveloppe virale.

La **capside** se compose d'un assemblage de protéines codées par le génome viral. Il existe plusieurs types de structure de capsid. La capsid d'OsHV-1, comme celles des herpesvirus, possède une symétrie icosaédrique (de triangulation $T=16$, Figure 18 ; Davison et al., 2005). Cette structure est obtenue par l'assemblage de capsomères qui se composent de sous unités protéiques assemblées par 5, les « pentons » (forme convexe et situés aux niveaux des sommets) ou par 6, les hexons (forme plane localisée sur les faces et les arêtes de l'isocaèdre). La capsid d'OsHV-1 est composée de 162 capsomères soit 150 hexons et 12 pentons ; son diamètre est estimé à environ 116 nm, plus petit que celle de l'herpès simplex (HSV-1 : 125nm ; Davison et al., 2005).

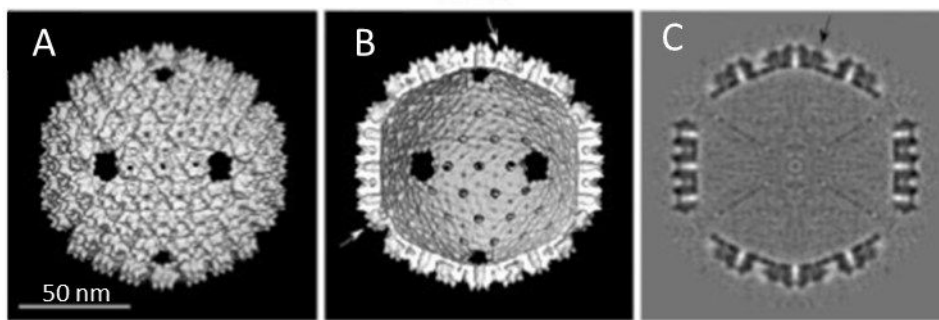


Figure 18 : Reconstruction microscopique de la capsid de l'Ostreid herpesvirus de type 1 (OsHV-1). A : structure extérieure, B : surface intérieure, C : coupe centrale de la capsid (Davison et al., 2005).

d. Le Génome d'OsHV-1

Le génome d'OsHV-1 est intégralement séquencé (GenBank accession number AY509253), (Davison et al., 2005). OsHV-1 est un virus à ADN double brin ; il possède un génome de taille relativement grande de 207 439 paires de bases (pb) avec une composition en G+C de 38.7% (Davison et al., 2005). On représente la structure globale du génome d'OsHV-1 de la façon suivante (Figure 19) : $TR_L-U_L-IR_L-X-IR_S-U_S-TR_S$ (Davison et al., 2005; Segarra et al., 2015). Le génome d'OsHV-1 s'organise en deux régions uniques non répétées : une région longue (UL : unique long) de 167 843 pb et une région courte (US : unique short) de 3 370 pb. Chaque région unique, est flanquée de séquences répétées inversées nommées TR_L/IR_L lorsqu'elles sont localisées de part et d'autre de la région U_L , et TR_S/IR_S si elles se localisent autour de la région U_S . Finalement, une troisième région unique (X de 1 510 pb) est retrouvée entre les séquences

IR_L et IR_S (IR: région répétée interne short : S ou long : L). L'analyse du génome d'OsHV-1 indique la présence de 124 gènes uniques codant pour des protéines.

Parmi les gènes viraux, douze gènes codent des enzymes de types ATPases (ORF109), hélicases (ORF7, ORF49, ORF67 et ORF115), primases (ORF24), DNA polymerases (ORF100), dUTPase (ORF27, ORF34, ORF75) et ribonucléotide réductase (ORF20, ORF51).

Dix-huit gènes codent des protéines membranaires : ORF16, ORF25, ORF32, ORF36, ORF41, ORF54, ORF57, ORF59, ORF63, ORF65, ORF68, ORF72, ORF77, ORF80, ORF84, ORF88, ORF103, ORF111.

Huit gènes possèdent des motifs à doigt de zinc caractéristiques de facteurs de transcription : ORF38, ORF53, ORF96, ORF97, ORF117, ORF118, ORF121, ORF124.

Quatre gènes codent des inhibiteurs d'apoptose avec un motif Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat (BIR) : ORF42, ORF87, ORF99, ORF106.

Quatre-vingt gènes, soit 65.3% du génome total, codent pour des protéines ne présentant aucune homologie avec aucune protéine actuellement décrite dans les génomes séquencés jusqu'à aujourd'hui (Davison et al., 2005; Segarra, 2015).



Figure 19 : Organisation du génome d'OsHV-1 (Davison et al., 2005; Segarra et al., 2015)

L'analyse des séquences des gènes d'OsHV-1 n'a révélé que très peu d'homologie avec les séquences des autres herpesvirus : seul l'ORF109, codant pour une sous-unité présumée ATPase de la terminase, une enzyme d'un complexe impliqué dans le conditionnement de l'ADN viral dans les capsides, est retrouvé chez les herpesvirus (Davison et al., 2005).

e. Mécanismes d'infection de *C. gigas* par *OsHV-1*

L'infection des huîtres par *OsHV-1* induit des mortalités importantes et rapides : les premières mortalités apparaissent entre 72h et 96h chez les huîtres infectées par cohabitation. L'infection s'accompagne d'une diminution de la nutrition, les animaux sont peu réactifs aux stimuli mécaniques et ferment difficilement leur coquille (OIE, 2018). Les larves infectées montrent une réduction des activités de nage et de nutrition (Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992). Les approches histologiques montrent que chez les jeunes huîtres des lésions apparaissent au niveau des tissus conjonctifs et des noyaux, où des modifications nucléaires telles que l'hypertrophie ou la pycnose associées à l'apoptose sont observées (Arzul et al., 2017; Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992). La pycnose définit une cellule dont le noyau apparaît réduit et très compact, ce qui reflète un état de mort cellulaire par nécrose.

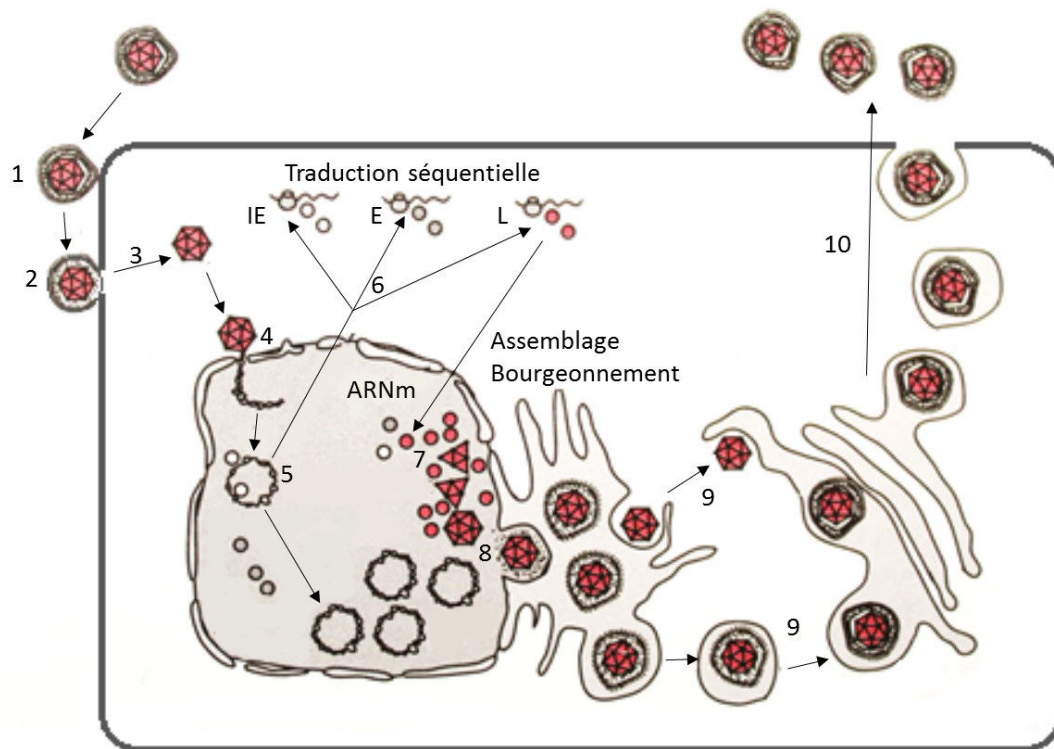


Figure 20 : Cycle de multiplication des herpès virus simplex dans une cellule permmissive (Pasquier et al., 2013)

Du fait de leur état de parasite intracellulaire obligatoire, la multiplication virale ne peut avoir lieu que dans une cellule. Dans une cellule **permmissive**, la réplication virale s'organise en plusieurs étapes successives (Figure 20): (1) reconnaissance et attachement du virion sur la cellule hôte et entrée du virus dans la cellule, (2) fusion avec la membrane de la cellule hôte, (3) libération du génome viral (décapsidation), (4) réplication du génome viral, (5) transcription

des gènes viraux puis (6) traduction des ARN messagers viraux, (7) maturation des protéines virales, (8) assemblage des nucléocapsides, (9) maturation des virions et enfin (10) libération des virions néoformés (Jouaux et al., 2013; Pasquier et al., 2013; Segarra, 2015).

Chez les herpesvirus, l'infection débute par la reconnaissance des glycoprotéines de l'enveloppe virale par les récepteurs de surface présents à la surface de la membrane hôte puis par leur attachement spécifique. Concernant OsHV-1, les mécanismes d'entrée ne sont actuellement pas définis chez *C. gigas*. De façon générale, les herpesvirus sont reconnus par différents récepteurs cellulaires dont les chaînes héparines sulfate appartenant aux protéoglycanes membranaires, des récepteurs de la famille de Tumor necrosis factor, tels que TNFRSF14 (Herpes virus entry mediator 14), des glycoprotéines membranaires de la famille des nectines, comme l'Herpesvirus entry mediator B, des intégrines, ou encore des membres de la famille des immunoglobulines (Spear, 2004; Spear and Longnecker, 2003). Concernant OsHV-1, des travaux suggèrent que le glypican, un protéoglycane de la famille des héparines sulfate ou des intégrines, pourrait être le récepteur cellulaire d'OsHV-1 (Jouaux et al., 2013; Renault et al., 2011; Segarra et al., 2014b).

Suite à la reconnaissance du virus et à son attachement à la membrane, l'interaction devient souvent irréversible et amorce la fusion des membranes virales et cellulaires. Immédiatement après l'entrée du virus, les protéines structurales de la capsid sont dégradées lors de l'étape de décapsidation. Le nucléoïde est ensuite libéré dans le cytoplasme. L'acheminement du matériel génétique d'OsHV-1 jusqu'aux pores nucléaires (Nuclear pore complex) semble s'effectuer grâce au cytosquelette hôte et plus précisément via les tubulines α et β (Jouaux et al., 2013) et aboutit à l'introduction du génome viral dans le noyau.

Chez l'homme, la transcription de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) s'effectue en trois phases consécutives. La phase très précoce de la transcription (IE pour Immediate early) induit la production d'ARNm codant pour des protéines nucléaires de régulation de l'expression du génome viral modulant les phases suivantes de la transcription. Dans le cas d'HSV-1, la synthèse de ces protéines atteint son maximum d'activité pendant les trois premières heures après infection (Honest and Roizman, 1974). Ensuite, la phase précoce de transcription (E pour Early) permet principalement la production d'enzymes essentielles à la réplication du génome viral comme l'ADN polymérase, des hélicases, des ribonucléases. La réplication virale se

déroule alors dans le noyau où l'ADN viral est synthétisé sous forme linéaire puis il se circularise. Survient ensuite la phase tardive du cycle lytique (L pour Late) : la transcription tardive permet la synthèse des protéines nécessaires à la structure virale et à l'assemblage des virions. Suite à leur synthèse, les protéines de la capsid s'auto-assemblent autour d'un génome circulaire et forment des nucléocapsides. Celles-ci bourgeonnent dans la membrane nucléaire puis le virion migre dans le système membranaire de l'appareil de Golgi avant la libération de la particule virale par exocytose. La durée de ce cycle est variable et dépend de chaque virus : dans le cas d'une infection par HSV-1 la synthèse de l'ADN viral débute environ 3 heures après le début de l'infection (Ponce de Leon et al., 1977).

Dans le cas d'OsHV-1, des analyses réalisées par microscopie et qPCR montre que l'entrée du virus dans les tissus est très rapide et induit immédiatement la réplication virale. OsHV-1 semble cibler les hémocytes pour l'initiation de la transcription, dès une heure après injection de la suspension virale (Martenot et al., 2017; Morga et al., 2017). De plus, des approches variées telles que transcriptomiques et d'immunohistochimie sur des coupes d'huîtres infectées par injection ont mis en évidence la présence de protéines virales codées par les ORF 25, 72 et 87 (codant respectivement pour des protéines membranaires et un inhibiteur d'apoptose) principalement dans les branchies, le manteau et la glande digestive, deux heures après le début de l'infection par injection. L'expression des gènes viraux codant pour des inhibiteurs de l'apoptose (ORF42, ORF87, ORF99 and ORF106) est détectée 2 heures après le début de l'infection des huîtres par OsHV-1 (Segarra et al., 2014a). L'expression précoce de ces gènes viraux pourrait indiquer qu'OsHV-1 est capable de moduler les processus apoptotiques de l'hôte (Jouaux et al., 2013; Martenot et al., 2017; Segarra et al., 2014a). La majorité des gènes viraux sont traduits dès 18 heures après infection (Segarra et al., 2014a), et des protéines virales sont détectées dans la majorité des tissus de l'huître 28 h après infection, excepté dans les gonades (Martenot et al., 2016).

De plus, comme pour de nombreux herpes virus (Sanchez and Lagunoff, 2015), OsHV-1 module le métabolisme énergétique de l'huître dès sa réplication. En effet, la réplication d'OsHV-1 est liée à une reprogrammation métabolique de la cellule hôte qui permet de maximiser la production d'énergie et la synthèse de nouveau matériel cellulaire (lipides, protéines, nucléotides) afin d'optimiser la synthèse de virions (Corporeau et al., 2014; Young et al., 2017).

5. Mécanismes de défense contre les pathogènes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'immunité se définit comme l'aptitude de l'organisme à résister à l'invasion de virus, de bactéries, de mycètes, de parasites ou de cellules étrangères ou anormales. Cette aptitude repose sur l'ensemble des tissus, des cellules et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections dans une réaction coordonnée que l'on qualifie de système immunitaire.

Historiquement, les systèmes de défense aux pathogènes ont été classés en deux catégories : les **systèmes innés** (présents chez tous les organismes) et **systèmes adaptatifs** (restreints aux vertébrés). Traditionnellement, on considérait le système immunitaire inné comme un ensemble simple de molécules et de processus permettant de défendre les cellules et les organismes contre les agents pathogènes. Selon cette définition, les systèmes innés reposaient sur des barrières chimiques, biochimiques ou mécaniques pour prévenir les attaques des agents pathogènes sans fournir de mémoire immunitaire spécifique à ceux-ci. Au contraire, les systèmes adaptatifs offraient des réponses immunitaires spécifiquement dirigées contre un pathogène, plus rapides, plus intenses et plus durables lors d'une seconde exposition à un pathogène déjà rencontré par le passé (Abbas et al., 2016). Cependant, depuis les dix dernières années un changement de paradigme a émergé estompant la frontière entre immunité innée et adaptative et laissant apparaître des nuances de la mémoire immunitaire dont certaines sont présentes chez des invertébrés (Criscitiello and de Figueiredo, 2013). Ainsi, des expositions antérieures d'arthropodes (bourdons, daphnies, copépodes) à un agent pathogène pouvaient fournir à ces organismes ou à leur descendants une protection renforcée contre des agressions ultérieures (Kurtz and Franz, 2003; Little et al., 2003; McTaggart et al., 2012; Sadd and Schmid-Hempel, 2006).

a. Réponse immunitaire innée chez *C. gigas*.

Chez l'huître creuse, des analyses transcriptomiques haut débit ont permis d'établir l'existence d'un système immunitaire complexe, capable de réagir à de nombreux agents pathogènes mais aussi aux stress environnementaux. La première ligne de défense est constituée par les barrières physiques et chimiques que sont la coquille, le mucus et les barrières épithéliales telles que le manteau. Le mucus recouvre les organes des bivalves peut contenir un large éventail de facteurs

antimicrobiens tels que des agglutinines ainsi que des enzymes hydrolytiques pouvant contribuer à la protection de l'hôte telles que le lysozyme et les protéases (revu par Allam and Raftos, 2015).

- *La réponse immunitaire innée à médiation cellulaire*

De nombreuses fonctions de défenses sont assurées par les hémocytes qui peuvent être localisés dans le système circulatoire, mais également infiltrés dans les différents tissus. Outre leurs implications dans la digestion et le transport des nutriments, l'excrétion, la détoxification, et la cicatrisation, ils sont capables de reconnaître et d'éliminer les pathogènes à travers plusieurs activités cellulaires (Allam and Raftos, 2015; Cheng, 1996; Feng, 1988). Les hémocytes agissent lors d'infections en coordination avec les facteurs humoraux que nous détaillerons dans le point suivant.

L'infiltration hémocytaire : Lors d'une infection ou une blessure, le nombre d'hémocytes dans le système circulatoire augmente (Allam and Raftos, 2015; Cheng, 1996; Feng, 1988). Les hémocytes sont ensuite concentrés vers le site de l'infection où ils s'agrègent entre eux pour limiter l'étendue de la lésion ou de l'infection (Feng, 1988). Au contact des hémocytes les pathogènes sont ensuite éliminés par phagocytose ou encapsulés.

La phagocytose : La phagocytose a été observée chez les huîtres lors d'infection par des virus, bactéries ou protozoaires, les hémocytes (Anderson, 1994; Renault et al., 2000). Ce processus se décompose en 5 étapes majeures décrites dans la Figure 21: le pathogène est tout d'abord reconnu par les hémocytes, c'est la reconnaissance et l'attachement. La reconnaissance du pathogène est suivie d'une extension de la membrane plasmique autour du pathogène, c'est l'internalisation par endocytose. La membrane se referme dans une vésicule membranaire, le phagosome. Le phagosome fusionne ensuite avec des lysosomes pour former un phagolysosome. Des signaux activent les enzymes du phagolysosome qui vont produire des substances toxiques telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont alors dégrader l'agent pathogène. Les mêmes substances peuvent être libérées et tuer des pathogènes dans le milieu extracellulaire.

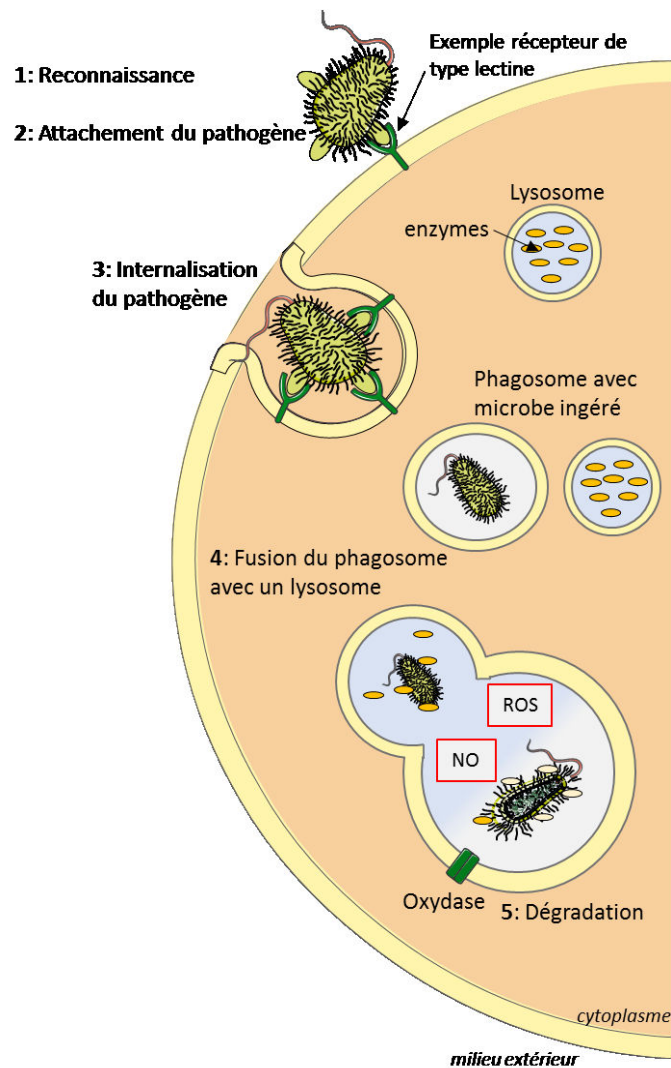


Figure 21 : Phagocytose et lyse intracellulaire des microbes

Reconnaissance des pathogènes et attachement : De nombreux processus immunitaires tels que la phagocytose ou l'expression d'effecteurs antimicrobiens par exemple sont induits par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes, les PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), ou par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux lésions DAMPs (damage-associated molecular pattern). Les récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent les PAMPs et les DAMPs sont de deux types. Ils peuvent être associés aux membranes cellulaires, ils sont alors appelés PRR pour « pattern recognition receptor » ou être

sous forme de protéine solubles, les PRPS pour « pattern recognition protein ». Les PRRs possèdent une certaine spécificité dans les motifs et les pathogènes reconnus. Parmi les PRRs on trouve principalement chez les bivalves les Toll-like (TLRs), les récepteurs de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRPs) et les lectines.

Les TLRs sont des protéines transmembranaires comportant un domaine extracellulaire composé de nombreux motifs LRR (leucin-rich repeats) capables de lier une grande variété de PAMPs, une région transmembranaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique Toll /IL-1R (TIR) conservé (Takeda and Akira, 2004). Environ 20 transcrits de TLRs ont été identifiés chez *C. gigas* (Zhang et al., 2011).

Les PGRPs sont des protéines ubiquitaires présentes chez la majorité des espèces animales dont *C. gigas* (Itoh and Takahashi, 2008). Elles sont impliquées dans la reconnaissance de bactéries à travers le composant majeur de la paroi cellulaire ; le peptidoglycane (Dziarski and Gupta, 2006). Les lectines sont les PRRs les plus connus chez les mollusques bivalves. Il s'agit de glycoprotéines synthétisées et secrétées par les hémocytes, capables de se lier à la surface des microorganismes, avec un large spectre de reconnaissance. Les lectines jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des pathogènes, la transduction du signal ainsi que l'adhésion cellulaire et l'inflammation (Kilpatrick, 2002). Elles possèdent des propriétés d'agglutination et d'opsonisation qui ont été mises en évidence chez les bivalves (Chatterjee and Adhya, 2013).

Le système « interferons like » : Des gènes codant pour des senseurs d'acides nucléiques viraux ont été identifiées dans le génome de *C. gigas* (Figure 22) et sont surexprimés lors d'infection par OsHV-1 (Green et al., 2015; Wang et al., 2018). Il s'agit de membres de la famille des TLR « Toll like receptors » spécifiques des ARN viraux comme TLR3 (Fleury and Huvet, 2012; Zhang et al., 2015a), des RLR et MDA-5 (RIG-like receptors) qui identifient les ARNs produits par les virus dans le cytosol. L'engagement de ces récepteurs active différentes voies de signalisation telles que décrit dans Figure 22. L'engagement des TLR active la voie TLR/NF- κ B, tandis que la reconnaissance d'ARN viraux par RIG-1 ou MDA-5 active la voie RLRs/STING. Les gènes codant pour ces différents éléments ont été identifiés chez l'huître creuse (Fleury and Huvet, 2012; Green et al., 2015; Green and Montagnani, 2013; Guo et al., 2015; He et al., 2015; Rosani et al., 2015b). Ces voies de signalisation induisent l'expression de cytokines et de peptides antimicrobiens.

Les cytokines se lient aux récepteurs des cellules adjacentes infectées ou non et stimulent l'expression de la voie de signalisation JAK/STAT qui aboutit à l'expression d'ISG (interferons stimulating genes). Les protéines de cette voie (STING, SOC, JAK, STAT) ont été identifiées chez l'huître creuse (Green et al., 2015; He et al., 2015; Rosani et al., 2015b). Le génome de *C. gigas* code pour de nombreux ISG, tels que la viperine, IFI44, ou ADAR-L (Green et al., 2015; Renault et al., 2011; Rosani et al., 2015b; Wang et al., 2018) et sont induits en réponse à une injection de poly (I:C) (Green and Montagnani, 2013). Chez les vertébrés, l'expression des ISG conduit à l'induction d'un état antiviral avec l'activation d'enzymes dégradant l'ARN viral, inhibant l'expression des gènes viraux, l'assemblage des virions, et la synthèse protéique.

Du fait de l'absence de lignées cellulaires chez *C. gigas*, la caractérisation fonctionnelle de ces molécules est complexe. Grâce à des modèles hétérologues tels que des cellules de mammifères de la lignée cellulaire Vero (African green monkey kidney) infectées par l'HSV-1, l'activité antivirale de l'hémolymphe de *C. gigas* a pu être démontrée contre HSV-1. Cette activité semble correspondre à l'expression de la cavortine, qui est une des protéines majoritaires de l'hémolymphe et qui contient un domaine superoxyde dismutase (Gonzalez et al., 2005; Itoh et al., 2011; Scotti et al., 2007); elle pourrait interférer avec la réplication virale (Green et al., 2014b).

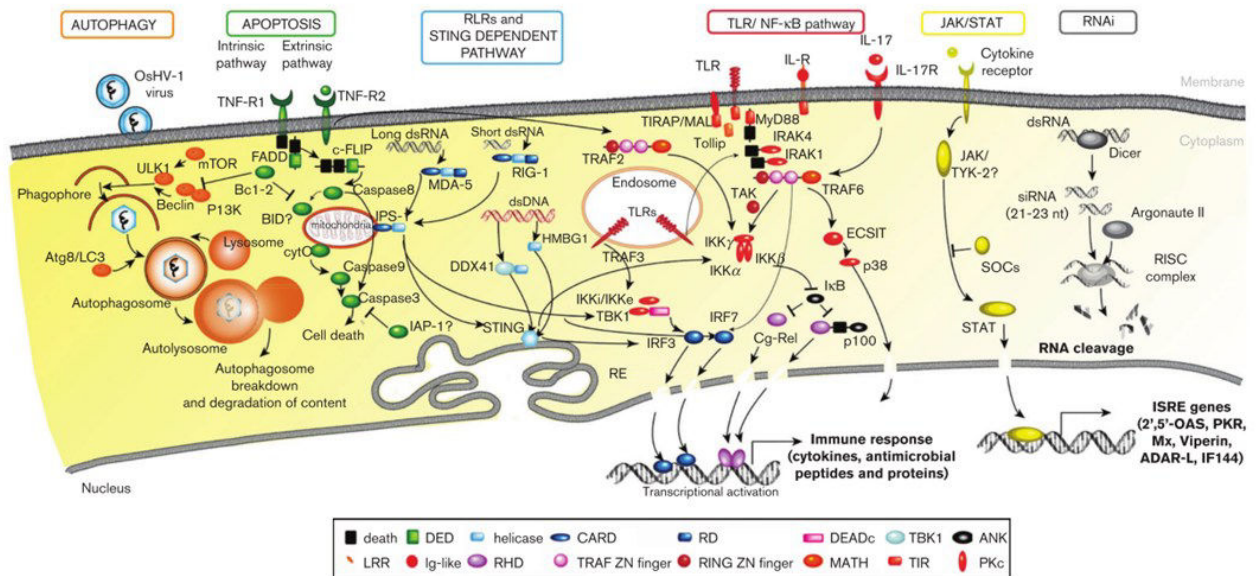


Figure 22: Réponses antivirales chez l'huître creuse déduites à partir de séquences identifiées dans le génome de *C. gigas* et des systèmes antiviraux connus des insectes et des vertébrés. TIR, Toll/IL1 receptor; Ig, immunoglobulin; DD, death domain; LRR, leucine rich repeat; TM, transmembrane; PKc, protein kinase c; RHD, rel homology domain; IPT, immunoglobulin-like fold; RING, RING-finger (really interesting new gene) domain; zf-TRAF, TRAF type zinc finger; MAT, meprin and TRAF-C homology domain; UBL-TBK1-like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins (Green et al., 2015).

L'encapsulation : L'encapsulation est une réponse immunitaire majeure observée chez de nombreux invertébrés tels que la palourde (Montes et al., 1995; Smolowitz et al., 1998). Elle survient lorsque les particules ou les pathogènes sont de taille trop importante pour être phagocytés, ils sont encapsulés. Ce processus se traduit par le regroupement de cellules hémocytaires qui s'organisent en couches concentriques afin de former une capsule fine autour du pathogène. La structure ainsi formée est mélanisée par l'activité de la phenoloxydase présente à la surface des hémocyte. Finalement la destruction du pathogène survient suite à l'activité des enzymes lysosomales et la génération de ERO par les hémocytes.

La mort cellulaire programmée : L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, régule la destinée cellulaire aussi bien dans un contexte physiologique (contrôle de la population de cellules,

renouvellement cellulaire, destruction de structures temporaires lors de l'embryogénèse, ou élimination de cellules superflues) que dans un contexte pathologique (pour éliminer les cellules indésirables telles que les cellules tumorales, infectées par un virus, ou les cellules présentant des dommages irréversibles de l'ADN). Des études ont pu montrer l'importance de l'apoptose dans le fonctionnement immunitaire des mollusques limitant la propagation de l'agent pathogène et les dommages inflammatoires des tissus environnants (He et al., 2015; Martenot et al., 2017; Wang et al., 2018). L'apoptose est modulée par des signaux extra et intracellulaires (Figure 23). La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée à la surface cellulaire par la liaison de ligands de type TNF (tumor necrosis factor) ou FAS à leurs récepteurs qui, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FADD, active les caspases (protéines clés de l'apoptose) initiateurs de l'apoptose (Caspase 8 et 10) et qui déclenchent le processus de mort cellulaire. Cette activation est également rétrocontrôlée par la voie NF- κ B.

La voie intrinsèque de l'apoptose est mitochondriale : dans cette voie, c'est la libération du cytochrome C par la mitochondrie qui active l'apoptose cellulaire. Cette libération est contrôlée par de nombreux gènes tels que Bcl-2 et Bcl-XL et est souvent déclenchée par un stress génotoxique (lésions de l'ADN) ou un stress oxydatif. La libération du cytochrome C déclenche la cascade des caspases en se liant à la protéine adaptatrice Apaf1 et en favorisant la formation d'un apoptosome, structure capable de recruter la procaspase 9 et de l'activer. Il existe dans la famille des Bcl des protéines favorisant l'apoptose (Bad, Bak, Bax, et Bid) et d'autres inhibant l'apoptose telles que Bcl-2. L'équilibre instable entre ces protéines est déplacé par un stress vers l'apoptose.

Chez *C. gigas*, les gènes codant pour la machinerie apoptotique semblent très conservés (Zhang et al., 2012). Le génome de *C. gigas* code pour 48 gènes inhibiteurs de l'apoptose (Zhang et al., 2012) et des transcrits tels que TNF ou la caspase 3 sont surexprimés en réponse à une infection par OsHV-1 chez des huîtres sensibles à l'infection virale, suggérant l'implication de ces processus dans la réponse antivirale (de Lorgeril et al., 2018).

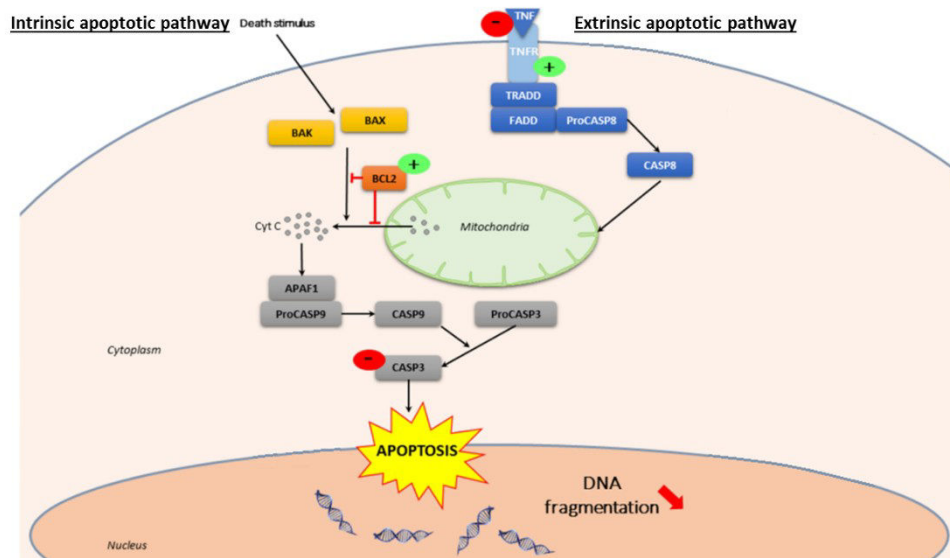


Figure 23 : Voies de signalisation régulant l'apoptose (Martenot et al., 2017)

L'autophagie est un autre processus de la mort cellulaire programmée : elle permet de maintenir l'homéostasie cellulaire et constitue un des mécanismes de renouvellement des organites cytoplasmiques. Des travaux ont montré que ce processus est impliqué dans les mécanismes de l'immunité innée et semble capable de sélectionner des cibles comme des pathogènes intracellulaires pour induire leur dégradation enzymatique. Chez les vertébrés, des senseurs d'ARN viraux comme TLR3 ou TLR8 sont connus pour induire l'autophagie (Richetta and Faure, 2013). Chez *C. gigas*, l'autophagie est induite en réponse à l'infection par OsHV-1 et semble avoir un effet protecteur sur l'hôte (Moreau et al., 2015).

- *La réponse immunitaire innée à médiation humorale*

Chez les bivalves, l'immunité à médiation humorale repose sur plusieurs molécules biologiquement présentes dans l'hémolymphe. Ces molécules actives sont classées selon deux catégories : les biomolécules sérologiquement actives (opsonines, lysines, agglutines, facteurs antimicrobiens, lysozymes) et les enzymes d'origine lysosomale (aminopeptidases, β -

glucuronidases, acide phosphatase, alcaline phosphatase, α -mannosidase, estérases et peroxydases).

Le système pro-phénoloxydase/phénoloxydase (proPO) : Il joue un rôle crucial dans l'immunité innée chez les invertébrés, il est à l'origine de la production de mélanine. La cascade de réaction est activée suite à des stimulations de stress cellulaire ou en présence de microorganismes et intervient en appui aux réactions de phagocytose et d'encapsulation (Cerenius and Söderhäll, 2004; Hellio et al., 2007). Chez *C. gigas*, la PO est présente sous forme inactive, la proPO. La pro-protéine est clivée par une sérine protéase endogène puis sous sa forme active, la PO catalyse la réaction de conversion de phénol en quinones, qui forment par polymérisation la mélanine. Les composés intermédiaires de cette réaction sont bactéricides et interviennent dans les phénomènes de reconnaissance du non-soi (Cerenius and Söderhäll, 2004). Des travaux ont mis en évidence des activités PO présentes dans les hémocytes chez *C. gigas* (Hellio et al., 2007), qui exercent un effet antibactérien sur les bactéries pathogènes de *C. gigas* (Luna-Acosta et al., 2010).

Les enzymes hydrolytiques : Chez *C. gigas*, les enzymes telles que les phosphatases alcalines et les lysozymes ont été identifiées (Itoh et al., 2007; Wang et al., 2018). Elles sont impliquées dans la dégradation des organismes pathogènes dans les cellules ou dans l'hémolymphe (Xue and Renault, 2000). Elles sont induites suite à une exposition aux bactéries ou à leurs composants structuraux.

Les inhibiteurs de protéases : Il s'agit de protéines régulant l'activité catalytique des catalases. Ils permettent d'éviter l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes (sérines protéases) intervenant dans l'activation du système proPO et induisant des dommages cellulaires. Ils peuvent inhiber des protéases qui permettent aux agents pathogènes de pénétrer pour se multiplier au sein de l'hôte. Le génome de *C. gigas* contient des gènes codant des protéines de type α -2-macroglobuline, des serpins et des TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) (Gueguen et al., 2003; Montagnani et al., 2001).

Les peptides antimicrobiens et les molécules cytotoxiques, antivirales: Il s'agit d'effecteurs essentiels de la défense immunitaire chez les bivalves marins. Présents chez la majorité des organismes, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions immunitaires telles que la

destruction des microorganismes (Boman, 1995). Ils sont synthétisés dans les granulocytes même en absence de menace mais la présence de pathogènes induit l'augmentation de leur concentration dans l'hémolymphe (Mitta et al., 1999). Chez les mollusques bivalves, plusieurs peptides antimicrobiens ont été caractérisés notamment chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* (Charlet et al., 1996; Mitta et al., 2000a, 2000b). Ces travaux ont permis de mettre en évidence quatre groupes de peptides cationiques riches en cystéine et présentant des ponts disulfures : les myticines, les mytilines, les mytimycines et les défensines. Chez *C. gigas*, la purification des peptides antimicrobiens conduite sur l'hémolymphe a permis l'identification d'un peptide dont la structure de type antibiotique (bloquant la croissance des bactéries) laisse présager une origine bactérienne (Defer et al., 2013). Un peptide antimicrobien de type défensine a également été identifié chez *C. gigas* (Gueguen et al., 2009, 2006). Des travaux rapportent une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans des extraits d'huître creuse (Olicard et al., 2005), et démontrent également un effet antiviral de l'hémolymphe de *C. gigas* sur le virus HSV-1 et NPI (Necrose pancreatic infection, Olicard et al., 2005)).

Les enzymes antioxydantes : Des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites en continu lors du fonctionnement du métabolisme aérobie. Non prises en charge, les ROS sont particulièrement nocives pour les organismes et peuvent induire un stress oxydatif et des dommages au niveau de macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (ADN, protéines, lipides) (Storey, 1996). Pour limiter le stress oxydant, les organismes possèdent différentes enzymes de détoxification. La superoxyde dismutase (SOD) transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) lui-même décomposé en H_2O et O_2 par la catalase (CAT) ou par les glutathions peroxydases (GPx) et la thiorédoxine peroxydase (TrxP). La glutathion-S-transférase (GST) est impliquée dans les processus de détoxification des xénobiotiques et le piégeage des peroxydes lipidiques (Migdal and Serres, 2011). La Figure 24 résume l'ensemble des voies impliquées dans la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERA) mises en évidence dans les hémocytes de bivalves (Gu et al., 2016).

Par leur effet bactéricide, les ERO et les ERA sont aussi impliquées dans l'élimination des agents pathogènes (Migdal and Serres, 2011) comme par exemple au cours de la phagocytose (Figure 24). Chez les invertébrés marins, des espèces réactives de l'azote telles que l'oxyde nitrique ($\bullet\text{NO}$) sont produites à partir de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), en réponse aux pathogènes (Donaghy et al., 2015; Gu et al., 2016).

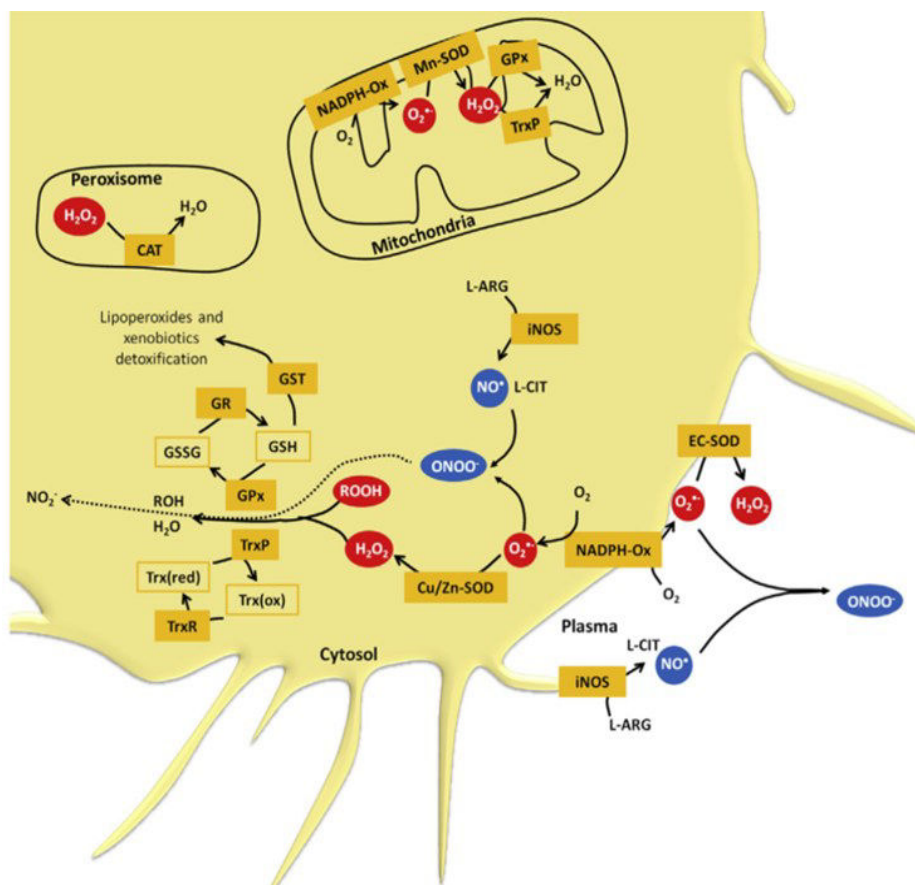


Figure 24 : Enzymes du système antioxydant impliquées dans la production et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (en rouge) ou de l'azote (en bleu) présents dans les hémocytes, le compartiment intracellulaire (mitochondrie, peroxysome, cytoplasme) et extracellulaire chez les bivalves (Richard et al., 2016).

Les protéines de stress : Les HSP (Heat shock protein) sont surexprimées en réponse à un stress biotique ou abiotique et interviennent dans la réparation des lésions et les infections. Des travaux ont récemment montré que l'expression des transcrits codants l'HSP70 étaient augmentés en réponse à OsHV-1 : les auteurs suggèrent leur possible implication dans les processus de l'immunité innée antivirale (De la Re Vega et al., 2017).

b. Une mémoire immunitaire chez l'huître creuse ?

- Amorçage immunitaire « immune priming »

Le terme de **priming immunitaire** fait référence à l'observation d'une réponse immunitaire accrue lors d'une seconde rencontre d'un organisme avec un pathogène (Little and Kraaijeveld, 2004). Il pourrait alors se définir comme la capacité d'un système immunitaire à stocker ou simplement utiliser les informations sur un antigène ou un parasite précédemment rencontré, lors d'une exposition secondaire (Milutinović and Kurtz, 2016). Ce phénomène a été observé chez plusieurs mollusques bivalves tels que *Chlamys farreri* ou *Crassostrea gigas*.

La survie des pétoncles exposés à *Vibrio anguillarum* est améliorée lorsque les bivalves avaient déjà été exposés à cette bactérie dans l'eau de mer et après plusieurs expositions à ce même pathogène, l'activité phagocytaire était augmentée (Cong et al., 2008).

L'amorçage immunitaire a aussi été mis en évidence chez l'huître creuse. Une stimulation primaire d'huîtres par leur exposition à une souche de *Vibrio splendidus* désactivée a provoqué une augmentation du nombre total d'hémocytes circulants, de leur régénération ainsi qu'une phagocytose accrue lors d'une seconde exposition à *V. splendidus* (Zhang et al., 2014).

Le poly I:C, acide polyinosinique-polycytidylique est un ARN double brin synthétique structurellement semblable à l'ARN de certains virus et capable de susciter une réponse immunitaire en stimulant une infection virale. Une injection de poly I:C stimule un état antiviral chez *C. gigas*. Lorsque des huîtres sont exposées à OsHV-1 vingt-quatre heures après l'injection de poly I:C, la proportion d'huîtres positives au virus est significativement réduite. L'acquisition de cet état antiviral semble persister et protéger les huîtres à long terme (5 mois) contre une infection en milieu naturel (Lafont et al., 2017). Cependant, le poly I:C stimule une réponse immunitaire spécifiquement antivirale (Green and Montagnani, 2013) et ne parvient pas à protéger les huîtres contre une bactérie pathogène telle que *Vibrio tasmaniensis* (Lafont et al., 2017). Green et collaborateurs ont aussi mis en évidence que la descendance (larve D-veligeres) issues de parents traités avec du poly I:C avait deux fois plus de chance de survivre à l'exposition à OsHV-1 par rapport aux témoins. Ces larves exprimaient plus fortement des ARNs codant IRF2, un facteur clé de l'immunité antivirale (Green et al., 2016).

Ainsi ces travaux mettent en évidence l'existence de stimulation immunitaire innée et de la mémoire chez *C. gigas*. La stimulation immunitaire par injection de poly I:C induit une protection antivirale contre OsHV-1, à long terme et transmissible à la descendance.

6. Effets de la température sur l'interaction *C. gigas*-OsHV-1

Dès les premiers signalements en 1970, les mortalités d'huîtres creuses ont été associées à des variations de la température de l'eau de mer. Ces épisodes de mortalités survenaient dès que la température de l'eau dépasse les 19°C et sont alors qualifiés de mortalités estivales (Samain and McCombie, 2008). La température n'est cependant pas le seul facteur de risque : la survenue des mortalités estivales coïncide aussi avec la période de l'année où les réserves énergétiques de l'huître sont au plus bas et où la demande en énergie et l'effort reproductif sont les plus importants (Berthelin et al., 2000; Samain and McCombie, 2008).

A partir des années 2008, les mortalités massives causées par OsHV-1 μ Var surviennent du printemps à l'automne après une augmentation marquée de la température moyenne de l'eau de mer (Garcia et al., 2011) en France, en Irlande et en Australie (Clegg et al., 2014; Paul-Pont et al., 2014; Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014).

En France, ces épisodes sont enregistrés dès que la température de l'eau de mer atteint le seuil minimal de 16°C à 17°C (EFSA, 2010; Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014). Au cours d'une année, OsHV-1 est généralement détecté en premier dans le sud de la France, où les températures sont plus élevées, puis la détection suit un gradient Sud/Nord avec l'augmentation progressive des températures sur les côtes françaises (EFSA, 2010; Garcia et al., 2011). En 2009, une étude réalisée dans la lagune de Thau montre que les mortalités d'huîtres creuses se produisent systématiquement lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C, quels que soient l'âge des huîtres et la date de déploiement, définissant ainsi la température maximale de survenue des mortalités à 24°C (Pernet et al., 2012).

Lorsque des huîtres donneuses infectées en milieu naturel sont placées en cohabitation avec des huîtres saines, la transmission virale d'OsHV-1 est optimale à des températures comprises entre

16°C et 22°C. Au-delà de cette fourchette, la transmission virale et les mortalités associées sont significativement réduites (Pernet et al., 2012; Petton et al., 2013).

En dessous de 13°C, la transmission du virus semble nulle, et OsHV-1 n'est plus détecté après 40 jours à ces températures, suggérant que les faibles températures pourraient offrir une voie de limitation de l'infection virale (Petton et al., 2013). Des travaux complémentaires montrent qu'à faible température, l'ADN d'OsHV-1 persiste dans les huîtres malgré l'absence de mortalité, et qu'après élévation de la température à 21°C le virus peut être réactivé (Pernet et al., 2015, 2013).

Lorsque des huîtres infectées (soit préalablement en milieu naturel soit par injection intramusculaire) sont placées à des températures supérieures à 21°C, les mortalités sont plus importantes et plus précoces (De Kantzow et al., 2016; Petton et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la réplication virale a pu être augmentée avec l'augmentation de la température (Petton et al., 2013). Au contraire, lorsque les huîtres sont préalablement acclimatées à des températures supérieures à 21°C avant d'être infectées (par cohabitation), les mortalités sont réduites si l'on augmente la température, avec réduction de l'ADN viral dans les animaux après deux jours de cohabitation, suggérant une augmentation des fonctions antivirales.

Peu de données concernent la persistance d'OsHV-1 à des températures supérieures à 21°C, mais il semble qu'OsHV-1 persiste sans modification de sa virulence à 25°C (Martenot et al., 2015). Cependant, la stabilité du virus apparaît réduite dans le temps à 25°C, puisque OsHV-1 n'est plus infectieux après 33h (contre 72h à 16°C).

IV. Objectifs de thèse

Face aux défis imposés par l'émergence de pathogènes en milieu marin et la récurrence des épisodes de mortalités d'huîtres creuses associées à OsHV-1, il paraît important d'identifier des méthodes « curatives ». Les modulations des paramètres environnementaux semblent correspondre à une stratégie prometteuse dans la régulation des maladies.

Plusieurs études démontrent effectivement que la température influence le risque de mortalité des huîtres. La transmission d'OsHV-1 est optimale entre 16 et 24°C, et les températures inférieures à 16°C ralentissent la survenue des mortalités d'huîtres mais ne les empêchent pas. Au-delà de 24°C, l'effet de la température demeure ambigu. Définir les mécanismes sous-jacents à la réduction des mortalités d'huîtres à hautes températures sont des enjeux cruciaux dans le développement de mesures de contrôle d'OsHV-1 en aquaculture. Les hautes températures semblent réduire les mortalités et l'ADN viral dans les huîtres lorsqu'elles sont préalablement acclimatées à ces hautes températures avant l'infection. Cependant, on ignore actuellement les mécanismes mis en jeu par la température : soit la température affecte *Crassostrea gigas* en modifiant sa sensibilité au virus, soit la température agit sur l'agent pathogène pour moduler sa pathogénicité, soit elle joue sur les deux plans. Il est également indispensable de savoir si les huîtres ayant survécu à l'infection virale par une action de la température seront encore capables ou non de transmettre OsHV-1 à des huîtres saines, et si elles restent protégées de l'infection de façon durable.

Mon objectif de thèse est d'étudier l'effet des hautes températures sur l'interaction OsHV-1/*C. gigas*. Pour cela, deux températures sont testées et comparées à la température contrôle pour l'infection de 21°C. Les températures testées sont 26°C, dont l'effet sur l'interaction OsHV-1/*C. gigas* reste ambigu, et 29°C, qui selon les données actuelles semble améliorer la survie des huîtres infectées. Ces températures sont dans la gamme de tolérance de l'huître car sa filtration est maintenue jusqu'à environ 32°C/33°C. La température de 21°C est choisie comme condition contrôle car c'est la température favorable à la réplication et à la transmission d'OsHV-1 et proche de la température optimale pour la croissance et la reproduction des huîtres.

Pour mon travail de thèse, nous avons choisi de réaliser les infections virales par la méthode d'infection par cohabitation. Nous analysons les mécanismes dans les huîtres receveuses, qui

sont celles placées en cohabitation avec les huîtres donneuses préalablement infectées par injection intramusculaire avec une suspension virale d'OsHV-1. La méthode de cohabitation permet de reproduire la voie d'entrée naturelle des pathogènes. Les animaux utilisés sont des NSI (Naissains standardisés Ifremer) produits en conditions de laboratoire et n'ayant jamais été au contact du virus OsHV-1. Ils sont âgés de 8 mois lors de l'expérience et représentent parfaitement la population de jeunes huîtres touchées lors des épisodes de mortalités en milieu naturel.

Première partie de la thèse : Comment agissent les hautes températures sur l'interaction *C. gigas*-OsHV1 ?.

Le premier chapitre de ma thèse vise à identifier si les hautes températures modulent la sensibilité de l'huître creuse à l'infection virale, ou si elles modifient la persistance d'OsHV-1, ou si elles ont cette double action. Nous avons ensuite analysé l'impact des hautes températures sur la persistance d'OsHV-1 et les possibilités de réactivation et de transmission virale des huîtres ayant survécu à une infection à hautes températures. Finalement, nous avons mesuré la sensibilité à long terme en milieu naturel des huîtres ayant survécu à une infection virale à hautes températures.

Pour répondre à ces objectifs, nous présentons une expérimentation réalisée en 3 phases.

Phase 1 : Trois traitements sont appliqués à la suspension virale utilisée pour l'injection des huîtres donneuses. Cette suspension d'OsHV-1 est incubée soit à 21°C, 26°C ou 29°C avant injection dans les donneuses. Puis chaque série de donneuses a été placée en cohabitation avec des huîtres saines (receveurs) à trois températures (21°C, 26°C ou 29°C) selon un plan factoriel fractionnaire.

Phase 2 : Les huîtres receveuses sont suivies pour leur survie pendant 14 jours et sont échantillonnées pour la quantification de l'ADN d'OsHV-1 et l'expression de quelques gènes viraux.

Phase 3 : Les huîtres receveuses survivantes ont ensuite toutes été placées à 21°C pour évaluer le potentiel de réactivation du virus, avant d'être transférées dans des fermes ostréicoles pour évaluer leur sensibilité à long terme à la maladie en milieu naturel.

Seconde partie de la thèse : Quels sont les mécanismes qui expliquent l'impact des hautes températures sur l'interaction *C. gigas*-OsHV1 ?

Le second chapitre de ma thèse est consacré à l'étude des mécanismes induits chez l'huître creuse en réponse à une infection par OsHV-1 à hautes températures. Nous avons comparé les mécanismes moléculaires mis en jeu chez les huîtres receveuses à 29°C et 21°C de l'expérimentation présentée dans la partie précédente. Nous avons analysé les réponses transcriptomiques des huîtres receveuses ainsi que les modifications de leur composition lipidique.

Chapitre 1 : Modulation
de la susceptibilité de *C.*
gigas et de la virulence
d'OsHV-1 par l'exposition
des huîtres à hautes
températures.

- *Présentation de l'article 1*

En milieu marin, la température est un paramètre déterminant dans le déclenchement de maladies et l'émergence de pathogènes (Burge et al., 2014; Harvell et al., 2002). La température module l'aptitude d'un parasite à coloniser son hôte et la capacité de celui-ci à se défendre. Il existe toute une gamme d'influences possible de la température sur l'infectivité des parasites (réplication, virulence), et/ou sur la sensibilité de l'hôte (entrée du pathogène, réponse immunitaire ...). L'exposition d'invertébrés infectés à des hautes températures permet de réduire significativement la mortalité causée par des agents pathogènes comme lors d'infection de crevettes par le White Spot Syndrome Virus (WSSV) (Rahman et al., 2006).

La température de l'eau de mer définit le début et la fin des épizooties huîtres causées par OsHV-1. En milieu naturel, la transmission d'OsHV-1 est optimale et les mortalités d'huîtres associées sont maximales lorsque la température de l'eau de mer est comprise entre 16°C et 24°C (Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014). En laboratoire, la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à des températures comprises entre 13°C et 29°C augmente lorsque l'eau de mer dépasse 26°C (Petton et al., 2013). Mais le rôle des hautes températures reste ambigu, lorsque les huîtres sont infectées (en milieu naturel ou par injection) puis exposées à des températures comprises entre 18°C et 26°C, la précocité et l'importance des mortalités augmentent à hautes températures (De Kantzow et al., 2016; Petton et al., 2013).

Le travail présenté dans ce premier article vise à préciser le rôle des hautes températures sur la sensibilité de l'huître creuse à l'infection virale, et sur la persistance/virulence d'OsHV-1. "Temperature modulate disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1" publié dans *Fish and Shellfish Immunology*.

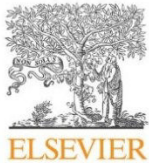
Des huîtres SPF (Specific pathogen free) âgées de 8 mois ont été injectées avec une suspension d'OsHV-1 (donneurs) ou avec de l'eau de mer synthétique (témoins) et ont été mises en cohabitation avec des huîtres SPF « receveurs » ou « receveurs témoins » (Fig. 1).

Les receveurs étaient préalablement acclimatés ou ajoutés directement (non acclimatés) dans les bassins à 21°C, 26°C ou 29°C. Leur survie a été suivie pendant 14 jours, et l'infectivité d'OsHV-1 et la réplication virale ont été évaluées (**expérience 1 A**).

Afin d'étudier le potentiel de réactivation et de transmission du virus chez les receveurs ayant survécu à une infection à haute température, les receveurs ont ensuite tous été placés à 21°C et de nouvelles huîtres SPF ont été ajoutées aux bassins (**expérience 1 B**).

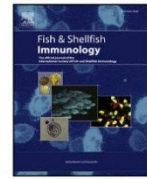
Enfin, les receveurs survivants ont été transférés dans une zone ostréicole lors de la survenue d'un épisode de mortalités causé par OsHV-1 en milieu naturel afin d'évaluer la sensibilité à long terme des receveurs à la maladie (**expérience 1 C**).

Parallèlement, une deuxième expérience (**expérience 2**) a été réalisée afin d'évaluer l'effet direct de la température sur le virus OsHV-1. La suspension virale et l'eau de mer de synthèse (témoin) ont été incubées à 21°C, 26°C et 29°C avant l'injection dans des huîtres donneuses maintenues à 21°C. Elles sont ensuite placées en cohabitation avec des receveuses maintenues à 21°C. La survie des receveuses est suivie pendant 14 jours, ainsi que l'infectivité et la réplication d'OsHV-1.



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

Temperature modulate disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1

Lizenn Delisle^a, Bruno Petton^b, Jean François Burguin^a, Benjamin Morga^c, Charlotte Corporeau^a, Fabrice Pernet^{a,*}

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

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

^c Ifremer/Laboratoire de génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM), Avenue de Mus de Loup, 17390, La Tremblade, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Bivalve
Health
Marine disease
Mortality risk
Temperature
Virulence

ABSTRACT

Temperature triggers marine diseases by changing host susceptibility and pathogen virulence. Oyster mortalities associated with the Ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1) have occurred seasonally in Europe when the seawater temperature range reaches 16–24 °C. Here we assess how temperature modulates oyster susceptibility to OsHV-1 and pathogen virulence. Oysters were injected with OsHV-1 suspension incubated at 21 °C, 26 °C and 29 °C and were placed in cohabitation with healthy oysters (recipients) at these three temperatures according to a fractional factorial design. Survival was followed for 14 d and recipients were sampled for OsHV-1 DNA quantification and viral gene expression. The oysters were all subsequently placed at 21 °C to evaluate the potential for virus reactivation, before being transferred to oyster farms to evaluate their long-term susceptibility to the disease. Survival of recipients at 29 °C (86%) was higher than at 21 °C (52%) and 26 °C (43%). High temperature (29 °C) decreased the susceptibility of oysters to OsHV-1 without altering virus infectivity and virulence. At 26 °C, the virulence of OsHV-1 was enhanced. Differences in survival persisted when the recipients were all placed at 21 °C, suggesting that OsHV-1 did not reactivate. Additional oyster mortality followed the field transfer, but the overall survival of oysters infected at 29 °C remained higher.

1. Introduction

The risk of disease outbreaks in the marine environment are governed by interactions between host, parasite, and environmental factors [1]. Of all the environmental factors, seawater temperature plays a decisive role in triggering diseases [2]. Temperature modulates the aptitude of a parasite to colonize its host and the ability of the host to defend itself. For example, mass mortalities of shrimps and sea-stars caused by pathogenic viruses occurred during the warm season [3–5]. Similarly, when abalones were exposed to the pathogenic bacteria *Vibrio harveyi*, an increase of seawater temperature of one degree during the spawning season altered the host–parasite relation in favor of the pathogen and lead to epidemic disease [6].

In warm-blooded species, fever, which consists of an increase in body temperature, makes it possible to fight against viral and bacterial infections. Although marine animals are mostly ectotherms (cold blooded), the application of high temperature treatments has proven efficient to treat diseases. For instance, shrimps infected with the white spot syndrome virus at 32 °C showed no mortality, whilst they all died

at 25 °C [3,7].

There is a range of possible influences of high temperature effects on the infectivity of parasites (replication, virulence) and host susceptibility. For instance, high temperature improves shrimp resistance without altering the infectivity of the white spot syndrome virus [3,8]. However, the stability of some shellfish pathogens is altered at high temperature, as reported for the abalone herpesvirus [9].

This study focuses on the effect of high temperatures on the interaction between the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1). Indeed, OsHV-1 outbreaks have caused mass mortalities in young oysters along the European coastline since 2008 and the virus has spread to Australia and New Zealand [10–13]. Seawater temperature defines the start and the end of OsHV-1 epizootics. In France, the optimal seawater temperature range for disease transmission and subsequent mortalities is between 16 °C and 24 °C in the field [14,15]. In the laboratory, oyster survival of individuals acclimated to temperatures between 13 °C and 29 °C exposed to OsHV-1 were much higher when temperatures were exceeded 26 °C [16]. An Australian study comparing survival of oysters injected with OsHV-1 at

* Corresponding author.

E-mail address: fabrice.pernet@ifremer.fr (F. Pernet).

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.056>

Received 29 March 2018; Received in revised form 24 May 2018; Accepted 29 May 2018

Available online 30 May 2018

1050-4648/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

14 °C, 18 °C, 22 °C and 26 °C shows that it was the lowest at 26 °C [17]. Furthermore, the infectivity of OsHV-1 kept for 54 h at 25 °C is lower than at 16 °C [18].

Although the temperature clearly influences the risk of oyster mortality caused by OsHV-1, it is not known at this time whether the temperature affects the host, by modifying its susceptibility to the virus, the pathogen, by acting on virulence, or both. Also, we do not know if oysters that have survived a high temperature infection are able to transmit the virus to healthy animals and if they remain protected against a second infection. The answer to these questions is crucial to develop OsHV-1 control measures from heat treatment.

Here we tested the effect of three temperatures on disease susceptibility of oysters and virulence of OsHV-1. The control was 21 °C as this temperature is permissive to OsHV-1 replication and close to the optimal temperature for oyster growth and reproduction [19]. The tested temperatures were 26 °C, a temperature whose effects on the survival of the oyster remains to be clarified, and 29 °C, a temperature at which the survival of oysters exposed to the virus is improved [16,17]. These two temperatures are in the thermal range of the oyster since the filtration stops only at 33 °C and mortality occurs at 38 °C [19] (*Petton com pers*).

The first experiment was designed to investigate the effects of high temperatures on OsHV-1 transmission, infection and mortality of oysters. Specific-pathogen-free (SPF) oysters were injected with OsHV-1 suspension (pathogen donors) or synthetic seawater (controls) and placed in cohabitation with SPF oysters hereafter called “pathogen recipients” or “control recipients” respectively (Fig. 1). These recipients were previously acclimated or directly dipped (not-acclimated) at 21 °C, 26 °C or 29 °C. Their survival was followed for 14 d and the infectivity of OsHV-1 was evaluated (experiment 1 A). Next, the recipients were all placed at 21 °C, and new SPF oysters were added to the tanks in order to evaluate the potential for virus reactivation and transmission (experiment 1 B). Finally, recipients were transferred to a farming area where OsHV-1 induced mortalities were occurring to evaluate the long-term susceptibility to the disease (experiment 1 C). Concomitantly, a second experiment (experiment 2) evaluated the effect of temperature on the OsHV-1 suspension *per se*. The viral suspension and synthetic seawater (control) were incubated at 21 °C, 26 °C and 29 °C prior injection in oysters at 21 °C. Survival of recipients cohabited with injected oysters was followed for 14 d.

2. Experimental procedures

2.1. Animals and maintenance

Two cohorts of specific-pathogen-free (SPF) oysters were produced under controlled conditions [20,21]. Briefly, wild oysters were collected in Fouras (Marennes-Oleron, France; 46° 00' 43.2' N, 1° 07' 02.9' W) in August 2015 and were transferred to the Ifremer facilities in Argenton (Brittany, France; 48°34'30"N, 4°36'18" W) for conditioning. These animals were held in 500 L flow through tanks with seawater kept at a constant temperature of 17 °C that was enriched with a phytoplankton mixture. Seawater was UV treated and filtered through 1 µm mesh. Fertilization was performed by stripping the gonads from 100 individuals (1/3 males, 2/3 females) on 23 August 2015 (cohort 1) and 23 February 2016 (cohort 2). The fertilization rate was up to 90%. The embryos developed in 150 L tanks at 21 °C for 48 h, and D-larvae were transferred to flow-through rearing systems at 25 °C. After 13 days, competent larvae were collected and allowed to settle in downwellers. On 1st October 2015 and 1st April 2016, oysters were transferred to Ifremer facilities in Bouin for nursery where seawater was UV treated and filtered through 1 µm mesh (Vendée, France, 46°57'15.5"N 2°02'40.9"W).

The two cohorts of SPF oysters were moved back to Argenton on 28 April 2016 and split into five 500 L tanks at 21 °C prior to starting the experiments in open flow systems. At this time, oysters from the first

cohort were 8 months old, with a mean weight of 1.48 g. Oysters from the second cohort were 2 ½ months old with a mean weight of 0.80 g. The oysters were screened for the herpesvirus by qPCR at all the different production steps it was always undetected [22]. They were fed with a mixture of *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3) and *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) (1:1 in dry weight). Food concentration was set at 1500 µm³ µl⁻¹ of microalgae at the outlet pipe of the tank so that oysters were fed *ad libitum* [23]. Temperature, salinity, pH and oxygen were controlled daily with the WTW probes xi3101, cond340, pH3310 and FDO 925, respectively.

Oysters from the first cohort were either injected with a suspension of OsHV-1 (pathogen donors) or synthetic seawater (controls), or they were not injected and used as recipients in both experiments 1 and 2. Oysters from the second cohort served as new recipients in experiment 1 B.

2.2. Experimental design

2.2.1. Acclimation of oysters

On 9 May 2016, oysters for injection (N = 3000 individuals) were either left at 21 °C (control temperature), or gradually increased to 26 °C and 29 °C at 2 °C day⁻¹ in three 500 L tanks (one for each temperature, Fig. S1). At the same time, some of the recipient oysters (N = 3600 individuals) were transferred to the experimental room, distributed into twenty-five 45 L tanks and either left at 21 °C or gradually increased to 26 °C or 29 °C (15 tanks were set at 21 °C, 5 tanks at 26 °C and 5 tanks at 29 °C, see Table 1). The remaining recipients were left undisturbed in 500 L tank at 21 °C and later served as non-acclimated recipients. Acclimation lasted for 11 days up until 19 May.

Each tank was equipped with a thermostat and heating resistor (Biotherm Ecco Hobby and SCHEIGO Titane 300 W, Europrix, France) to maintain the seawater at the desired temperature (Fig. S2). Three tanks (one for each temperature) were equipped with a high-frequency temperature data logger (iButton DS1922L) with 0.1 °C resolution and a final accuracy of ± 0.3 °C. A light bubbling and a circulation pump (AquaPower 200 superfish 200 L h⁻¹, Europrix, France) were added in each 45 L tanks to maintain > 90% oxygen saturation and seawater homogenization. Seawater salinity was 35‰. The oyster filtration rate was measured daily in each tank as reported in Ref. [23] (Fig. S3). The water flow was set at 70 L h⁻¹ in the 500 L tanks and 12 L h⁻¹ in the 45 L tank. Throughout this time, there was no oyster mortality.

2.3. Infection

On 19 May 2016, oysters for injection were myorelaxed in MgCl₂ solution at their respective acclimation temperature until valve opening [24]. Pathogen donors were injected with 100 µl of viral suspension containing 6.9 × 10⁶ copies of OsHV-1 µVar in the adductor muscle, while controls were injected with the same volume of sterile synthetic seawater. Donors and controls were further incubated for 5 h at their respective acclimation temperature.

The viral suspension was obtained from 10 infected oysters. The gills and mantle of these oysters were placed in a sterile 50 mL tube containing 10 vol of artificial seawater (ASW, 9 mL g⁻¹ tissue). Tissues were ground on ice using an Ultraturax (3 × 5 s) mixer. After centrifugation (1000 g, 5 min, 4 °C), the supernatant was transferred to a new tube and diluted in 4 vol of ASW. The homogenate was filtered under sterile conditions using syringe filters at pore sizes of 5 µm, 2 µm, 0.45 µm and 0.22 µm (Millipore, Billerica, USA).

2.4. Effect of high temperatures on OsHV-1 transmission, infection, and mortality of oysters (experiment 1-part A)

Injected oysters (pathogen donors and controls) were transferred into the 45 L tanks to cohabit with the recipients acclimated and maintained at 21 °C, 26 °C and 29 °C. Donors were distributed in

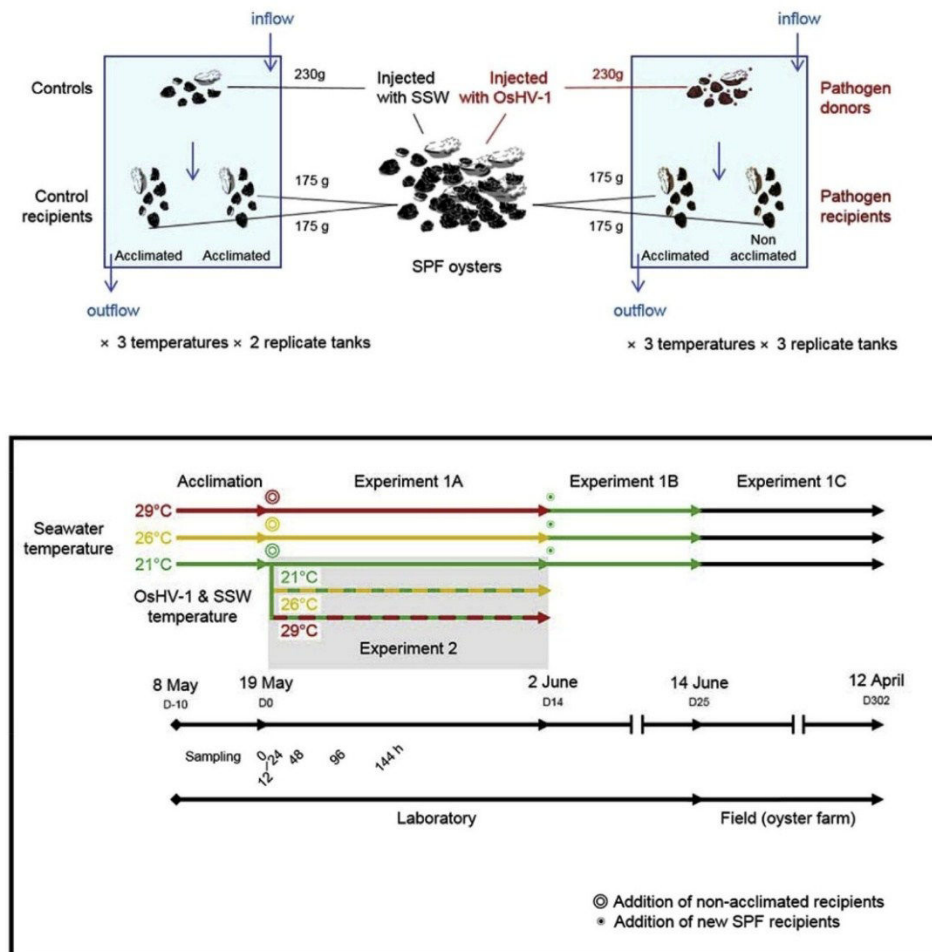


Fig. 1. Experimental design to investigate the effect of temperature on disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1. Abbreviations: OsHV-1, Ostreid herpesvirus type 1; SPF, specific-pathogen free oyster; SSW, synthetic seawater.

triplicate tanks while controls were in duplicates for each temperature (Table 1). At the same time, the non-acclimated recipients left at 21 °C were added to the tanks that contained pathogen donors or controls, and the volume of water was reduced to 30 L and left stagnant for 12 h. Dead donors were removed 24 h post-injection (hpi) and all the donors were removed 72 hpi. The biomass of controls and pathogen donors was 230 g while that of recipients was 350 g (Fig. 1).

Survival of acclimated and non-acclimated recipients was monitored for 14 days. Thirty living recipients (both acclimated and non-acclimated, 15 individuals for each group) were sampled in each tank at 0, 12, 24, 48 and 96 h post-cohabitation (hpc). Whole tissues of 9 recipients out of 15 were removed from the shells, pooled together, flash frozen and stored in liquid nitrogen. Then, oyster tissues were crushed in liquid nitrogen with a MM400 homogenizer (Retsch, Eragny, France) and divided for OsHV-1 DNA and viral gene expression.

2.5. Effect of previous temperature treatments on survival of recipients at 21 °C (experiment 1-part B)

On 2 June 2016, the temperature of all recipient tanks was set at 21 °C and new SPF oysters were added. Recipient and new SPF survival was monitored for 11 days up until 13 June.

2.6. Effect of previous temperature treatments on susceptibility of oysters to a second infection in a farming area (experiment 1-part C)

On 13 June 2016, the recipients surviving the experiment 1 A and B were transferred into the Bay of Brest at Pointe du Chateau in (48° 20' 06.19" N, 4° 19' 06.37" W) where mass mortalities of oysters caused by OsHV-1 were occurring [25], and their survival was followed for 302 days.

2.7. Effect of incubation temperature on the OsHV-1 suspension (experiment 2)

On 19 May 2016, the viral suspension and the synthetic seawater were incubated at 21 °C, 26 °C and 29 °C for 5 h before injecting 100 µl into the adductor muscle of both pathogen donors and controls kept at 21 °C. Virus suspension remain infectious for 48 h in seawater at 20 °C but infectivity decreases after 24 h [26]. These injected animals remained for 5 h in six separate tanks (one for each combination of injection type and incubation temperature). Injected oysters (pathogen donors and controls) were transferred to the 45 L tanks to cohabit with the recipients acclimated at 21 °C. Donors were distributed in triplicate tanks while controls were in duplicates for each temperature (Table 1). The volume of water was reduced to 30 L and left stagnant for 12 h.

Table 1

List of all treatment combinations used in experiments 1 A, 1 B and 2 in the laboratory. Abbreviations: SSW, synthetic seawater; A, acclimated; NA, non-acclimated.

Seawater temperature	Injection	Injection temperature	Replicate	Tank	Acclimation	Experiment	
21 °C	SSW	21 °C	1	1	A	1–2	
			2	2	A	1–2	
		26 °C	1	3	A	2	
			2	4	A	2	
		29 °C	1	5	A	2	
			2	6	A	2	
	OsHV-1	21 °C	1	7	A-NA	1–2	
			2	8	A-NA	1–2	
			3	9	A-NA	1–2	
		26 °C	1	10	A	2	
			2	11	A	2	
			3	12	A	2	
		29 °C	1	13	A	2	
			2	14	A	2	
			3	15	A	2	
26 °C	SSW	21 °C	1	16	A	1	
			2	17	A	1	
	OsHV-1	21 °C	1	18	A-NA	1	
			2	19	A-NA	1	
			3	20	A-NA	1	
	29 °C	SSW	21 °C	1	21	A	1
				2	22	A	1
		OsHV-1	21 °C	1	23	A-NA	1
				2	24	A-NA	1
3				25	A-NA	1	

Dead donors were removed 24 hpi and all the donors were removed 72 hpi. The biomass of controls and pathogen donors was 230 g while that of recipients was 350 g (Fig. 1). Controls and pathogen donors at 21 °C were common to experiments 1 and 2 (Table 1).

2.7.1. OsHV-1 DNA quantification

Level of OsHV-1 DNA was quantified in both control and pathogen recipients, acclimated or non-acclimated, sampled at 0, 12, 24, 48 and 96 hpc in experiments 1 A and 2. These analyses were conducted by the Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Herault (Montpellier, France) using oyster powder homogenized in sterile artificial seawater [27]. Total DNA was then extracted with a QIAamp tissue mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The extract was stored at –20 °C before detection and quantification according to a real-time PCR protocol based on SYBR Green chemistry [27] with specific primers validated by Ref. [28]. The results were expressed as the log of OsHV-1 DNA copies per mg of wet tissue.

2.7.2. Viral gene expression

Viral gene expression was quantified in acclimated pathogen recipients sampled at 24 and 48 hpc in experiments 1 A and 2.

2.8. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using Extrac-all (Eurobio, Courtaboeuf, France) at a concentration of 1.5 mL 30 mg⁻¹ powder, and treated with DNase I (Sigma, 1 U µg⁻¹ total RNA). Samples were then treated with DNase (DNase Max™ Kit, MO BIO laboratories, Inc) using (1 U µg⁻¹ total RNA) to remove genomic DNA. Quality of RNA and quantity were determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). First strand cDNA synthesis was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) with 1 µg of RNA [29]. A no reverse transcription was

performed after each DNase treatment using real time PCR to control for the absence of oyster and virus genomic DNA.

2.9. Real time PCRs and relative expression

Six viral genes (ORFs 27, 38, 41, 67, 87 and 99) were selected among the 39 ORFs described by Ref. [30]. These ORFs encoded for different protein functions and expressed differently during an OsHV-1 replication cycle [30].

The real-time PCR assay was performed in triplicate with 5 µl cDNA (1/10 dilution) in a total volume of 10 µL. The concentrations of the reaction components were as follows: 10 µM of each primer, 1.5 µl H₂O, 7.5 µl of iQ™ SYBR Green Supermix (BIO-RAD). Real time PCR cycling conditions were as follows: activation at 95 °C for 5min followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min at 60 °C, and a melting curve program from 95 to 70 °C by decreasing the temperature by 0.5 °C every 10s. Each run included a positive cDNA control (a pool of the 30 cDNA samples of the present experiment analyzed in each amplification plate) and in all cases negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination. The elongation factor-1 (EF) from *C. gigas* was chosen to normalize the viral gene expression. PCR efficiency (E) was determined by drawing standard curves from a serial dilution analysis of the pool of cDNA to ensure that E ranged from 99% to 108% for each primer pair.

The calculation of the relative mRNA levels was based on a comparative Ct method [31]. No differences between Ct values were observed for EF among temperatures and between injection types and times. Therefore, the relative quantification value of the samples was normalized with EF and relative to the positive control, and was expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = [Ct(cDNA\ sample) - Ct(positive\ cDNA\ control)]$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ of\ cDNA - \Delta Ct\ of\ EF$.

Standard curves were performed for each primer pair using serial dilutions of total DNA, with PCR efficacy ($E = 10^{(-1/slope)}$) being

subsequently calculated thanks to these curves [32].

2.9.1. Statistical analysis

Survival functions were computed according to [33]. Survival time was measured in hours (experiments 1 A and 2) or days (experiment 1 C) from the onset of each experiment phase. The data were read as the number of dead oysters within each tank at each count. Survival time curves of recipients were compared using the Cox model (1972) after adjusting for temperature effect (21 °C, 26 °C, 29 °C, experiments 1 A, 1 C and 2), acclimation (acclimated vs non acclimated, experiment 1 A) or injection (OsHV-1 vs SSW, experiments 1 C). In experiment 1 A, the survival of control recipients was not included in the statistical model because it was 100%. The proportionality of hazards (PH) was checked with Martingale residuals [34]. Because the PH assumption was violated, time dependent covariates representing the interaction of the original covariates and times were added to the model. Time (t) was defined as dichotomous: $t \leq 120$ h or $t > 120$ h. Custom hazard ratios were produced by means of contrasts.

Mixed-design ANOVAs were performed to assess differences in (i) OsHV-1 DNA in pathogen recipients (experiments 1 A and 2), depending on temperature (3 levels, main plot), acclimation (2 levels, subplot) and time (4 levels, sub-subplot) and (ii) the viral gene expression in acclimated pathogen recipients (experiments 1 A and 2), depending on temperature (3 levels, main plot) and time (2 levels subplot). The replication unit was the tank in which the temperature and infection treatments were applied. All mutual interactions among factors were tested, and Tukey's HSD was used as a *post hoc* test. The normality of residuals and homogeneity of variances were graphically checked, and the data were $\log(x+1)$ transformed where necessary. Statistical analyses were performed in SAS 9.4 software (SAS institute).

3. Results

3.1. Effect of high temperatures on OsHV-1 transmission, infection, and survival of oysters (experiment 1 A)

The oysters injected with OsHV-1 suspension (pathogen donors) showed significant mortalities 48 hpi at the three tested temperatures (Fig. S1). Their final survival at 72 hpi was ranked as 29 °C ($72 \pm 2.1\%$) > 26 °C ($62 \pm 2.1\%$) > 21 °C ($46 \pm 2.6\%$).

The survival of control recipients (oysters living in cohobitation with SSW injected oysters) was $100 \pm 0\%$ irrespective of temperature and acclimation treatments (data not shown), but low levels of OsHV-1 DNA were occasionally detected in these animals ($< 10^3$ cp mg^{-1} wet tissue, Table S1). Although control recipients were no longer considered SPF, absence of mortality suggest that they were healthy, and only the pathogen recipients were considered hereafter.

At the end of the cohobitation trial, the survival of pathogen recipients acclimated at 29 °C was higher ($85.7 \pm 2.0\%$) than at 21 °C and 26 °C, where survival rates were $52.4 \pm 3.1\%$ and $43.9 \pm 3.1\%$ respectively (Fig. 2A). Survival of non-acclimated pathogen recipients was 5–9% lower than that of their acclimated counterparts irrespective of temperature. Mortality started 72 h post-cohabitation (hpc) at 26 °C and 120 hpc at 21 °C (Fig. 2A). Overall, mortality risk was lowest at 29 °C (Table S2).

At the onset of the experiment, OsHV-1 DNA was not detected in SPF oysters. Between 0 and 24 hpc, the level of OsHV-1 DNA in pathogen recipients increased above 10^4 cp. mg^{-1} irrespective of temperatures, but rates of increase were the highest at 26 °C and 29 °C (Fig. 2B, Table S3). Between 24 and 48 hpc, the level of OsHV-1 DNA continued to increase at 21 °C, remained high at 26 °C, and initiated a decrease at 29 °C. Therefore, at 48 hpc, the level of OsHV-1 DNA ranked as 26 °C = 21 °C > 29 °C. Finally, between 48 and 96 hpc, OsHV-1 DNA decreased at 26 °C and 29 °C while it remained stable at 21 °C. Therefore, at 96 hpc, OsHV-1 DNA ranked as 21 °C > 26 °C = 29 °C. Interestingly, maximum values of OsHV-1 DNA were similar among

temperatures (1.9×10^6 cp. mg^{-1} at 21 °C 48 hpc; 3.4×10^6 cp. mg^{-1} at 26 °C 24 hpc and at 29 °C, 4.0×10^5 cp. mg^{-1} 24 hpc) but these maximum values were observed for longer at 26 °C and 21 °C than at 29 °C.

The six viral Open Reading Frames (ORFs) selected in our study were expressed in pathogen recipients at the three tested temperatures. Three of them were modulated by temperature (ORFs 27, 38 and 87). Gene expression levels were highest at 26 °C, except ORF 87 at 48 hpc, which exhibited the highest values at 21 °C. At 29 °C, viral gene expressions of these three ORFs were lower than at 26 °C and 21 °C. Viral gene expression of the other ORFs (41, 67 and 99) increased between 24 and 48 hpc (Fig. 2C and D).

3.2. Effect of previous temperature treatments on recipient survival at 21 °C (experiment 1 B)

The survival of both control and pathogen recipients placed at 21 °C for 11 days was $100 \pm 0\%$ irrespective of previous temperature treatments (data not shown). Moreover, the new SPF oysters placed in cohobitation with them showed no mortality.

3.3. Effect of previous temperature treatments on oyster susceptibility to a second infection in a farming area (experiment 1 C)

Both pathogen and controls recipients transferred to a farming area where OsHV-1 occurred showed high mortalities. However, the survival of pathogen recipients was higher ($75.9 \pm 5.3\%$) than that of control recipients ($44.9 \pm 9.9\%$, Fig. 3, Table S4). There was no effect of previous temperature treatments on the survival of control recipients. In contrast, the survival of the pathogen recipients infected at 29 °C was lower ($67.9 \pm 10.8\%$) than those infected at 21 °C and 26 °C, where survival was $79.3 \pm 3.7\%$ and $80.6 \pm 5.5\%$ respectively. Throughout the whole experiment 1, the survival of the pathogen recipients previously exposed to donors at 29 °C remained higher (56.6%) than at 21 °C and 26 °C, where survival was 41.9% and 32.0% respectively.

3.4. Effect of incubation temperature on the OsHV-1 suspension (experiment 2)

As observed in experiment 1, the survival of control recipients was $100 \pm 0\%$ but low levels of OsHV-1 DNA were occasionally detected ($< 10^2$ cp mg^{-1} wet tissue, Table S1). However, given the absence of mortality and temperature effect on control recipients, only the pathogen recipients were considered hereafter.

Pathogen recipients showed significant mortalities after 72 hpc (Fig. 4A, Table S5). At the end of experiment 2, the survival of pathogen recipients ranked as a function of incubation temperature of the viral suspension: 26 °C ($46 \pm 3\%$) < 21 °C = 29 °C ($52 \pm 2\%$). The level of OsHV-1 DNA and viral gene expression in pathogen recipients increased during the experiment but were not influenced by the incubation temperature of the viral suspension (Fig. 4B and C).

4. Discussion

The major result of this study is that the survival of recipient oysters exposed to the virus at 29 °C (85.7% survival) was markedly higher than at 21 °C and 26 °C (52.4% and 43.9% respectively), reflecting changes in host susceptibility and/or virus virulence. This concurs with a previous study where recipients cohobated with field-infected donors [16]. These differences in survival persisted when the pathogen recipients were all placed at 21 °C, the optimal temperature for OsHV-1 replication, and when they were re-exposed to OsHV-1 in the field. This result opens new perspectives for mitigation measures using high temperature.

The differences in survival between recipients exposed to OsHV-1 at 21 °C and 29 °C coincided with differences in viral replication in the

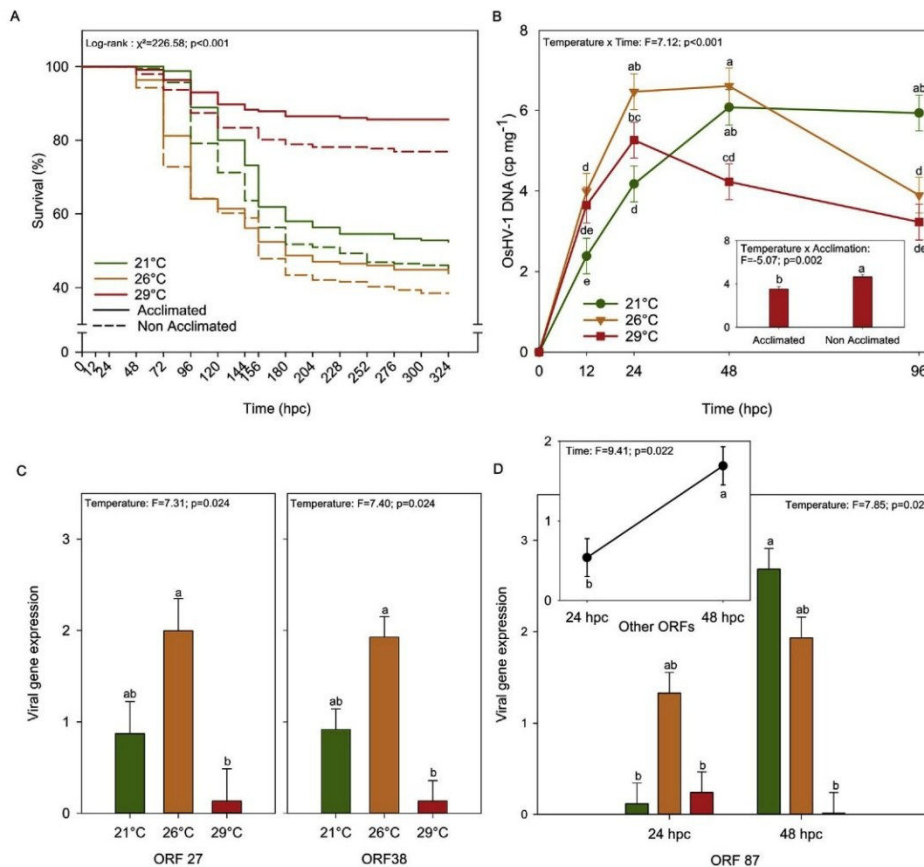


Fig. 2. (A) Survival of oysters (pathogen recipients) having cohoused with donors injected with OsHV-1 at 21 °C, 26 °C and 29 °C with or without prior acclimation. (B) Quantification of OsHV-1 DNA in pathogen recipients as a function of temperature. Data of acclimated and non-acclimated oysters were averaged due to temperature × acclimation × time interaction not being significant. Inset represents the significant interaction of temperature × acclimation. Data were log (x + 1) transformed. (C and D) Viral gene expression expressed as a delta threshold cycle number (Ct) of OsHV-1 open reading frames (ORFs) relative to C. gigas elongation factor in live acclimated pathogen recipients as a function of temperature. Inset represents the main effect of time averaged for the six tested ORFs. The gene expression analyses were conducted only at 24 hpc and 48 hpc. For all analyses, values are means ± SE (n = 3 tanks), and different letters indicate significant differences. Only significant effects are represented.

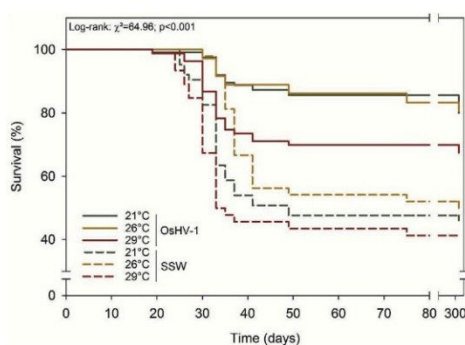


Fig. 3. Survival of pathogen recipient after being transferred to a farming area where OsHV-1 occurred as a function of temperature during the first exposure to OsHV-1 in the laboratory.

host. Although levels of OsHV-1 DNA increased from undetectable amounts to values higher than 10^4 DNA cp mg^{-1} (the threshold at which mortality generally occurs) for both temperatures during the first

24 hpc, it then decreased markedly in recipients at 29 °C whereas it continued to increase at 21 °C. A similar pattern was observed in SPF oysters having cohoused with field infected donors at these two temperatures [16]. In our study, the expression of three viral genes (ORF 27, 38 and 87) involved in regulation of a ring finger motif, DNA repairing and apoptosis inhibition [30] were lower in recipients at 29 °C than at 21 °C. High temperature may reduce the expression of some viral genes that could be essential to the development of the disease and viral cycle. Also, equally high expression levels of ORF 41, 67 and 99 at 21 °C and 29 °C suggest the induction of the OsHV-1 lytic cycle irrespective of temperature [35].

Survival of pathogen donors at 29 °C was higher than at 21 °C, as observed in pathogen recipients. This suggests that high temperature (29 °C) decreased the susceptibility of oysters to OsHV-1. This, however, raises the possibility that viral shedding of pathogen donors at 29 °C was lower than that at 21 °C, which could have contributed to the increased survival of the pathogen recipients at 29 °C.

We also found that these temperatures (21 °C and 29 °C) had no effect on the virus suspension *per se*. Indeed, the survival, level of OsHV-1 DNA and virus gene expression of recipients at 21 °C having cohoused with donors injected with viral suspension incubated were all similar at 21 °C or 29 °C. Therefore, high temperature (29 °C) had no effect on the

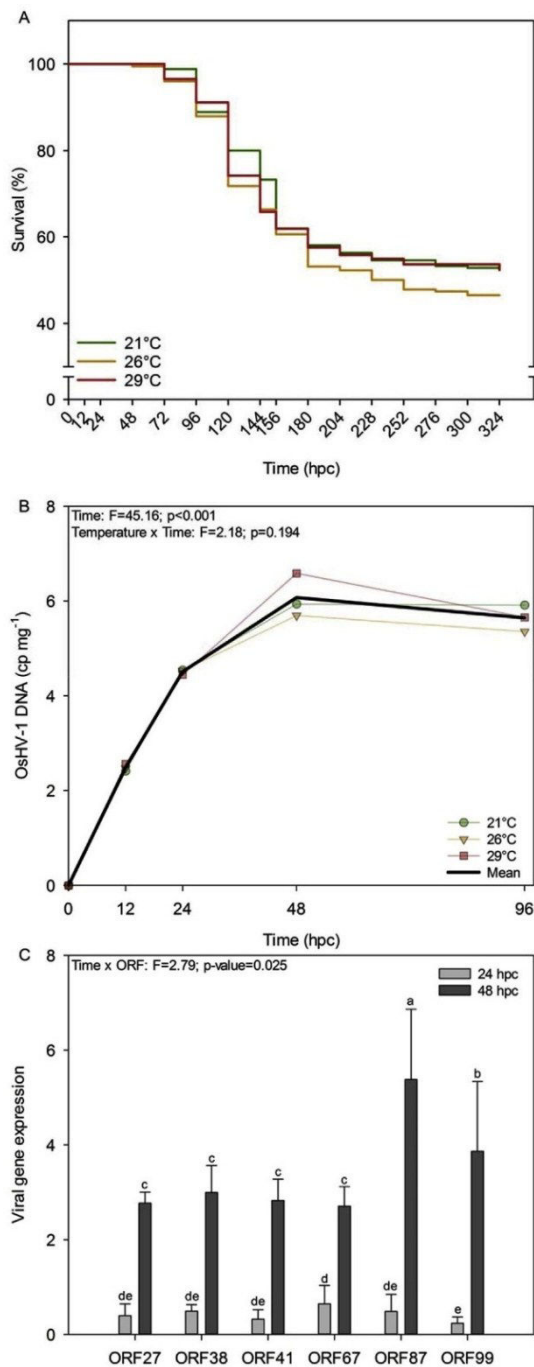


Fig. 4. (A) Survival of oysters (pathogen recipients) having cohobated with donors injected with OsHV-1 incubated at 21 °C, 26 °C and 29 °C for 5 h. (B) Quantification of OsHV-1 DNA in pathogen recipients as a function of incubation temperature of the viral suspension. Data of recipients at 21 °C, 26 °C and 29 °C were averaged because the interaction of temperature × time was not significant (black line). Data were log (x+1) transformed. (C) Viral gene expression expressed as a delta threshold cycle number (Ct) of OsHV-1 open reading frames (ORFs) relative to *C. gigas* elongation factor 1 in live acclimated recipients as a function of time. The gene expression analyses were conducted only at 24 hpc and 48 hpc. For all analyses, values are means ± SE (n = 3 tanks), and different letters indicate significant differences. Only significant effects are represented.

[36]. For instance, the antiviral response of oysters is stimulated at 22 °C compared to 12 °C [37]. High temperatures (32 °C) induce over-expression of heat shock proteins 70 involved in the repression of white spot syndrome virus replication in shrimps [38].

At 26 °C, the mortality of pathogen recipients started earlier than at 21 °C and 29 °C, survival was lowest, levels of OsHV-1 DNA were highest (between 12 and 48 hpc) and the expression of three viral genes was enhanced. Furthermore, the survival of pathogen recipients having cohobated with donors injected with viral suspension incubated at 26 °C was lowest, but levels of OsHV-1 DNA and viral gene expression were similar among temperature treatments. Therefore, it appears that the virulence of OsHV-1 was enhanced at 26 °C, although an increase in susceptibility of the host cannot be ruled out.

In our study, the survival of pathogen recipients at 26 °C is the lowest as reported by Ref. [17]. However, in a previous study, survival of oysters exposed to OsHV-1 at 21 °C was lower than at 26 °C [16]. Discrepancies may reflect different methods of infection among studies. Here, the donors were injected with a viral suspension, whereas in Ref. [16] they were naturally infected by a short exposure to field conditions where OsHV-1 induced mortalities of oysters were occurring. Therefore, their study probably encompasses other microorganisms naturally encountered in the marine environment, including populations of pathogenic vibrios that influence oyster survival [22,39].

When temperature of pathogen recipients decreases from 29 °C to 21 °C, a temperature permissive for OsHV-1 replication, there was neither additional mortality nor disease transmission to the new SPF oysters. Although high temperature increases elimination of several viruses in oysters [40], herpesviruses are generally incurable and complete elimination from the host is unlikely [41]. Our results suggest that OsHV-1 did not reactivate at 21 °C, or at least not sufficiently to induce mortality. However, OsHV-1 can persist in oysters for several months at low temperatures (< 13 °C) and can reactivate and kill the host after a thermal elevation to 21 °C [42].

Recipients showed additional mortalities following the second exposure to OsHV-1 in the field. The survival of pathogen recipients previously infected at 29 °C was lower than those infected at 21 °C and 26 °C, likely reflecting the persistence of a greater number of susceptible hosts at 29 °C.

Throughout the whole experiment, the survival of recipients exposed to pathogen donors at 29 °C was on average 20% higher than at 21 °C and 26 °C. Oysters first infected at 29 °C seemed less susceptible to the virus than those first infected at 21 °C and 26 °C. For the second infection, the oysters were 1 ½ month older and therefore potentially less susceptible to the pathogen [43]. Also, the first exposure to OsHV-1 may have lowered the susceptibility of oysters to a second infection. A non-lethal exposure to a pathogen can enhance invertebrate immunity by immune priming [44,45]. Immune priming against OsHV-1 has already been reported for oysters injected with a synthetic viral analogue [46].

Oysters exposed to the virus at 29 °C were less susceptible to OsHV-1 than at 21 °C and 26 °C over the long term, thus opening new perspectives for mitigation measures. Hyperthermia was already suggested as preventive method in shrimp farming to minimize the risk of a viral

infectivity (a measure of the ability of a disease agent to establish itself in the host) or the virulence (a measure of the severity of a disease) of OsHV-1.

Therefore, high temperature (29 °C) decreased the susceptibility of oysters to OsHV-1 without altering virus infectivity and virulence; however, the underlying mechanism remains unknown. Temperature impacts all aspects of ectotherm physiology, including their immunity

outbreak [47]. Regarding the potential of high temperature treatment to mitigate disease risk in oyster farms, several questions need to be answered. What is the sanitary status of the oysters exposed to OsHV-1 at high temperature (OsHV-1-free or asymptomatic carrier)? What is the optimal treatment duration and temperature to optimize survival and minimize energy costs? How is it possible to practically implement a high temperature treatment on a production farm? Finally, what are the economic efficiency (i.e. the cost of disease control measures compared to ensuing benefits) and acceptability (the willingness of organizations to put into action disease control measures) of high temperature treatment?

Acknowledgements

We thank the Ifremer staff involved in oyster and algae production at Argenton and Bouin. We are grateful to Mathias Hubert for helping with the experimental set-up and to Melaine Gourault, Valérian Le Roy, Margaux Mathieu-Resuge, Isabelle Quéau and Claudie Quéré for their help with sampling. We also thank Maelenn Le Roy for helping with the RNA analyses, Amélie Segarra for discussions, and Amélia Curd for her help with English editing. This work was supported by the EU funded project VIVALDI (H2020 program, n°678589) and the TEMPO project funded by the French Ministry of Environment, Energy and Sea (Convention DPMA 2016 16/1212569).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.056>.

References

- C.A. Burge, C. Mark Eakin, C.S. Friedman, B. Froelich, P.K. Hershberger, E.E. Hofmann, L.E. Petes, K.C. Prager, E. Weil, B.L. Willis, S.E. Ford, C.D. Harvell, Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society, *Ann. Rev. Mar. Sci.* 6 (2014) 249–277, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>.
- C. Harvell, C. Mitchell, J. Ward, S. Altizer, A.P. Dobson, R.S. Ostfeld, M.D. Samuel, Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota, *Science* 296 (2002) 2158–2163, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063699>.
- O.M. Vidal, C.B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brock, M. Salazar, A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus, *J. World Aquacult. Soc.* 32 (2001) 364–372, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00462.x>.
- A. Staehli, R. Schaerer, K. Hoelzle, G. Ribi, Temperature induced disease in the starfish *Astropecten jonstoni*, *Mar. Biodivers. Rec* 2 (2009) 10–14, <http://dx.doi.org/10.1017/S1755267209000633>.
- W.T. Kohl, T.I. McClure, B.G. Miner, Decreased temperature facilitates short-term sea star wasting disease survival in the keystone intertidal sea star *Pisaster ochraceus*, *PLoS One* 11 (2016) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153670>.
- M.A. Travers, O. Basuyaux, N. Le Goïc, S. Huchette, J.L. Nicolas, M. Koken, C. Paillard, Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by Vibrio harveyi: an example of emerging vibriosis linked to global warming, *Global Change Biol.* 15 (2009) 1365–1376, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x>.
- C.B. Granja, L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragon, M. Salazar, Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*? *Dis. Aquat. Org.* 54 (2003) 73–78, <http://dx.doi.org/10.3354/dao054073>.
- C.B. Granja, O.M. Vidal, G. Parra, M. Salazar, Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaes vannamei*, *Dis. Aquat. Org.* 68 (2006) 175–180, <http://dx.doi.org/10.3354/dao068175>.
- S. Corbeil, L.M. Williams, J. Bergfeld, M.S.J. Crane, Abalone herpes virus stability in sea water and susceptibility to chemical disinfectants, *Aquaculture* 326–329 (2012) 20–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.031>.
- V. Barbosa Solomieu, T. Renault, M.A. Travers, Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *J. Invertebr. Pathol.* 131 (2015) 2–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>.
- EFSA, Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Eur. Food Saf. Auth. J.* 8 (2010) 1–60, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1894>.
- F. Pernet, C. Lupo, C. Bacher, R.J. Whittington, Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371 (2016) 20150213, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0213>.
- F.J. Jenkins C, P. Hick, M. Gabor, Z. Spiers, S.A. Fell, X. Gu, A. Read, J. Go, M. Dove, W. O'Connor, P.D. Kirkland, Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia, *Dis. Aquat. Org.* 105 (2013) 109–126, <http://dx.doi.org/10.3354/dao02623>.
- F. Pernet, J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Dégremont, F. Lagarde, J.F. Pépin, N. Keck, Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France, *Aquac. Environ. Interact* 2 (2012) 215–237, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00041>.
- T. Renault, L. Bouquet, J. Maurice, C. Lupo, Ostreid herpesvirus 1 infection among pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 5419–5426, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00484-14>.
- B. Petton, F. Pernet, R. Robert, P. Boudry, Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas*, *Aquac. Environ. Interact* 3 (2013) 257–273, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00070>.
- M. de Kantzow, P. Hick, J. Becker, R. Whittington, Effect of water temperature on mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with microvariant ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 μ Var), *Aquac. Environ. Interact* 8 (2016) 419–428, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00186>.
- C. Martenot, L. Denechère, P. Hubert, L. Metayer, E. Oden, S. Trancart, E. Travaillé, M. Houssin, Virulence of Ostreid herpesvirus 1 μ Var in sea water at 16°C and 25°C, *Aquaculture* 439 (2015) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.012>.
- S. Bougrier, P. Geairon, J.M. Deslous-Paoli, C. Bather, G. Jonquères, Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Aquaculture* 134 (1995) 143–154, [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00036-2](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)00036-2).
- B. Petton, P. Boudry, M. Alunno-Bruscia, F. Pernet, Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, *Aquac. Environ. Interact* 6 (2015) 205–222, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00125>.
- F. Le Roux, K.M. Wegner, M.F. Polz, Oysters and vibrios as a model for disease dynamics in wild animals, *Trends Microbiol.* 24 (2016) 568–580, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.006>.
- B. Petton, M. Bruto, A. James, Y. Labreuche, M. Alunno-Bruscia, F. Le Roux, *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–10, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686>.
- M. Fuhrmann, B. Petton, V. Quillien, N. Faury, B. Morga, F. Pernet, Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), *Aquac. Environ. Interact* 8 (2016) 543–552, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00197>.
- M. Suquet, G. De Kermoisan, R.G. Araya, I. Queau, L. Lebrun, P. Le Souchu, C. Mingant, Anesthesia in pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Aquat. Living Resour.* 22 (2009) 29–34, <http://dx.doi.org/10.1051/alr/2009006>.
- E. Fleury, J. Normand, A. Lamoureux, J.-F. Bouget, C. Lupo, N. Cochenec-Laureau, S. Petton, B. Petton, Pouvreau Stephane, National monitoring network of mortality and growth rates of the sentinel oyster *Crassostrea gigas*, *Seaoac* (2018), <http://dx.doi.org/10.17882/53007>.
- P. Hick, O. Evans, R. Looi, C. English, R.J. Whittington, Stability of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) and assessment of disinfection of seawater and oyster tissues using a bioassay, *Aquaculture* 450 (2016) 412–421, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.025>.
- J.F. Pepin, A. Riou, T. Renault, Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR, *J. Virol. Methods* 149 (2008) 269–276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.022>.
- S.C. Webb, A. Fidler, T. Renault, Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs, *Aquaculture* 272 (2007) 126–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.224>.
- A. Huvet, J. Daniel, C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A. Van Wormhoudt, D. Sello, J.F. Samain, J. Moal, Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations, *Aquaculture* 228 (2003) 321–333, [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00323-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00323-5).
- A. Segarra, N. Faury, J. Pépin, T. Renault, Transcriptional study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection, *J. Invertebr. Pathol.* 119 (2014) 5–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.002>.
- K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods* 25 (2001) 402–408, <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- R. Rasmussen, Quantification on the LightCycler, *Rapid Cycle Real-time PCR*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001.
- E.L. Kaplan, P. Meier, Nonparametric estimation from incomplete observations, *Am. Stat. Assoc.* 53 (1958) 457–481, <http://dx.doi.org/10.2307/2281868>.
- D.Y. Lin, L.J. Wei, Z. Ying, Checking the Cox model with cumulative sums of martingale-based residuals, *Biometrika* 80 (1993) 557–572, <http://dx.doi.org/10.1093/biomet/80.3.557>.
- A. Segarra, Etude des interactions hôte/virus chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et son virus Ostreid herpesvirus 1, PhD dissertation Université de Bretagne Sud, 2015 262pp.
- P.W. Hochachka, G. Somero, *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, Oxford Uni., 2002.
- T.J. Green, C. Montagnani, K. Benkendorf, N. Robinson, P. Speck, Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish Shellfish Immunol.* 36 (2014) 151–157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.026>.
- Y.R. Lin, H.C. Hung, J.H. Leu, H.C. Wang, G.H. Kou, C.F. Lo, The role of aldehyde dehydrogenase and Hsp70 in suppression of white spot syndrome virus replication at high temperature, *J. Virol.* 85 (2011) 3517–3525, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01973-10>.
- A. Lemire, D. Goudenège, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche, F. Le

- Roux, Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters, *ISME J.* 9 (2015) 1523–1531, <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.233>.
- [40] C. Choi, D.H. Kingsley, Temperature-dependent persistence of human norovirus within oysters (*Crassostrea virginica*), *Food Environ. Virol.* 8 (2016) 141–147, <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9234-8>.
- [41] M.A. Jarvis, J.A. Nelson, Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages, *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (2002) 403–407 [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00334-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00334-X).
- [42] F. Pernet, D. Tamayo, B. Petton, Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1, *Aquaculture* 445 (2015) 57–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.010>.
- [43] L. Dégremont, P. Boudry, M. Ropert, J.F. Samain, E. Bédier, P. Soletchnik, Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Aquaculture* 299 (2010) 44–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.009>.
- [44] T.J. Little, A.R. Kraaijeveld, Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates, *Trends Ecol. Evol.* 19 (2004) 58–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011>.
- [45] B. Milutinović, J. Kurtz, Immune memory in invertebrates, *Semin. Immunol.* 28 (2016) 328–342, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004>.
- [46] T.J. Green, C. Montagnani, Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var), *Fish Shellfish Immunol.* 35 (2013) 382–388, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051>.
- [47] M.M. Rahman, C.M. Escobedo-bonilla, M. Corteel, J.J. Dantas-lima, Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 261 (2006) 842–849, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.007>.

- *Conclusion de l'article 1*

Ainsi, cette étude montre que la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C (85.7%) est plus élevée qu'à 21°C (52.4%) et 26°C (43.9%). Les hautes températures semblent réduire la sensibilité des huîtres sans altérer l'infectivité du virus qui paraît cependant par contre accrue à 26°C. Aucune réactivation ou transmission virale n'a été observée lorsque que les receveurs ont été placés à 21°C. Des mortalités supplémentaires ont été observées lors du transfert des huîtres receveuses sur le terrain (exposition à une maladie poly-microbienne), mais la survie globale des huîtres infectées à 29°C reste supérieure par rapport aux autres températures.

La diminution de la sensibilité des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C ouvre de nombreuses perspectives pour travailler sur le développement d'une méthode pratique pour réduire les mortalités d'huîtres creuses, mais de nombreuses questions restent en suspens. Il semble en effet crucial de vérifier le statut sanitaire des huîtres ayant survécu à OsHV-1 à hautes températures sur le long terme. Avant tout, avant d'imaginer des méthodes de réduction des mortalités, il est essentiel de comprendre les mécanismes sous-jacents à la réduction de sensibilité des huîtres à OsHV-1 par les hautes températures.

Chapitre 2 : Mécanismes
moléculaires impliqués dans
la réduction des mortalités
d'huîtres creuses causées par
OsHV-1 à 29°C.

- *Présentation de l'article 2 (in prep)*

Le travail présenté dans le chapitre précédent montre que le maintien des huîtres à 29°C pendant leur infection par OsHV-1 augmente significativement leur survie sans altérer ni l'infectivité du virus ni sa virulence. Après 14 jours, les huîtres infectées maintenues à 29°C présentaient une survie de 85,7%, tandis que les témoins d'infection maintenus à 21°C affichaient une survie de 52,4%. Aux deux températures, l'ADN et l'ARN d'OsHV-1 ont été détectés. Cependant la réplication virale d'OsHV-1 et le taux d'ADN viral ont été réduits significativement chez des huîtres maintenues à 29°C (Delisle et al., 2018b).

On sait que la température module profondément la physiologie des organismes marins en régulant la vitesse des réactions chimiques et enzymatiques, les vitesses de diffusion, la fluidité membranaire et la structure des protéines (Hochachka et Somero, 2002). Des études antérieures ont montré que le stress thermique induisait l'expression de gènes liés au système immunitaire chez les huîtres (Green et al., 2014; Zhang et al., 2015), cependant, son effet sur la capacité de réponse de l'huître aux agents pathogènes reste flou.

Le travail présenté dans ce second article vise à étudier les mécanismes physiologiques responsables de l'augmentation de la survie et de la réduction de la réplication virale à 29°C. Pour ce faire, à partir des échantillonnages réalisés dans l'expérience 1A (décrits dans le chapitre précédent), nous avons analysé les transcriptomes des huîtres infectées à 29°C et à 21°C dès les premières heures de cohabitation. Quatre temps d'analyses ont été choisis : 0, 12, 24 et 48 heures post-cohabitation afin d'étudier la réponse immédiate de l'hôte à l'infection et d'identifier les mécanismes biologiques différenciant les animaux infectés à 29°C de ceux infectés à 21°C. Des analyses lipidiques et biochimiques complémentaires ont été réalisées afin d'évaluer la modulation thermique de la composition des membranes, des réserves énergétiques et de l'activité de quelques enzymes, pour tenter de définir leur potentielle implication dans l'amélioration de la survie des huîtres.

High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinders progress of Ostreid herpes virus (OsHV-1) and promotes survival.

Lizenn Delisle^{1*}, Marianna Pauletto², Bruno Petton¹, Luca Bargelloni², Fabrice Pernet¹,
Elodie Fleury¹ and Charlotte Corporeau¹.

¹ Ifremer, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), 29280 Plouzané, France.

² Department of Comparative Biomedicine and Food Science. University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy.

* **Corresponding author:** Charlotte Corporeau, Centre Ifremer de Bretagne, CS 10070, 29280 Plouzané, France. Tél: +33 2 98 22 43 86. Fax: + 33 2 98 22 46 53. E-mail: Charlotte.Corporeau@ifremer.fr

Background

Mortality outbreaks in Pacific oyster *Crassostrea gigas* associated with infection by viral and bacterial pathogens have increased during the last 10 years worldwide (Barbosa Solomieu et al., 2015; EFSA, 2010; Pernet et al., 2016). The most striking example is the massive mortality of less than one-year old individuals, which can decimate up to 100% of the farmed oysters during the warm season. These mortalities coincided with the recurrent detection of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) variants (Jenkins et al., 2013; Lynch et al., 2012; Mortensen et al., 2016; Segarra et al., 2010). The virus creates an immune-compromised state of oysters evolving towards subsequent bacteremia by opportunistic bacterial pathogens leading to oyster death (de Lorgeril et al., 2018). Concomitantly, like other herpesviruses, OsHV-1 uses the host cell machinery to replicate (Jouaux et al., 2013; Renault and Novoa, 2004; Segarra et al., 2014b) and alter its metabolism (Corporeau et al., 2014; Pernet et al., 2018, 2014b; Tamayo et al., 2014; Young et al., 2017).

Seawater temperature is a major trigger of marine disease by influencing the host and the pathogen (Burge et al., 2014; Harvell et al., 2002). Temperature modulate physiology of the host by altering velocity of chemical and enzymatic reactions, rates of diffusion, membrane fluidity and protein structure (Hochachka and Somero, 2002; Pernet et al., 2007). Previous

studies showed that thermal stress induces the expression of important immune-related genes in oysters, possibly affecting host response to OsHV-1 (Green et al., 2014a; Zhang et al., 2015a). In experimentally infected shrimp, the overexpression of heat shock protein 70 (hsp70) mRNA by a non-lethal heat shock induced a significant reduction of the gill-associated virus (GAV) and the white spot syndrome virus (WSSV) replication (De La Vega et al., 2006; Lin et al., 2011).

Regarding OsHV-1, the optimal seawater temperature in Europe for disease transmission and subsequent mortalities is between 16°C and 24°C (Pernet et al., 2012; Renault et al., 2014). In a previous paper, we found that survival of oysters challenged with OsHV-1 at 29°C was markedly higher (85.7%) than at 21°C (52.4%) whereas virus infectivity and virulence were unaltered (Delisle et al., 2018b). We therefore hypothesize that differences in survival between temperature reflect a host response to the pathogen. To test this hypothesis, we characterized at the physiological condition of oysters at 21°C and 29°C and then compared their transcriptomes during the course of infection. In contrast to previous studies which describes the mechanisms of infection under permissive conditions by comparing healthy vs. infected (Jouaux et al., 2013; Rosani et al., 2015a) or resistant vs. susceptible populations (de Lorgeril et al., 2018; Segarra et al., 2014b), we investigate the physiological mechanisms that modulate the severity of the disease by infecting susceptible oysters at two temperatures that are more or less permissive.

Results

We first characterized the initial physiological condition of oysters at 21°C and 29°C by means of biochemical analyses. Proximate composition (protein, lipid and carbohydrate) and citrate synthase activity of oysters acclimated at 21°C and 29°C were remarkably similar (Table S1). In contrast, unsaturation index of polar lipids, an indicator of thermal adaptation of biological membranes, was higher at 21°C than at 29°C, mostly reflecting variations in 20:5n-3. Finally, the ratio of the fatty acids 20:4n-6 to 20:5n-3 increased with temperature.

We then investigated the temporal transcriptomic response of oysters at 21°C and 29°C using 0 hpc as a reference point for each temperature. We found that the number of differentially abundant (DA) transcripts increased from 38 to 1413 between 12 and 48 hpc in oysters at 21°C while it remained low in oysters at 29°C (39 and 271 at 12 and 48 hpc respectively, Figure 1).

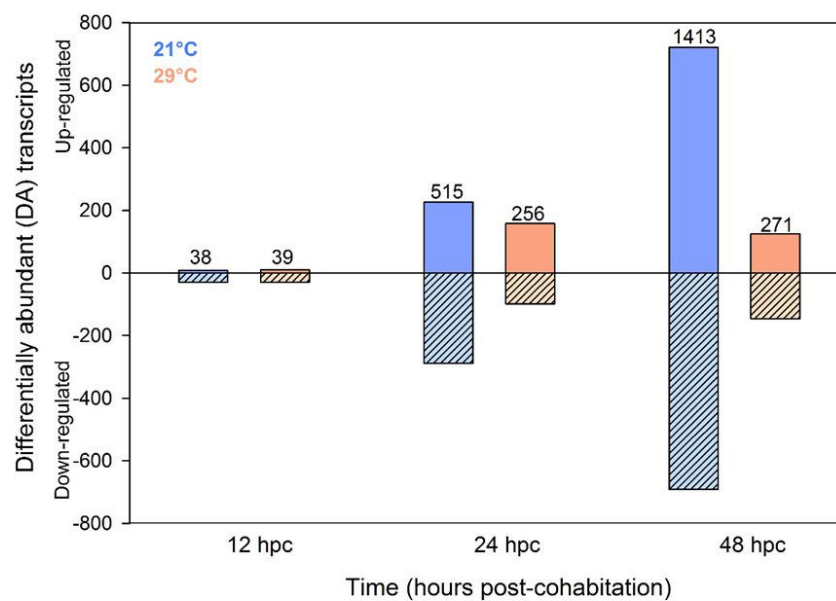


Figure 1. Number of differentially abundant (DA) transcripts in oysters infected at 21°C and 29°C 12, 24 and 48 h post-cohabitation (hpc) compared to 0 hpc (reference). The total number of DA transcripts is indicated above each bar.

At 21°C 12 hpc, gene ontology revealed that DA transcripts were associated to 9 biological processes (BP) that were all related to innate immune response (Table S2). Then, at 24 hpc, the most enriched BPs among the 515 DA transcripts were related to antiviral immunity (Table S3). Moreover, BPs linked to macromolecules synthesis, organization of cellular matrix and developmental processes were markedly enriched (Table S3). Concomitantly, BPs related to negative regulation of necrosis, cell death, protein maturation, and inhibition of G2/M transition of mitotic cell cycle were enriched (Table S3). At 48 hpc, transcripts related to innate immune response remained abundant (Table S4). Transcripts related to negative regulation of cell death and negative regulation of protein maturation processes were over-abundant, while those related to growth; metabolic processes and regulation of cardiac muscle contraction were less-abundant (Table S4).

At 29°C 12 hpc, DA transcripts were associated to 19 BPs related to innate immune response (Table S2). At 24 hpc, the depleted BPs were related to growth processes and cell development, and transmembrane transport (Table S3). The most depleted BP was the “regulation of

endoplasmic-reticulum-associated protein degradation pathway” (Table S3). Besides, transcripts coding apoptotic processes such as “lymphocyte apoptotic process”, “regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway” and “cell death” were less abundant. Low abundance of transcripts involved in metabolic processes persisted 48 hpc. Transcripts linked to “system process”, “endothelial cell development”, “regulation of anatomical structure morphogenesis”, “divalent metal ion transport” were less abundant, whereas those related to innate immunity, “defense response to virus” and “cellular homeostasis” were over-abundant (Table S4).

We then compared the transcriptome of oysters infected at 29°C and 21°C (reference) at each time point to identify factors required for the repression of infection at 29°C (Figure 2). We found that oyster transcriptomes at 29°C and 21°C were similar before infection as only 9 DA transcripts came out. However, the number of DA transcripts increased to 1400 at 12 hpc and decreased to 289 and 92 at 24 and 48 hpc respectively. Therefore, the effect of temperature on the transcriptomic response of infected oysters was particularly strong 12 hpc and we focused the functional enrichment analysis on this point.

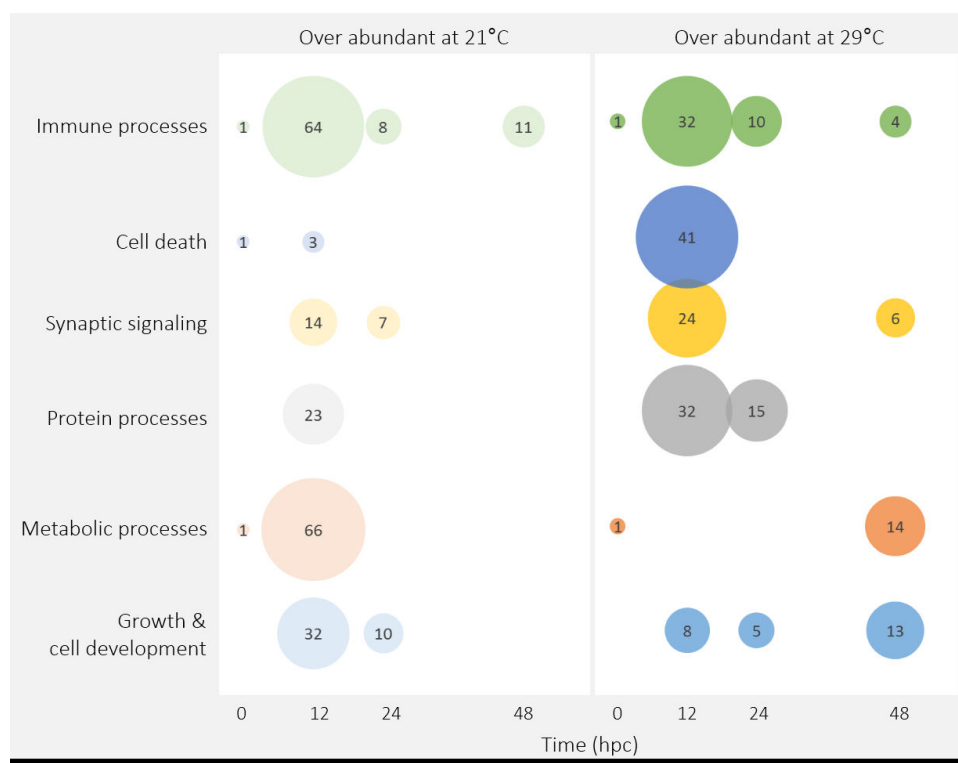


Figure 2. Number of differentially abundant (DA) transcripts per functional categories, in oysters infected at 29°C 0, 12, 24 and 48 h post-cohabitation compared to their counterparts infected at 21°C.

The functional enrichment analysis revealed that the number of DA related to immunity was 64 at 21°C and 32 at 29°C (Figure 3). These transcripts coded for immune receptors (pattern recognition receptors, immune receptor lectins, immune receptor FBG domain containing), intracellular immune signaling proteins (interleukins, cytokines, and growth factors), and for effector genes involved in cytolytic pathways or complement pathways were over-abundant at 21°C (Figure 3). However, transcripts coding for immune receptor LRR containing protein, intracellular transduction TLR adaptor molecules, and immune receptor pattern recognition receptors like scavenger receptor cysteine-rich repeat protein, RIG-I like receptor, NACHT and leucine-rich repeat receptors were more abundant at 29°C than at 21°C.

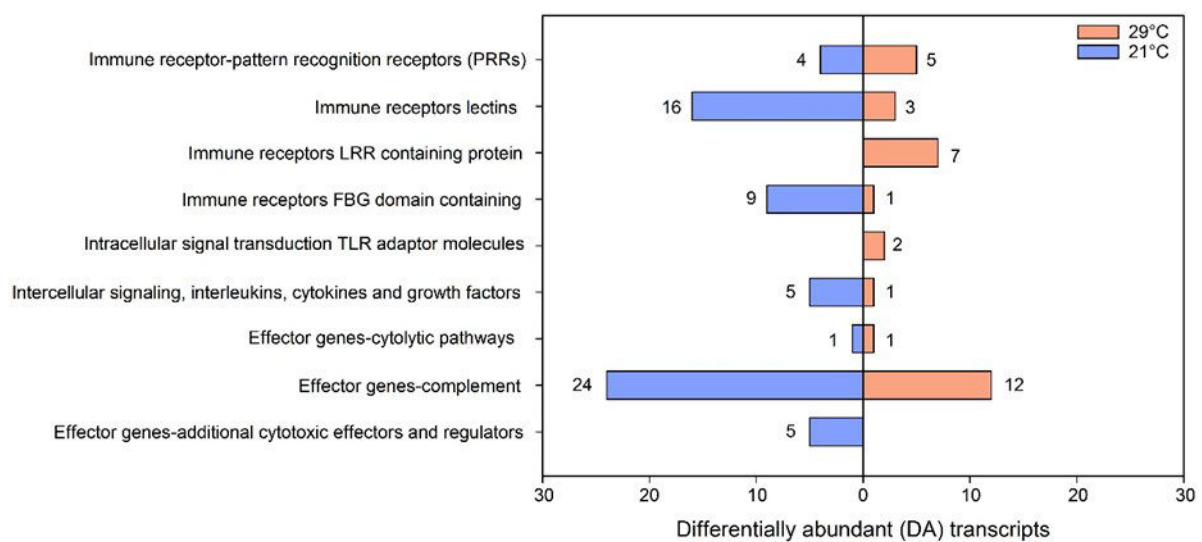


Figure 3. Number of differentially abundant (DA) transcripts related to immune processes in oysters infected at 29°C 12 h post-cohabitation compared to their counterparts infected at 21°C.

The functional enrichment analysis also showed that transcripts related to cell death, synaptic signaling, and protein processes were more abundant in oysters at 29°C than at 21°C whereas it was the inverse for those related to metabolism, and growth and cell development (Figure 2).

Over-abundant transcripts at 29°C related to cell death coded for 11 proteins involved in cell death *per se*, one autophagy protein and five apoptosis inhibitor proteins (Table S5). Those related to synaptic signaling coded for neurotransmitter synaptic receptors such as acetylcholine, GABA, glycine, serotonin, thyrotropin releasing hormone, and members of glutamate pathway, neuropeptide receptor and G protein subunit alpha (Table S6). Finally,

over-abundant transcripts at 29°C related to protein process coded for ubiquitin conjugating enzyme E2, E3 ubiquitin ligases proteins in charge of the substrate specificity (24 DA transcripts), and 3 deubiquitinase proteins were identified as regulators of this process (Table S7). Transcripts E3 are involved in regulation of apoptosis, protein translation arrest via EIF4E2 ubiquitination, degradation of misfolded proteins, regulation of immune response and major histocompatibility complex (MHC).

Over-abundant transcripts at 21°C related to metabolic processes coded for several proteins involved in catabolism of carbohydrate (4), amino acid (5) and triglyceride (4) and synthesis of fatty acids and phospholipid (3) and amino-acids (3) (Table S8). Transcripts coding for proteins involved in energy production pathways such as glycolysis (5), neoglucogenesis (1), penthose-phosphate (4), and transport of monocarboxylate metabolites (5) were also more abundant at 21°C than at 29°C. Finally, some over-abundant transcripts at 21°C were also related to cholesterol metabolic process (5), retinol metabolism (5), and transcription/translation processes (11).

Over-abundant transcripts at 21°C were also associated to processes like “regulation of growth”, and “cell adhesion”. These transcripts coded regulators of tissue growth (MEGF10, NOTCH1, CD63 antigen), and particularly for extracellular matrix components (Collagen alpha chain, Chondroitin Sulfate Proteoglycan, Uromodulin, Table S9). Interestingly, the chondroitin sulfate proteoglycan was strongly down-expressed at 29°C like five members of the Tetraspanin family, likely reflecting that these transcripts are associated to proteins that are involved in the entry of OsHV-1 in host cell. Other transcripts were involved in cell-cell adhesion (SVEP 1, contracted associated protein, Neurexin-2-alpha), wounding repairs and inflammatory responses (Thrombospondin-1 and 2, Tenascin, and Ninjurin-1). Most of these genes are associated to membrane glycoproteins that regulate numerous cellular functions such as cell extracellular matrix attachment, immunity, and cell migration.

Discussion

In a previous paper, we found that survival of oysters challenged with OsHV-1 at 29°C was markedly higher than at 21°C whereas virus infectivity and virulence were unaltered (Delisle et al., 2018b). Here we investigate how temperature influenced the host response to the pathogen by comparing transcriptomes (RNA-sequencing) during the course of infection at 21°C and 29°C. We found temperature influenced immune processes, cell death, synaptic

signaling, protein processes, metabolism and growth and cell development (Figures 2). These processes occur in all stages of infection and are summarized in Figure 4.

Prior to infection, oysters at 21°C and 29°C showed only 9 differentially abundant (DA) transcripts, suggesting that they were fully acclimated. This is consistent with the fact that filtration rates of oysters (Delisle et al., 2018b) and their proximate composition and aerobic metabolism (citrate synthase activity) were similar between temperature. Also, the unsaturation index of polar lipids, an indicator of thermal adaptation of biological membranes, varied consistently with temperature (Hochachka and Somero, 2002; Pernet et al., 2007).

The number of DA transcripts varied from 9 to 1415 depending on temperature and time. In previous studies investigating the response of oysters to OsHV-1 infection, the number of DA transcripts varied from 250 to 9400 (de Lorgeril et al., 2018; Jouaux et al., 2013; Rosani et al., 2015a). The relatively low number of DA transcripts obtained here probably reflects that we compared transcriptomes of susceptible and infected oysters at two temperatures which exhibited subtle differences in disease severity. Although survival was markedly different between temperature treatments, levels of OsHV-1 DNA in oysters at 21°C and 29°C reached the same maximum values 24-48 h after the onset of infection (Delisle et al., 2018b).

The number of DA transcripts in oysters infected at 21°C increased markedly throughout the duration of the study whereas it remained low and stable at 29°C. Similar differences in the number of DA transcripts were reported when comparing transcriptomes of oyster families with contrasted resistance phenotypes with regards to the disease (de Lorgeril et al., 2018). For instance, the number of DA transcripts increases markedly during the time course of infection in susceptible oyster family whereas it remains low and stable in resistant family (de Lorgeril et al., 2018). Therefore, from a quantitative point of view, the temporal RNA response of oysters infected at 21°C and 29°C resemble that of susceptible and resistant families respectively.

Our results suggest that seawater temperature could modulate the entry of OsHV-1 into the host cell by modulating the composition of the cell matrix and the attachment of the virus in a way consistent with a reduced susceptibility of the host to the virus at 29°C. For instance, transcripts coding for chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) were much less abundant at 29°C than at 21°C 12 hpc. This protein is a major component of the extracellular matrix of vertebrates, which, among other things, participates in the attachment of the herpes simplex virus 1 to the host cell (Mårdberg et al., 2002). In *C gigas*, CSPGs are particularly abundant in gills (Zhang

et al., 2012), which is the portal of entry of pathogens like OsHV-1 (Martenot et al., 2016; Segarra et al., 2015). Previous studies suggested that heparan sulfate, another extracellular matrix component, could be implicated in OsHV-1 entry in oysters cells (Jouaux et al., 2013; Segarra et al., 2014b). We also found that five members of Tetraspanins, a family of transmembrane proteins, were less abundant at 29°C. Among these proteins, the CD63 transcripts which code for an antigen involved in the entry of several types of viruses into host cells (Spoden et al., 2008; Van Sriel and Figdor, 2010).

Our results suggest that temperature modulated oyster immunity. For instance, transcripts related to immune receptor LRR containing protein, intracellular transduction Toll like Receptor adaptor molecules, and some immune receptor pattern recognition receptors, like scavenger receptor cysteine-rich repeat protein, RIG-I like receptor, NACHT and leucine-rich repeat receptors were more abundant in oysters at 29°C than at 21°C. Temperature naturally increases the abundance of transcripts related to immunity such as Toll like receptors, RIG-I, and Tumor necrosis factors in healthy oysters (Meistertzheim et al., 2007; Zhang et al., 2015a). Interestingly, transcripts coding for Toll like receptors pathway and RIG-I like receptor are activated in oyster during OsHV-1 replication (de Lorgeril et al., 2018; Green and Montagnani, 2013; He et al., 2015; Huvet et al., 2004; Rosani and Venier, 2017; Zhang et al., 2011). Although scavenger receptors, NACHT and leucine-rich repeat receptors have not been reported in previous transcriptional studies of oysters, these proteins can recognize viral nucleotides and participate in induction of anti-viral mediators in vertebrates (DeWitte-Orr et al., 2010; Martinez et al., 2011; Takeuchi and Akira, 2007).

In support to the transcriptomic results, the ratio of the fatty acids 20:4n-6 to 20:5n-3 increased with temperature, suggesting that the immune status of oysters was more favorable at 29°C. Indeed, these two fatty acids are involved in eicosanoid production which are associated with stimulation of immune function in invertebrates (Howard and Stanley, 1999). However, eicosanoids produced from 20:4n-6 are generally more active than those produced from 20:5n-3, and the replacement of 20:5n-3 by 20:4n-6 in bivalves decreases immune parameters of hemocytes (Delaporte, 2003; Delaporte et al., 2007, 2006).

We found that temperature increased the abundance of pro-apoptotic transcripts in oysters 12 hpc. Apoptosis is one of the major mechanisms of antiviral response inducing the abortion of viral multiplication and the elimination of viral progeny by premature lysis of infected cells (Pilder et al., 1984). Therefore, over-abundance of some pro-apoptotic transcripts at 29°C may

have limited virus proliferation, as previously reported in shrimps exposed to high temperature treatment during a viral infection (Granja et al., 2003). In the same time, some transcripts coding for inhibitors of apoptosis were also over-abundant at both 21°C and 29°C. The role of apoptosis during OsHV-1 infection is still unclear (de Lorgeril et al., 2018; Rosani et al., 2015a; Segarra et al., 2014b; Wang et al., 2018).

Temperature also influenced the ubiquitylation/proteasome system of oysters. For instance, the number of DA transcripts coding for the ubiquitylation/proteasome system were more abundant at 29°C 12 hpc. Similarly, number of DA transcripts related to ubiquitylation process increased during the first 6-12 h post-infection and were higher in resistant than in susceptible oysters (de Lorgeril et al., 2018). Moreover, the amount of protein related to ubiquitination process were altered in infected oysters (Corporeau et al., 2014). In vertebrates, ubiquitylation and proteolysis are involved in protein recycling and regulate the stability, activity and localization of target proteins (Bhoj and Chen, 2009). Several over-abundant transcripts identified in our study belong to protein E3 which is involved in major histocompatibility complex, apoptosis, cell cycle and the protein translation arrest. These processes are crucial for mounting an adequate immune response and more probably to fight against bacterial pathogens (Cheng et al., 2016; Seo et al., 2013). It is therefore likely that over-stimulation of the proteasome system in oysters at 29°C could limit the bacteremia that normally follow OsHV-1 infection (de Lorgeril et al., 2018).

We found that transcripts related to several neurotransmitter synaptic receptors were over-abundant in oysters infected at 29°C 12 hpc. These transcripts coded for receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and gonadotropin-releasing hormone. Oyster hemocytes generally have receptors for several neurotransmitters that are previously listed. Hemocytes regulate receptors abundance during immune response to influence apoptosis and phagocytosis, indicating that, once the host recognized an invader, some neurotransmitters might be released to optimize immune responses (Li et al., 2016; Liu et al., 2017). In oysters, the release of GABA and acetylcholine seems to be activated by immune stimulation and they tend to down-regulate the immune response at long-time scale, avoiding the excess immune reactions to maintaining the immune homeostasis (Li et al., 2016; Liu et al., 2017; Wang et al., 2018). At 29°C, over-expression of neuroendocrine receptors could optimize immune activities helping to eliminate OsHV-1 and to restore homeostasis after viral elimination.

In response to viral infection at 29°C, transcripts related to catabolism, metabolites transport, amino acids, nucleotides and fatty acids synthesis, transcription, and translation were less abundant at 29°C than at 21°C. This probably reflects that OsHV-1, like other herpesvirus, alter host cell metabolic pathways to provide an optimal environment for its replication and spread (De la Re Vega et al., 2017). More particularly, viruses increase *i*) nucleotide synthesis to supply rapid viral genome replication, *ii*) amino acid production used for virion assembly, *iii*) lipid availability to provide additional membrane material for envelopment of viral particles and *iv*) ATP flux for supporting the energy cost of genome replication and packaging (Sanchez and Lagunoff, 2015; Yu et al., 2011). More specifically, OsHV-1 increases glycolysis, TCA cycle, and fatty acid synthesis and triglyceride catabolism (Corporeau et al., 2014; Young et al., 2017). Other studies report depletions of host carbohydrate and triglyceride reserves during OsHV-1 infection (Pernet et al., 2018, 2014b; Tamayo et al., 2014). Here we showed that hijacking of the host cell machinery by OsHV-1 was altered at 29°C.

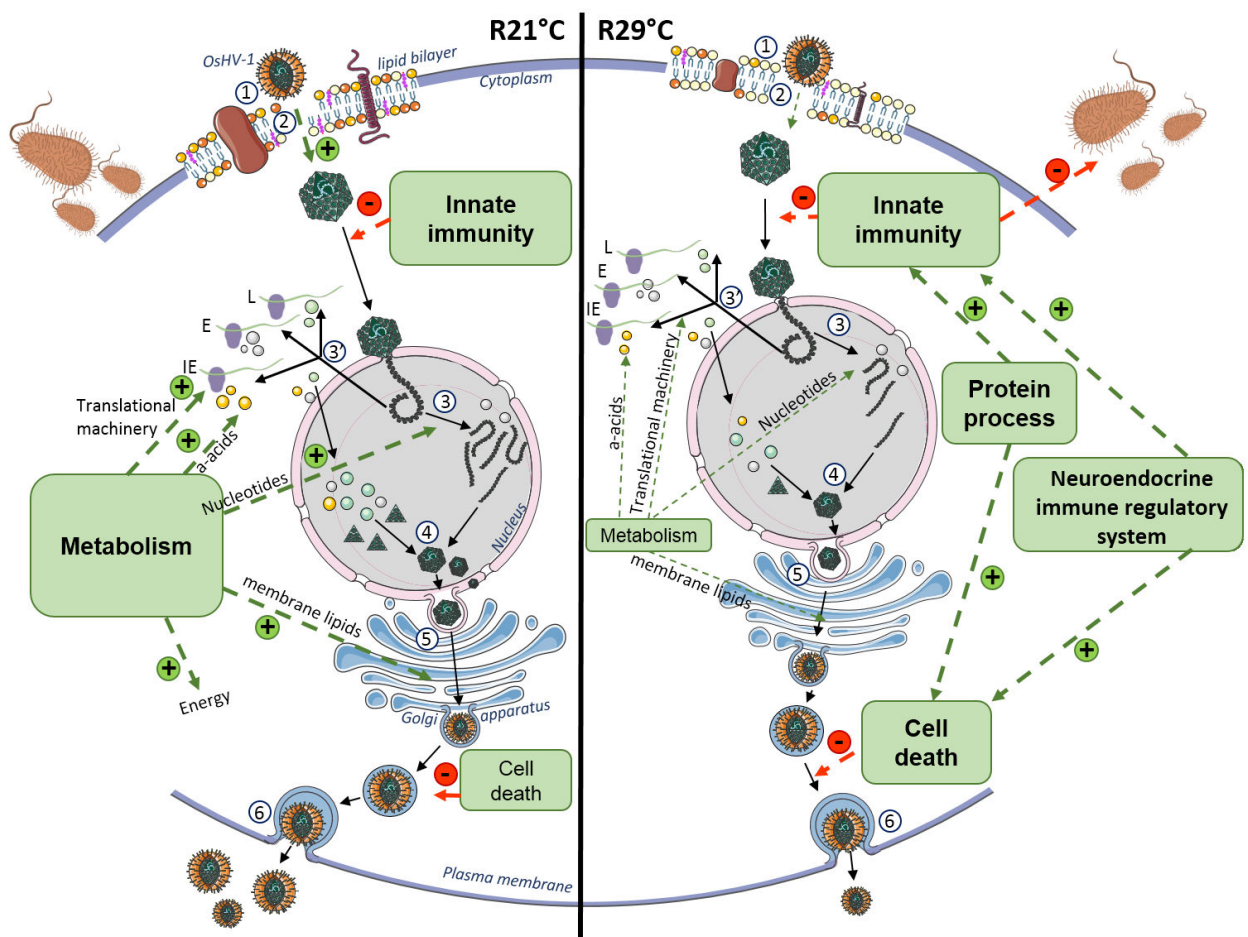
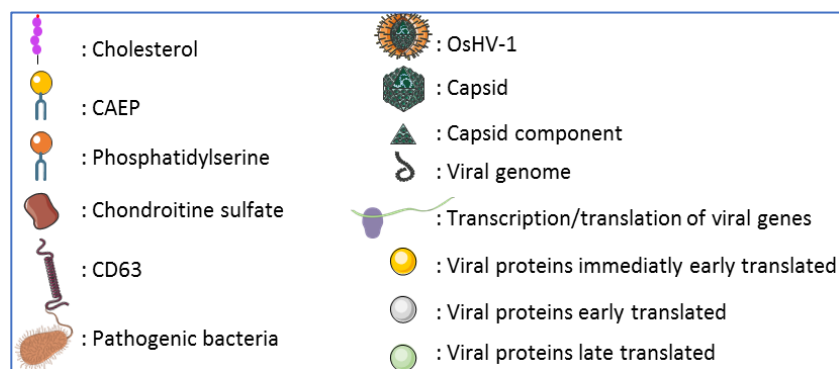


Figure 4. Schematic presentation of physiological responses occurring in oysters infected at 29°C and 21°C 12 hpc. This picture is a data compilation of our study and the life cycle of

OsHV-1 proposed by (Jouaux et al., 2013). Font size increase for upregulated processes and decrease for those that were down-regulated. The green + and the red - arrows indicate the positive and negative effect of each process on oyster disease. Numbers refer to the different steps of *OsHV-1* cycle: 1: viral attachment, 2: membranes fusion, 3: viral genome replication, 3': transcription and translation of viral DNA, 4: capsid assembly, 5: envelopment of viral particle and releasing of mature virion. Abbreviations: IE, viral genes that are expressed immediately early after the onset of infection; E refers to genes that are expressed early, and L to genes expressed late (Jouaux et al., 2013; Segarra et al., 2014a).



Methods

Experimental design

Details about the rearing procedures and experimental design are presented in a previous paper (Delisle et al., 2018b). Briefly, specific pathogen-free oysters were produced in hatchery at the Ifremer facilities in Argenton according to (Petton et al., 2015a). Prior to starting the experiments, young oysters were maintained in 500L open flow tank under controlled conditions (21°C, 35.2‰ salinity, O₂ > 85%), and fed *ad libitum*. At the onset of the experiment, oysters were 8 months old with a mean weight of 1.48 g. On 9 May 2016, oysters were divided in two groups, oysters for injection with a suspension of *OsHV-1* (*i.e.* pathogen donors) or oysters for cohabitation with pathogen donors (*i.e.* pathogen recipients). Pathogen donors were left at 21°C (control temperature) in 500L tank while recipient oysters were transferred in 45L tanks either left at 21°C or gradually increase to 29°C at 2°C day⁻¹ (n=3 replicate tanks per temperature). On 19 May, oysters for injection were myorelaxed in MgCl₂ and injected with 100 µl of viral suspension containing 6.9×10^6 copies of *OsHV-1* µVar in the adductor muscle, and incubated at 21°C during 5 hours. Then, injected oysters (now pathogen donors) were transferred into the 45L tanks to cohabit with the recipients acclimated at 21°C or

29°C. Survival of recipients was followed every day for 14 days (Delisle et al. 2018), and 15 recipients per tank were sampled at 0, 12, 24, 48 hours post cohabitation (hpc). Whole oyster tissues were removed from the shell, frozen in liquid nitrogen and individually ground in liquid nitrogen with a MM400 homogenizer (Retsch, Eragny, France). One individual oyster per tank was used for transcriptomic analyses and one pool of nine oysters was used for biochemical analysis (n=3 replicate tank for each temperature).

RNA extraction and RNA sequencing

A total of 45 libraries were sequenced corresponding to 3 individuals exposed to OsHV-1 (N=3) à 21°C or 29°C (2 temperatures) and sampled at 0 hpc, 12 hpc, 24 hpc, and 48 hpc (4 times).

Reads processing

Initial quality control was carried out with the FastaQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) version 0.11.5 (Andrews, 2010). In order to filter out any remaining post-sequencing ribosomal RNA, the local sequence alignment tool SortMeRna 2.0 (Kopylova et al., 2012) was applied against different public databases (Rfam 5.8S; Rfam 5S; Silva 16S archaeal, bacterial; Silva 18S eukaryote; Silva 23S archaeal, bacterial; Silva 28S eukaryote) and a custom database including *C. gigas* ribosomal RNAs. Raw reads were then trimmed for low quality bases using CLC Genomics Workbench v 11.0 as follows: 1) Illumina adapters were removed; 2) only reads with less than 2 ambiguous nucleotides were allowed; 3) reads with >5% nucleotide with PHRED scores <20 were filtered out; 4) broken pairs were discarded.

Reads mapping

Reads were mapped against the Ensembl *C. gigas* reference genome v 9.38 by means of the STAR aligner and following the two-pass mapping mode (Dobin and Gingeras, 2015). The maximum number of mismatches allowed was set to 20 and only uniquely mapped reads were counted. Read counts for each sample, at the gene level, were extracted by setting the “GeneCounts” quantification while running STAR.

Differential expression analysis

The read counts obtained from the STAR aligner were used for the differential gene expression analysis conducted using the Bioconductor package edgeR version 3.10.0 (Robinson et al., 2010) in the R environment (version 3.2.2). Samples were grouped according to condition, temperature and time. The edgeR “calcNormFactors” normalization function was used to find a set of scaling factors for the library sizes that minimized the log-fold changes between samples. The scale factors were computed using a trimmed mean of M-values (TMM) between samples (Robinson et al., 2010). After estimating dispersions, the glmLRT test provided in edgeR was used to assess differential abundant transcripts (DA) between experimental conditions, with a threshold for a significant false discovery rate (FDR) set to < 0.05 .

Functional enrichment

A functional interpretation of the lists of significant genes was obtained through enrichment analysis using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) software. “Biological process” (BP) annotation categories (BP_FAT) were used by setting the gene count equal to 3 and the ease value equal to 0.05. Since DAVID database contains functional annotation data for a limited number of species, it was necessary to link the *C. gigas* genes with sequence identifiers that could be recognized in DAVID. This process was accomplished using Uniprot/Swiss-prot accession IDs corresponding to each contig. These identifiers were used to define a “gene list” of DA transcripts and a “background” in the bioinformatic tool DAVID.

Biochemical analysis

Lipid class determination

Lipid class determination were obtained using 300 mg homogenized in 6 ml chloroform-methanol (2:1, v/v) according to Folch, (Folch et al., 1957). Neutral and polar lipids class determination were performed using a CAMAG automatic sampler (CAMAG, Switzerland) as describe in Da Costa et al., 2016. These methods allowed to separate the different lipid classes such as sterols (ST), alcohols (AL), alkenones 1 and 2 (ALK 1 and 2), free fatty acids (FFA), triacylglycerol (TAG), glyceryl ethers (GE) and sterol esters (StE) for neutral lipids and lysophosphatidyl-choline (LPC), sphingomyelin(Sm), phosphatidylcholine (PC),

phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (Ca) for phospholipids.

Fatty acid composition

Fatty acid composition was analyzed in neutral and polar lipids of oysters infected at 21°C or 29°C at 0 hpc, 12 hpc, 24 hpc and 48 hpc. Neutral and polar lipids were separated using a silica gel micro-column as described in Marty and collaborators (Marty et al., 1992). Each lipid fraction was transesterified (Metcalf and Schmitz, 1961) and analyzed in a gas chromatograph with an on-column injector, DB-Wax capillary column and a flame ionization detector. Fatty acids were then identified by comparison of retention times with standards.

Carbohydrates

Samples of 50 mg of powder were homogenized in 2 ml of nanopure water using a Polytron® PT 2500 E (Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland) and diluted 10 times. Carbohydrate concentrations were determined by colorimetric method according to (DuBois et al., 1956). Samples (250 µl) were mixed with phenol (0.5 ml, 5% m/v), and incubated for 20 min. Sulfuric acid (2.5 ml, 96 %) was added in samples. Absorbance was read at 490 nm and at 600 nm with a UV 941 spectrophotometer (Kontron instruments, San Diego, California, USA). Carbohydrates concentrations were determined with the following formula: $[Abs = ABS_{490nm} - 1.5 \times (ABS_{600nm} - 0.003)]$ and using a standard calibration curve. Concentration was expressed as mg of carbohydrates per g of dry weight.

Proteins and Citrate synthase activity

Total protein extraction was performed as describe in (Delisle et al., 2018a) using 600mg of recipient oysters powder. Total protein concentration of each lysate was determined using the DC protein assay (Bio-Rad). The resulting lysates were divided in aliquots and stored at -80°C until enzymatic assays.

All the assays were performed in triplicate at room temperature. Enzyme activity were measured using Nunc TM 96-well microplates (Thermo Scientific), a synergy HT microplate reader and the software Gen5, both from Biotek (Winooski, Vermont, USA). Enzymatic activity was measured and related to the total protein concentration of each sample.

Enzymatic activity of citrate synthase (CS; EC 2.3.3.1) was measured using 20 μ L of total protein lysates as describe in (Epelboin et al., 2015; Fuhrmann et al., 2018).

Supplementary data

Table S1: Proximate composition, citrate synthase activity, fatty acids composition in polar lipids and unsaturation index of oysters at 0 hpc, acclimated since 10d at 21°C or 29°C.

	21°C	29°C
Proximate composition		
Protein (% dry weight)	36.2 \pm 5	34.2 \pm 4.6
Carbohydrates (% dry weight)	10.3 \pm 2.4	13.1 \pm 0.5
Triglycerides (μ g.mg ⁻¹)	3.4 \pm 0.7	4.5 \pm 0.9
Enzyme assay		
Citrate synthase (mU.mg protein ⁻¹)	47.9 \pm 6.6	49.1 \pm 8
Fatty acids composition (%) in polar lipids		
14:0	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1
16:0	12 \pm 0.5	13.4 \pm 0.5
18:0 dma	7.8 \pm 0.9	7.9 \pm 0.6
18:00	3.1 \pm 0.1	2.9 \pm 0.2
18:1n-7	7.4 \pm 0.3	7.5 \pm 0.2
20_1n-11	1.8 \pm 0.2	2.7 \pm 0.4
20:1n-7	4.6 \pm 0	4.6 \pm 0.3
20:4n-6	5.5 \pm 0.2	6.4 \pm 0.4
20:5n-3	14.2 \pm 0.6	11.3 \pm 0.7
22:6n-3	13.7 \pm 0.3	13.1 \pm 0.2
22:2 NMI	6.2 \pm 0.4	6 \pm 0.8
20:4/20:5	0.38 \pm 0.0	0.57 \pm 0.1
Unsaturation index	245.8 \pm 3.5	236.4 \pm 0.8

Table S2, S3, S4

These supplementary data are available online. They correspond to gene enrichment analysis performed on the transcriptomic response of oysters at 21°C and 29°C using 0 hpc as a reference point for each temperature

<https://drive.google.com/open?id=1sfja6qVTbZ9mEK489BzEg1LLJrOemZ9EB>

Table S5. Transcripts related to cell death process differentially expressed at 12 hpc.

Biological process	Gene name	CGI	LFC	P-value
Cell death	MAP3K	CGI_10003652	3.09	<0.001
	Caspase-2	CGI_10014678	1.02	0.007
	Growth arrest-specific protein 2	CGI_10006013	2.18	0.004
	Pericentrin	CGI_10001236	2.20	0.002
	Heme-binding protein 2	CGI_10011388	2.11	<0.001
	Programmed cell death protein 10	CGI_10002438	2.91	0.002
	Programmed cell death protein 4	CGI_10028820	2.46	0.002
	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 27	CGI_10005873	1.81	<0.001
	X-box-binding protein 1	CGI_10005445	1.17	0.002
	Metalloproteinase inhibitor 3	CGI_10000389	1.75	<0.001
	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	CGI_10014528	2.03	0.006
Autophagy	Autophagy protein 5	CGI_10018604	1.93	<0.001
Cell death inhibitor	HCLS1-associated protein X-1-like	CGI_10011394	1.51	<0.001
	Apoptosis 1 inhibitor	CGI_10026772	4.43	<0.001
	Heat shock protein beta-1	CGI_10011376	2.16	<0.001
	Inhibitor of apoptosis protein	CGI_10005393	4.41	0.003
	Putative inhibitor of apoptosis	CGI_10019869	1.49	0.008

Table S5: Changes in the transcriptional expression of the *C. gigas* apoptosis related genes of R29°C compared to R21°C transcriptomic response, during the early response to OsHV-1 infection. (LFC: Log Fold Change)

Table S6. Transcripts related to cell synaptic signaling differentially expressed at 12 hpc.

Biological process	Gene name	CGI	LFC	P-value
Acetylcholine	Acetylcholine receptor subunit alpha-like 2	CGI_10021702	2.47	<0.001
GABA	Gamma-aminobutyric acid type B receptor ssu 2	CGI_10018562	3.80	0.004
Glutamate	Glutamate receptor 4	CGI_10015550	1.07	0.004
	Glutamate receptor, ionotropic kainate 2	CGI_10006846	2.32	0.043
	Vesicular glutamate transporter 2	CGI_10023398	1.31	<0.001
	Metabotropic glutamate receptor 5	CGI_10011484	1.44	<0.001
	Protein lin-10	CGI_10017177	2.64	0.002
Glycine	Glycine receptor subunit alphaZ1	CGI_10008177	1.76	0.006
Serotonin	5-hydroxytryptamine receptor 1A-alpha	CGI_10008776	1.82	0.003
	5-hydroxytryptamine receptor 2A	CGI_10012065	1.54	0.004
Prot G transduction	G protein subunit alpha	CGI_10012977	2.82	<0.001
TRH	Thyrotropin-releasing hormone receptor	CGI_10023293	1.78	<0.001
Neuropeptide	Gonadotropin-releasing hormone II receptor	CGI_10022302	1.52	0.005
Regulators	Alsin	CGI_10012236	1.81	<0.001

Table S6: Changes in the transcriptional expression of the *C. gigas* synaptic signaling related genes of R29°C compared to R21°C transcriptomic response, during the early response to OsHV-1 infection (LFC: Log Fold Change).

Table S7. Transcripts related to protein process differentially expressed at 12 hpc.

Biological process	Gene name	CGI	LFC	P-value
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1-like	CGI_10025987	3.61	<0.001
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 U	CGI_10008530	1.81	0.001
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	CGI_10015505	0.96	0.009
E3	E3 ubiquitin-protein ligase rnf213-alpha	CGI_10005453	1.78	0.005
	Ariadne-1-like protein	CGI_10024285	2.09	<0.001
	DCN1-like protein 4	CGI_10003817	2.82	0.004
	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	CGI_10018771	1.44	0.005
	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1	CGI_10026035	1.27	0.009
	Inhibitor of apoptosis protein	CGI_10005393	4.41	0.003
	Protein deltex-3-like protein	CGI_10002382	1.86	0.005
	Putative E3 ubiquitin-protein ligase ARI3	CGI_10023357	1.64	<0.001
	Putative E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	CGI_10028530	1.51	0.003
	Putative inhibitor of apoptosis	CGI_10007421	1.49	0.008
	Transcription intermediary factor 1-beta	CGI_10003254	3.33	0.002
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10006172	2.08	<0.001
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10013768	2.71	<0.001
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10001580	2.09	0.006
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10005584	1.89	0.002
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10003706	2.39	0.002
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10017589	2.49	<0.001
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10020024	1.78	<0.001
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10013767	1.16	0.008
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10019703	2.91	<0.001
	Tripartite motif-containing protein 2	CGI_10022495	1.61	0.002
	Apoptosis 1 inhibitor	CGI_10021439	4.43	<0.001
	Autophagy protein 5	CGI_10018604	1.93	<0.001
Adapter protein for E3	Brain tumor protein	CGI_10009245	3.13	<0.001
	BTB/POZ domain-containing protein 6	CGI_10025781	1.19	0.008
De-ubiquitinase	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	CGI_10008715	1.41	0.006
	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 27	CGI_10005873	1.81	<0.001
	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	CGI_10005143	3.22	0.001
Others	B-cell receptor-associated protein 31	CGI_10002335	1.53	0.005
	X-box-binding protein 1	CGI_10005445	1.17	0.002
	Mitotic spindle assembly checkpoint protein	CGI_10019832	1.33	<0.001

Table S7: Changes in the transcriptional expression of the *C. gigas* protein processes related genes of R29°C compared to R21°C transcriptomic response, during the early response to OsHV-1 infection (LFC: Log Fold Change).

Table S8. Transcripts related to metabolic process differentially expressed at 12 hpc.

Biological process	Gene name	CGI	LFC	P-value
Carbohydrates catabolism	α -glucosidase	CGI_10019976	-1.55	0.001
	β -galactosidase	CGI_10013358	-1.00	0.008
	Aldose-1- epimerase	CGI_10002487	-1.48	0.008
	Aldose-1- epimerase	CGI_10013973	-1.44	0.007
Glycolyse	glyceraldehyde 3 P-dehydrogénase	CGI_10010974	-1.01	0.007
	3-D phosphoglycerate kinase	CGI_10019050	-1.46	<0.001
	Hexokinase type 2	CGI_10023886	-1.43	<0.001
	Ketohexokinase	CGI_10024334	-1.83	<0.001
Neoglucogénèse	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	CGI_10014916	-1.16	0.004
Pentose-phosphate shunt, oxidative branch	Glucose 6-P Dehydrogenase	CGI_10011948	-1.57	0.003
	6-P Gluconolactonase	CGI_10002865	-2.70	<0.001
	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	CGI_10026515	-1.95	<0.001
Lipid metabolism	Fatty acid synthase	CGI_10020387	-2.46	<0.001
	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase	CGI_10021268	-2.11	0.002
	Acetyl-coA acetyl transferase	CGI_10015045	-2.53	<0.001
Triglycerides	Diacylglycerol O-Acyltransferases	CGI_10018485	-3.38	<0.001
	Pancreatic lipase-related protein 2	CGI_10014664	-1.19	0.007
	Pancreatic triacylglycerol lipase	CGI_10003345	-1.18	0.002
	Pancreatic triacylglycerol lipase	CGI_10023931	-1.05	0.009
Cholesterol metabolic process	Sortilin-related receptor	CGI_10003883	-2.11	0.002
	Sortilin-related receptor	CGI_10004946	-1.31	<0.001
	Niemann-Pick C1 protein	CGI_10006575	-2.49	<0.001
	Niemann-Pick C2 protein	CGI_10010548	-6.96	<0.001
	Blast: insulin-induced protein	CGI_10015540	-3.29	<0.001
Retinol metabolism	Retinol dehydrogenase 11	CGI_10012632	-1.73	0.001
	Beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase	CGI_10019019	-1.42	0.003
	Cytochrome P450 2J6	CGI_10022128	-1.54	0.002
	Beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase	CGI_10026077	-1.39	0.009
	Retinal dehydrogenase 1 D9	CGI_10026868	-1.44	0.047
Metabolites transport	Sodium/glucose cotransporter 4	CGI_10011683	-2.03	0.003
	Sodium-coupled monocarboxylate transporter	CGI_10003941	-1.65	0.003
	Monocarboxylate transporter 12	CGI_10011575	-1.17	0.005
	Monocarboxylate transporter 2	CGI_10012587	-1.22	0.009
	Monocarboxylate transporter 7	CGI_10026270	-1.98	0.002
	Monocarboxylate transporter 9	CGI_10018848	-1.43	<0.001
Transcription/translation	Uracil phosphoribosyltransferase	CGI_10027611	-3.30	<0.001
	DNA replication licensing factor mcm4	CGI_10015825	-2.40	0.004
	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	CGI_10012998	-1.10	0.006
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	CGI_10027352	-2.10	0.010

	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	CGI_10009423	-3.07	0.001
	Putative tyrosyl-tRNA synthetase, mitochondrial	CGI_10019167	-1.25	0.005
	rRNA-processing protein FCF1-like protein	CGI_10000030	-1.63	0.005
	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	CGI_10024491	-2.01	0.001
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	CGI_10023850	-2.22	0.007
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 6	CGI_10022249	-1.60	0.002
	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	CGI_10012563	-1.90	0.001
Amino-acids anabolism	Pyrroline 5 carboxylate reductase	CGI_10010949	-2.09	<0.001
	Glutamate decarboxylase	CGI_10013951	-4.53	<0.001
	Aminobutyrate transaminase	CGI_10027541	-1.80	0.009
Amino-acids catabolism	Succinate semialdehyde dehydrogénase	CGI_10008392	-1.36	<0.001
	Methylcrotonyl CoA carboxylase	CGI_10023847	-1.86	<0.001
	L-Serine dehydrogenase	CGI_10008600	-1.25	0.002
	Fumaryl-acetoacetase	CGI_10006585	-1.59	<0.001
	S-adenosylmethionine synthase	CGI_10006000	-1.33	0.0020

Table S9: Changes in the transcriptional expression of the *C. gigas* metabolism processes related genes of R29°C compared to R21°C transcriptomic response, during the early response to OsHV-1 infection (LFC: Log Fold Change).

Table S9. Transcripts related to growth and cell development process differentially expressed at 12 hpc.

Biological process	Gene name	CGI	LFC	P-value
Growth regulation	Neurogenic locus Notch protein (NOTCH1)	CGI_10004834	-1.63	<0.001
	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing prot 3	CGI_10014098	-1.77	<0.001
	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing prot 3	CGI_10014099	-2.07	<0.001
	Multiple epidermal growth factor-like domains 6 (MEGF6)	CGI_10021206	-2.25	<0.001
Cell-cell adhesion	Aggrecan core protein (Chondroitin Sulfate Proteoglycan)	CGI_10021137	11.09	<0.001
	Collagen alpha-1(IV) chain	CGI_10018033	-1.35	<0.001
	Collagen alpha-1(XII) chain	CGI_10024897	-2.19	<0.001
	Collagen alpha-2(VIII) chain	CGI_10016424	-2.12	<0.001
	Collagen alpha-4(VI) chain	CGI_10008455	-4.49	<0.001
	Collagen alpha-5(IV) chain	CGI_10018037	-2.22	<0.001
	Collagen alpha-5(VI) chain	CGI_10023717	-1.44	0.005
	Contactin-associated protein like 5-2	CGI_10014100	-1.10	0.008
	Neurexin-2-alpha	CGI_10023108	-3.09	<0.001
	Ninjurin-1	CGI_10013211	-1.09	0.009
	Protocadherin Fat 4	CGI_10011524	-1.79	0.004
	Protocadherin Fat 4	CGI_10019520	-1.68	<0.001
	SCO-spondin	CGI_10022184	-1.89	0.002
	Sushi repeat-containing protein SRPX	CGI_10010798	-5.94	0.001
	Tenascin	CGI_10014178	-1.86	<0.001
	Tenascin-R	CGI_10003430	-6.71	<0.001
	Tenascin-R	CGI_10018027	-2.41	0.005
	Thrombospondin-1	CGI_10008626	-1.42	<0.001
	Thrombospondin-2	CGI_10005014	-3.14	<0.001
	Uromodulin	CGI_10003431	-3.79	<0.001
	Sushi von Willebrand factor type A (SVEP 1)	CGI_10019507	-1.23	0.003
	Tetraspanin-33	CGI_10001522	-1.42	0.001
	Tetraspanin-6	CGI_10001341	-2.85	<0.001
	Tetraspanin-18	CGI_10024557	-4.46	0.005
	CD63 antigen	CGI_10016848	-2.07	0.006
	Leukocyte surface antigen CD53	CGI_10015237	-2.67	0.003

Table S9: Changes in the transcriptional expression of the *C. gigas* growth and cell development related genes of R29°C compared to R21°C transcriptomic response, during the early response to OsHV-1 infection (LFC: Log Fold Change).

References

- Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., Travers, M.A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>
- Bhoj, V.G., Chen, Z.J., 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430–437. <https://doi.org/10.1038/nature07959>
- Burge, C.A., Mark Eakin, C., Friedman, C.S., Froelich, B., Hershberger, P.K., Hofmann, E.E., Petes, L.E., Prager, K.C., Weil, E., Willis, B.L., Ford, S.E., Harvell, C.D., 2014. Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 6, 249–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>
- Cheng, Q., Wang, H., Jiang, S., Wang, L., Xin, L., Liu, C., Jia, Z., Song, L., Zhu, B., 2016. A novel ubiquitin-protein ligase E3 functions as a modulator of immune response against lipopolysaccharide in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 60, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.027>
- Corporeau, C., Tamayo, D., Pernet, F., Quéré, C., Madec, S., 2014. Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J. Proteomics* 109, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.030>
- Da Costa, F., Petton, B., Mingant, C., Bougaran, G., Rouxel, C., Quéré, C., Wikfors, G.H., Soudant, P., Robert, R., 2016. Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquac. Nutr.* 22, 813–836. <https://doi.org/10.1111/anu.12301>
- De la Re Vega, E., Sánchez-Paz, A., Gallardo-Ybarra, C., Lastra-Encinas, M.A., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J.M., López-Torres, M.A., Maldonado-Arce, A.D., 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish Shellfish Immunol.* 71, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.079>
- De La Vega, E., Hall, M.R., Degnan, B.M., Wilson, K.J., 2006. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture* 253, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.041>
- de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Pérignon, A., Régler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.* 9, 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>
- Delaporte, M., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00518>
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 343, 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.12.021>
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., Samain, J.F., 2006.

- Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567–576. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5006-9>
- Delisle, L., Fuhrmann, M., Quéré, C., Pauletto, M., Pichereau, V., Pernet, F., Corporeau, C., 2018a. The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* Is Upaccumulated During Infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): an Indicator of the Warburg Effect. *Mar. Biotechnol.* 20, 87–97. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9789-x>
- Delisle, L., Petton, B., Burguin, J.-F., Morga, B., Corporeau, C., Pernet, F., 2018b. Temperature modulate disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.056>
- DeWitte-Orr, S.J., Collins, S.E., Bauer, C.M.T., Bowdish, D.M., Mossman, K.L., 2010. An accessory to the “Trinity”: SR-As are essential pathogen sensors of extracellular dsRNA, mediating entry and leading to subsequent type I IFN responses. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000829>
- Dobin, A., Gingeras, T.R., 2015. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 51, 11.14.1-11.14.19. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- EFSA, 2010. Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters. *Eur. Food Saf. Auth. J.* 8, 1–60. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1894>
- Epelboin, Y., Quéré, C., Pernet, F., Pichereau, V., Corporeau, C., 2015. Energy and Antioxidant Responses of Pacific Oyster Exposed to Trace Levels of Pesticides. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1831–1841. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00269>
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C., Pernet, F., 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biol. Open* 7, bio028134. <https://doi.org/10.1242/bio.028134>
- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragon, L., Salazar, M., 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Dis. Aquat. Organ.* 54, 73–78. <https://doi.org/10.3354/dao054073>
- Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051>
- Green, T.J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N., Speck, P., 2014. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.026>
- Harvell, C., Mitchell, C., Ward, J., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* (80-). 296, 2158–2163. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S.E., Lelong, C., Sourdaire, P., Mathieu, M., Guo, X., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.023>
- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological

evolution., Oxford Uni. ed.

- Huvet, A., Herpin, A., D??gremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.008>
- Jenkins, C., Hick, P., Gabor, M., Spiers, Z., Fell, S., Gu, X., Read, A., Go, J., Dove, M., O'Connor, W., Kirkland, P., Frances, J., 2013. Identification and characterization of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 105, 109–126. <https://doi.org/doi.org/10.3354/dao02623>
- Jouaux, A., Lafont, M., Blin, J.-L., Houssin, M., Mathieu, M., Lelong, C., 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-590>
- Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217.
- Li, M., Qiu, L., Wang, L., Wang, W., Xin, L., Li, Y., Liu, Z., Song, L., 2016. The inhibitory role of γ -aminobutyric acid (GABA) on immunomodulation of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 52, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.015>
- Lin, Y.-R., Hung, H.-C., Leu, J.-H., Wang, H.-C., Kou, G.-H., Lo, C.-F., 2011. The Role of Aldehyde Dehydrogenase and Hsp70 in Suppression of White Spot Syndrome Virus Replication at High Temperature. *J. Virol.* 85, 3517–3525. <https://doi.org/10.1128/JVI.01973-10>
- Liu, Z., Zhou, Z., Jiang, Q., Wang, L., Yi, Q., Qiu, L., Song, L., 2017. The neuroendocrine immunomodulatory axis-like pathway mediated by circulating haemocytes in pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Open Biol.* 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.160289>
- Lynch, S.A., Carlsson, J., O'Reilly, A.J., Cotter, E., Culloty, S.C., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139, 1526–1532. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0031182012000881>
- Mårdberg, K., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., 2002. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. *J. Gen. Virol.* 83, 291–300. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-291>
- Martenot, C., Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Houssin, M., Renault, T., 2016. In situ localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 136, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.04.002>
- Martinez, V.G., Moestrup, S.K., Holmskov, U., Mollenhauer, J., Lozano, F., 2011. The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacol. Rev.* 63, 967–1000. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004523>
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.-F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 163, 221–234. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90051-B](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90051-B)
- Meistertzheim, A., Tanguy, A., Moraga, D., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress 274, 6392–6402. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06156.x>
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 33, 363–364. <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>
- Mortensen, S., Strand, Å., Bodvin, T., Alfjorden, A., CK, S., Jelmert, A., Aspán, A., Sælemyr, L., L.J., N., Albrechtsen, J., 2016. Summer mortalities and detection of ostreid herpesvirus microvariant in

- Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway. *Dis. Aquat. Organ.* 117, 171–176.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.F., Keck, N., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* 2, 215–237. <https://doi.org/10.3354/aci00041>
- Pernet, F., Fuhrmann, M., Petton, B., Mazurić, J., Bouget, J.F., Fleury, E., Daigle, G., Gernez, P., 2018. Determination of risk factors for herpesvirus outbreak in oysters using a broad-scale spatial epidemiology framework. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29238-4>
- Pernet, F., Lagarde, F., Jeanné, N., Daigle, G., Barret, J., Le Gall, P., Quere, C., D'orbcastel, E.R., 2014. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088469>
- Pernet, F., Lupo, C., Bacher, C., Whittington, R.J., 2016. Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150213. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0213>
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J. Exp. Biol.* 210, 2999–3014. <https://doi.org/10.1242/jeb.006007>
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., Pernet, F., 2015. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 6, 205–222. <https://doi.org/10.3354/aci00125>
- Pilder, S., Logan, J., Shenk, T., 1984. Deletion of the Gene Encoding the Adenovirus 5 Early Region 52, 664–671.
- Renault, T., Bouquet, A.L., Maurice, J.T., Lupo, C., Blachier, P., 2014. Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oyster (*crassostrea gigas*) Spat: Relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5419–5426. <https://doi.org/10.1128/AEM.00484-14>
- Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* 17, 394–409. <https://doi.org/10.1051/alr>
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Rosani, U., Varotto, L., Domeneghetti, S., Arcangeli, G., Pallavicini, A., Venier, P., 2015. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 17, 4200–4212. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12706>
- Rosani, U., Venier, P., 2017. Oyster RNA-seq data support the development of Malacoherpesviridae genomics. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01515>
- Sanchez, E.L., Lagunoff, M., 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology* 479–480, 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.038>
- Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Tourbiez, D., Renault, T., 2015. Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *J. Invertebr. Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.013>
- Segarra, A., Faury, N., Pépin, J.F., Renault, T., 2014a. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J. Invertebr. Pathol.* 119, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.002>
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2014b. Dual transcriptomics of virus-host

- interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 15, 580. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-580>
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>
- Seo, J.K., Lee, M.J., Go, H.J., Kim, G. Do, Jeong, H. Do, Nam, B.H., Park, N.G., 2013. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* 53, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.003>
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., Florin, L., 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003313>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220, 214–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00562.x>
- Tamayo, D., Corporeau, C., Petton, B., Quere, C., Pernet, F., 2014. Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 μ Var. *Aquaculture* 432, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.023>
- Van Spriel, A.B., Figdor, C.G., 2010. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 12, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.11.001>
- Wang, L., Song, X., Song, L., 2018. The oyster immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 80, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025>
- Young, T., Kesarcodi-Watson, A., Alfaro, A.C., Merien, F., Nguyen, T. V., Mae, H., Le, D. V., Villas-Bôas, S., 2017. Differential expression of novel metabolic and immunological biomarkers in oysters challenged with a virulent strain of OsHV-1. *Dev. Comp. Immunol.* 73, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.025>
- Yu, Y., Clippinger, A.J., Alwine, J.C., 2011. Viral effects on metabolism: Changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* 19, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.002>
- Zhang, G., 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., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Zhang, Li, L., Guo, X., Litman, G.W., Dishaw, L.J., Zhang, G., 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci. Rep.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep08693>
- Zhang, Li, L., Zhang, G., 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.023>

- *Conclusion de l'article 2*

Nous avons montré que l'exposition des jeunes huîtres à 29°C réduisait significativement leur sensibilité à OsHV-1 sans modification de l'infectivité du virus. Cette baisse de sensibilité des huîtres pourrait s'expliquer par la réduction du catabolisme, de la synthèse des acides aminés, des nucléotides, des acides gras et des processus de transcription, et par la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans différents aspects de la réponse aux pathogènes tels que l'apoptose, l'ubiquitinylation, et l'immunité.

Discussion générale et perspectives

La pêche et l'aquaculture représentent pour des centaines de millions de personnes à travers le monde une ressource de première importance, qu'il s'agisse de l'alimentation, de la nutrition, des revenus ou des moyens d'existence (FAO, 2016). La production aquacole pourrait à l'avenir contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition d'une population mondiale qui devrait atteindre 9,7 milliards de personnes en 2050 (FAO, 2016).

Cependant, depuis une trentaine d'années les maladies s'intensifient en milieu marin et touchent une grande diversité d'organismes, des vertébrés aux mollusques (Harvell et al., 2002). Ces maladies émergentes associées aux changements climatiques globaux constituent une menace majeure. Il est estimé que d'ici à 2050, le revenu de l'ensemble des activités aquacoles pourrait chuter de 35% (Lam et al., 2016) menaçant directement cette filière et les populations qui en dépendent.

Les causes de ces épizooties sont complexes, particulièrement difficiles à prévoir et à caractériser car leur survenue résulte d'interactions complexes entre l'hôte, le pathogène et les facteurs environnementaux (Burge et al., 2014). Le milieu marin est ouvert et l'eau constitue le principal agent de transmission de pathogènes. A la différence du milieu terrestre, le contrôle des paramètres environnementaux, les mesures d'isollements, ou l'administration de traitements demeurent impossibles. Face à ces enjeux, il apparaît essentiel de mieux définir les **pathosystèmes** et de comprendre comment les facteurs environnementaux influencent l'expression de ces maladies. Ces connaissances permettront à terme de proposer des protocoles de gestion et de prévention, et potentiellement d'adapter les pratiques culturelles.

Ces travaux de thèse ont porté sur l'effet des hautes températures sur l'interaction entre l'huître creuse et le virus OsHV-1. *Crassostrea gigas* présente un intérêt économique majeur ; elle est en effet la principale espèce d'huître élevée dans le monde avec environ 626 000 tonnes produites en 2014 (FAO). Elle est touchée par d'importantes mortalités, principalement causées par le virus OsHV-1 et clairement associées aux variations de températures de l'eau de mer (Pernet et al., 2014a; Petton et al., 2013; Renault et al., 2014).

Nous avons montré que l'exposition des jeunes huîtres à 29°C réduisait significativement leur sensibilité à OsHV-1 sans modification de l'infectivité du virus. Cette baisse de sensibilité des huîtres pourrait s'expliquer par la réduction du catabolisme, de la synthèse des acides aminés,

des nucléotides, des acides gras et des processus de transcription, et par la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans différents aspects de la réponse aux pathogènes tels que l'apoptose, l'ubiquitinylation, et l'immunité. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de limitation et de contrôle des maladies en milieu marin et pourraient peut-être aider à trouver des applications dans la prévention des mortalités d'huîtres creuses. Ainsi, l'acquisition de connaissances sur les pathosystèmes et l'identification des mécanismes modulant la sensibilité des animaux est essentielle à l'évolution des techniques de production mais aussi à l'élaboration d'outils diagnostiques. Finalement, comprendre l'effet de la température sur les interactions hôte pathogène paraît essentiel dans la prévision et le contrôle des épisodes infectieux en milieu marin dans un contexte d'augmentation des températures moyennes.

I. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'interaction *C. gigas* - OsHV-1.

1. Caractériser l'effet de la température sur *C. gigas*.

Mieux comprendre les interactions hôte/pathogène nécessite une bonne connaissance des réponses physiologiques de l'hôte face aux variations des paramètres environnementaux dans un contexte non-pathologique. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'Art, les variations de températures induisent de profonds changements physiologiques chez les ectothermes tels que le rythme cardiaque, la composition et la fluidité membranaire ou l'activité des enzymes, la protection aux stress, ou l'expression de gènes impliqués dans l'immunité.

On dispose actuellement de données concernant les températures optimales de ponte, de croissance ou de nutrition pour *C. gigas*. Cependant, les températures létales, les capacités d'acclimatation et l'amplitude des variations thermiques journalières rencontrées par les huîtres en milieu naturel demeurent peu documentées. Des approches transcriptomiques et protéomiques ont montré que le maintien des huîtres à 25°C induisait une réponse de stress, et l'activation du catabolisme. De plus l'exposition à des challenges thermiques semble moduler l'expression de gènes impliqués dans l'immunité (Zhang et al., 2015a, 2012) et pourrait

moduler la sensibilité des huîtres aux pathogènes. L'analyse des données transcriptomiques d'exposition des huîtres à de hautes températures, données publiées avec le génome (Zhang et al., 2012), constituerait une approche complémentaire qui faciliterait l'identification des mécanismes impliqués dans la réduction de la sensibilité des huîtres à OsHV-1 à hautes températures.

2. Identifier la gamme thermique de performance d'OsHV-1.

Les virus sont particulièrement résistants aux variations de température, l'inactivation survient lorsqu'un l'un de leurs composants structurels est dénaturé (protéines, lipides ou acides nucléiques (Dimmiok, 1967; Woese, 1960). Nous avons pu montrer, dans l'expérience 2, que l'incubation d'OsHV-1 à 29°C pendant 5 heures n'avait pas induit de dénaturation ou de modification de sa virulence. Cependant, l'incubation à 26°C semble l'avoir augmentée. Les raisons demeurent inexpliquées. Il semblerait pertinent d'évaluer l'évolution de virulence et de la persistance d'OsHV-1 sur une large gamme de températures selon un protocole similaire à celui de l'expérience 2, couplé à des observations microscopiques de la structure virale. Pour compléter ces données, il serait pertinent à partir des données RNAseq présentées dans le chapitre 2, d'analyser les transcrits viraux différentiellement exprimés à 21°C, 26°C et 29°C.

Les mécanismes d'entrée d'OsHV-1 et de fusion à la membrane hôte sont inconnus. De manière générale, l'enveloppe virale se compose d'une bicouche lipidique issue de la cellule hôte à partir des membranes cellulaires (Pasquier et al., 2013). De récentes analyses ont décrit que l'enveloppe du virus de l'immunodéficience acquise ne reflétait pas la composition lipidique de la membrane plasmique de l'hôte mais s'apparentait à celle des radeaux lipidiques (Brugger et al., 2006). Définir la composition lipidique d'OsHV-1 semble accessible au laboratoire. Une analyse lipidomique par chromatographie sur couche mince couplée à une chromatographie en phase gazeuse permettrait de connaître l'abondance des différentes classes de lipides et établir la composition précise en acides gras d'OsHV-1. Ces analyses pourraient être réalisées sur la suspension virale couramment utilisée pour l'infection des huîtres, obtenue à partir d'une purification d'animaux infectés.

Mieux connaître la composition d'OsHV-1 et les processus d'entrée et de fusion à la membrane pourrait à terme permettre d'identifier des gènes d'intérêt modulant la sensibilité des huîtres à

l'infection. Par exemple les niveaux d'expression des gènes codant pour des glycosaminoglycans tels que le sulfate d'héparane ou la chondroïtine sulfate semblent sous-exprimés chez les huîtres résistantes à l'infection (Delisle et al. *in prep*; Segarra et al., 2014). Ils pourraient avoir un rôle dans la liaison du virus à la surface des cellules cibles et constituent des gènes d'intérêt dans la modulation de la sensibilité des huîtres à l'infection.

3. Rôle du métabolisme énergétique dans la réplication d'OsHV-1

La majorité des virus détourne la machinerie cellulaire hôte pour la synthèse de virions. Les altérations du métabolisme induisent la glycolyse aérobie connue sous le nom d'effet « Warburg » qui permet d'augmenter l'énergie et la synthèse des molécules (nucléotides, acides gras ou acides aminés) nécessaires pour la réplication virale (Sanchez and Lagunoff, 2015). Chez l'huître creuse, des modifications du métabolisme ont été mises en évidence lors de l'infection par OsHV-1 chez des larves et des naissains telles qu'une augmentation de la glycolyse, des modulations du cycle de Krebs ainsi que de la synthèse lipidique (Corporeau et al., 2014; Young et al., 2017). Ces modifications pourraient soutenir la réplication virale et coïncident avec une consommation des réserves énergétiques accrue chez les animaux infectés (Corporeau et al., 2014; Pernet et al., 2018, 2014b; Tamayo et al., 2014).

Nos résultats montrent qu'à 29°C, les gènes codant des protéines impliquées dans la transcription, la traduction, le catabolisme, la synthèse de phospholipides, d'acides gras, acides aminés et nucléotides ainsi que pour la glycolyse et le transport des métabolites sont fortement sous-exprimés par rapport à 21°C.

Ces données suggèrent que la température pourrait réduire l'expression des gènes viraux ainsi que la synthèse de virions limitant la réalisation du cycle de réplication viral. Couplés à l'induction de l'apoptose, des processus d'ubiquitinylation et de la réponse immunitaire, ces réponses pourraient permettre la réduction des processus infectieux et la survie de l'hôte.

L'importance du métabolisme et de la modulation de la croissance dans l'issue de l'infection est aussi suggérée dans une récente étude réalisée au laboratoire. Les résultats montrent que des huîtres sélectionnées pour leur faible croissance survivent mieux à l'infection par OsHV-1 que celles à forte croissance à niveau de nutrition équivalent (Pernet et al., *in prep*).

Finale­ment, le contrôle du métabolisme éner­gétique et la disponibilité de la machinerie cellulaire pourraient constituer des pistes de recherches intéressantes dans la modulation de la permissivité des huîtres à OsHV-1. Des travaux parallèles portant sur la caractérisation de la protéine VDAC (Voltage-dependent anion channel) réalisés durant ma thèse soulignent aussi l'importance du métabolisme éner­gétique dans les processus infectieux ((Delisle et al., 2018a) annexe 1). VDAC est un pore mitochondrial qui ré­gule le métabolisme éner­gétique cellulaire en contrôlant l'influx et l'efflux de métabolites (ADP, ATP, NADH) et d'ions à travers la membrane mitochondriale. Chez la crevette, VDAC est surexprimé lors des phases précoces de l'infection par le WSSV et il facilite le processus infectieux (Chen et al. 2011). Cette protéine est particulière­ment accumulée lors de l'infection par OsHV-1 et pourrait refléter la capacité de l'huître à répliquer le virus (Delisle et al., 2018a).

Pour poursuivre les investigations, des approches éco­physiologiques et métabolomiques seraient nécessaires afin d'évaluer précisée­ment les flux éner­gétiques lors de l'infection virale par OsHV-1 et leur modulation par les facteurs environne­mentaux tels que les hautes températures.

II. Optimisation de l'exposition des huîtres à hautes températures

Nos résultats suggèrent que l'exposition des jeunes huîtres à hautes températures pourrait devenir une nouvelle stratégie pour limiter les mortalités causées par OsHV-1. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'optimiser un protocole de réduction des mortalités d'huîtres par exposition à hautes températures: il faudrait définir différents paramètres tels que la température minimale et la durée d'exposition minimale nécessaire à la réduction des mortalités, ainsi que la fenêtre temporelle d'application dans la dynamique d'infection, et il faudrait ensuite évaluer la durée des effets bénéfiques sur la survie

1. Quelle serait la température optimale ?

Nos résultats montrent que la survie des huîtres exposées à OsHV-1 est améliorée de 33% à 29°C par rapport à 21°C et de 42% par rapport à 26 °C. Une étude complémentaire montre que la réduction de la mortalité surviendrait dès la température de 26.9°C (Petton et al., 2013). Ces

résultats suggèrent que la température seuil réduisant les mortalités serait comprise aux alentours de 26°C.

Cependant, la survie est plus importante lorsque les huîtres sont maintenues à 29°C qu'à 26.9°C suggérant que l'effet bénéfique est amélioré avec l'augmentation de la température (Petton et al., 2013). Afin de vérifier cette hypothèse, l'influence de très hautes températures sur la survie des huîtres infectées a été évaluée selon un plan d'expérience similaire à celui présenté dans ce manuscrit. Des huîtres donneuses préalablement infectées ont été placées en cohabitation avec des jeunes huîtres receveuses acclimatées à 21°C, 29°C, 31°C ou 33°C pendant 10 jours (Figure 24, *Com pers. B. Petton*). Trente-trois degrés correspond aux températures limites à partir desquelles les jeunes huîtres cessent de s'alimenter avant de mourir à 38°C (*Com pers M. Alunno-Bruscia*). Les résultats présentés ci-dessous valident une nouvelle fois l'augmentation de la survie à des températures supérieures à 26°C et montrent que la survie atteint une valeur maximale < 97% dès 31°C (*Com pers B. Petton*).

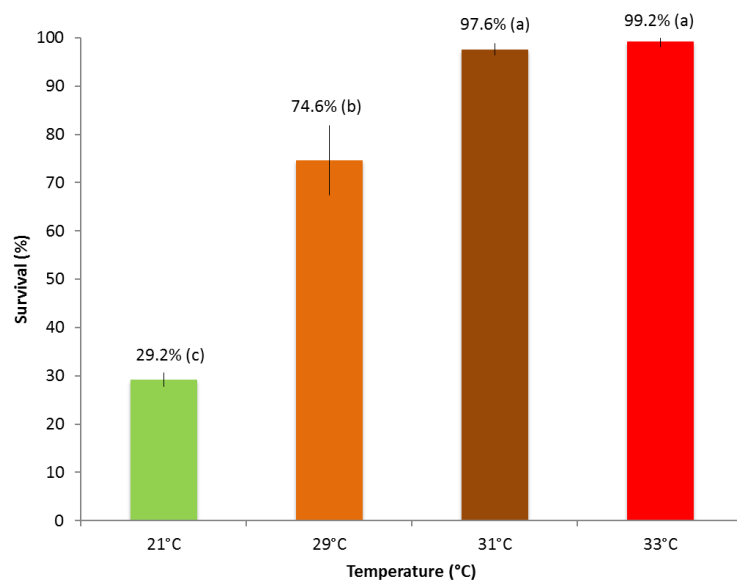


Figure 25 : Effet des très hautes températures sur la survie d'huîtres receveuses infectées par cohabitation avec des huîtres donneuses et maintenues à 21°C, 29°C, 31°C ou 33°C.

Ainsi, 31°C pourrait constituer la température optimale permettant la meilleure survie des jeunes huîtres infectées par OsHV-1. Cependant, ces résultats peuvent varier avec l'âge des

animaux infectés mais aussi selon les méthodes d'infection (*com pers B. Petton*), et restent à vérifier. Les mécanismes doivent être explorés.

2. Quelle durée d'exposition à haute température ?

Dans notre expérience les huîtres ont été maintenues pendant 10 jours à 21°C, 26°C et 29°C avant l'ajout d'huîtres donneuses de pathogènes dans ces bassins. Afin de comprendre quel rôle joue l'acclimatation dans l'amélioration de la survie à hautes températures, d'autres huîtres non-acclimatées, qui étaient maintenues à 21°C pendant 10 jours, ont été transférées au moment de l'infection dans les bassins aux trois températures contenant les huîtres acclimatées et les huîtres donneuses de pathogènes.

Aux trois températures testées, 7 à 10% de mortalité supplémentaire ont été enregistrés chez les huîtres non-acclimatées, qu'elles soient placées à 21°C, 26°C ou 29°C dans les bassins expérimentaux. L'augmentation de la mortalité chez les huîtres non-acclimatées semble liée aux stress induits par le transfert des animaux d'un bassin à l'autre lors de l'infection. L'importante survie des huîtres non-acclimatées suggère que l'acclimatation à haute température avant l'infection ne paraît pas être nécessaire à l'amélioration de la survie. De tels résultats pourraient résulter de l'induction de protéines de choc thermique telles que les HSPs. En effet des travaux suggèrent que leur induction précoce à hautes températures pourrait participer aux réponses antivirales chez les crevettes infectées par le WSSV et chez *C. gigas* lors de l'infection par OsHV-1 (De la Re Vega et al., 2017; Lin et al., 2011).

Dans notre expérience, les huîtres ont été maintenues aux trois températures testées pendant 14 jours jusqu'à l'arrêt complet des mortalités. De même dans les expériences d'hyperthermie chez les crevettes infectées par le WSSV, les auteurs démontrent un effet bénéfique des hautes températures après 40 jours à 32°C (Granja et al., 2006; Vidal et al., 2001). Nous ne disposons actuellement d'aucune donnée concernant des expositions de courte durée d'invertébrés infectés à haute température.

3. Quand exposer les huîtres aux hautes températures ?

Dans notre expérience, nous avons vu que l'exposition préalable des huîtres aux hautes températures ou en simultanée à l'infection était bénéfique sur la survie. Au contraire, lorsque les animaux sont infectés (en milieu naturel, ou par injection intramusculaire) avant d'être exposés à des hautes températures, l'effet est délétère et les mortalités augmentent avec la température (De Kantzow et al., 2016; Petton et al., 2013). Une expérience complémentaire montre qu'il existe un seuil de non-retour dans l'infection, au-delà duquel il ne semble plus possible d'enrayer la maladie par une exposition à haute température (*Com pers. B. Petton*). Cette durée est particulièrement variable et reste à définir précisément. L'expérience, d'abord réalisée en milieu contrôlé, consisterait à maintenir de jeunes huîtres en cohabitation à 21°C avec des huîtres donneuses de pathogènes préalablement infectées. Toutes les six heures, des huîtres receveuses seraient prélevées et placées à 31°C, et leur survie serait suivie. Dans un second temps réaliser cette expérience avec des huîtres du milieu naturel lors d'un épisode de mortalité serait envisageable. Les données de survie ainsi que de dosage d'ADN viral pourraient être complétées par une approche d'immunohistochimie ciblant les protéines virales sur coupe histologique, ce qui permettrait de connaître les stades d'infection à partir desquels la maladie ne peut plus être stoppée.

4. Des immersions « flash » à haute température ?

L'ensemble de ces résultats montrent des possibilités d'optimisation du protocole d'exposition des huîtres à haute température proposé dans le chapitre 1. La température optimale semble être 31°C et l'acclimatation préalable à cette température n'est pas nécessaire. Cependant, des paramètres nécessitent des précisions comme la durée d'exposition nécessaire pour éliminer tout risque de mortalité et de transmission virale, la persistance des effets bénéfiques sur la survie lors d'une seconde exposition aux pathogènes mais encore la fenêtre temporelle d'exposition.

Afin de répondre au mieux à ces interrogations, des expérimentations simples peuvent être envisagées. Outre des suivis de mortalités qui demandent un long maintien des animaux en laboratoire, il est possible d'évaluer les effets bénéfiques d'un traitement par des mesures d'abondance de biomarqueurs préalablement définis.

En effet, parallèlement aux travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons pu, par une approche de protéomique (par électrophorèse bidimensionnelle), identifier des protéines surreprésentées chez les huîtres infectées à 29°C comparées à celles maintenues à 21°C. Il s'agit de potentiels biomarqueurs qui permettraient d'identifier des conditions bénéfiques pour la survie des huîtres infectées. Huit protéines différenciellement exprimées ont été identifiées. Les anticorps correspondant ont été mis au point pour trois protéines : l'HSP70 B2, accumulée à 29°C, et l'alpha cristalline B et la protéine 14-3-3 epsilon, accumulées à 21°C. Les vérifications d'expression et le protocole d'application sont actuellement en cours de développement.

III. Conclusion

Finalement, les résultats obtenus lors de cette thèse ont permis de mieux comprendre l'effet des hautes températures sur l'interaction hôte-pathogène. Cependant cette étude a principalement été réalisée en milieu contrôlé avec des huîtres nourries *ad libitum* s'affranchissant des variations multiples de l'environnement. Le milieu marin est un environnement ouvert, instable et sujet aux changements climatiques laissant peu de possibilités d'action contre les pathogènes. Les champs d'action futurs consistent à moduler la sensibilité des animaux aux pathogènes par des approches de sélection génétique ou en jouant sur leur « entraînement » face aux stress du milieu naturel. Des approches multi-échelles de la molécule à la production aquacole seront nécessaires à la compréhension de tels systèmes complexes. Des connaissances plus approfondies sur le pathosystème restent à acquérir avant de proposer des mesures de prophylaxie.

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2016. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.
- Allam, B., Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>
- Anderson, R.S., 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 89–96. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)90237-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)90237-2)
- Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Angilletta, M., Niewiarowski, P., Navas, C., 2016. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* 27, 1–2. <https://doi.org/10.2741/E148>
- Arrhenius, S., 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Phys. Chemie* 4U. <https://doi.org/10.1515/zpch-1889-0416>
- Arzul, I., Corbeil, S., Morga, B., Renault, T., 2017. Viruses infecting marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* 147, 118–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.009>
- Bale, J., 1996. Insect cold hardiness: A matter of life and death. *Eur. J. Entomol.* 93, 369–382.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., Travers, M.A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>
- Batista, F.M., López-Sanmartín, M., Grade, A., Morgado, I., Valente, M., Navas, J.I., Power, D.M., Ruano, F., 2015. Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread. *Aquaculture* 435, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.016>
- Bayne, B., 2017. Biology of Oysters, *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803472-9.00001-7>
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 125, 359–369. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00187-X)
- Bhoj, V.G., Chen, Z.J., 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430–437. <https://doi.org/10.1038/nature07959>

- Blatteis, C.M., 2003. Fever: Pathological or physiological, injurious or beneficial? *J. Therm. Biol.* 28, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00034-7)
- Boman, H.G., 1995. Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425>
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J.M., Bather, C., Jonquikres, G., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143–154. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00036-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00036-2)
- Brogden, G., Adamek, M., Proepsting, M.J., Ulrich, R., Naim, H.Y., Steinhagen, D., 2015. Cholesterol-rich lipid rafts play an important role in the *Cyprinid herpesvirus 3* replication cycle. *Vet. Microbiol.* 179, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.024>
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., Krausslich, H.-G., 2006. The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2641–2646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511136103>
- Burge, C.A., Mark Eakin, C., Friedman, C.S., Froelich, B., Hershberger, P.K., Hofmann, E.E., Petes, L.E., Prager, K.C., Weil, E., Willis, B.L., Ford, S.E., Harvell, C.D., 2014. Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 6, 249–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>
- Cabanac, B.Y.M., Guelte, L.L.E., Claude, U., Lyon-sud, F.D.M., 1980. Temperature regulation and prostaglandin E1 fever in scorpion. *J. Physiol.* 303, 365–370.
- Cabanac, M., 1989. Fever in the leech, *Nepheleopsis obscura* (Annelida). *J. Comp. Physiol. B* 159, 281–285. <https://doi.org/10.1007/BF00691506>
- Casterlin, M.E., Reynolds, W., 1980. Fever and Antipyresis in the crayfish *Cambarus Bartoni*. *J. Physiol.* 1, 417–421.
- Casterlin, M.E., Reynolds, W.W., 1977. Behavioral fever in crayfish. *Hydrobiologia* 56, 99–101. <https://doi.org/10.1007/BF00023345>
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J., Ulet, P., 1996. Innate immunity. *New Engl. J. Med. Rev.* 271, 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>

- Chatterjee, B.P., Adhya, M., 2013. Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves. *Mar. Proteins Pept.*, Wiley Online Books. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118375082.ch3>
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.051>
- Cheng, Q., Wang, H., Jiang, S., Wang, L., Xin, L., Liu, C., Jia, Z., Song, L., Zhu, B., 2016. A novel ubiquitin-protein ligase E3 functions as a modulator of immune response against lipopolysaccharide in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 60, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.027>
- Cheng, T., 1996. Hemocytes: forms and functions., in: *The Eastern Oyster Crassostrea Virginica*. College Park, MD, USA, pp. 299–333.
- Clark, M., Thorne, M.A., 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*. *Ecol. Evol.* 3, 3283–3297. <https://doi.org/10.1002/ece3.719>
- Clegg, T.A., Morrissey, T., Geoghegan, F., Martin, S.W., Lyons, K., Ashe, S., More, S.J., 2014. Risk factors associated with increased mortality of farmed Pacific oysters in Ireland during 2011. *Prev. Vet. Med.* 113, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.023>
- Combes, C., Gavotte, L., Moulia, C., Sicard, M., 2018. *Parasitisme*, Dunod. ed. Paris.
- Comps, M., 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 23–37.
- Cong, M., Song, L., Wang, L., Zhao, J., Qiu, L., Li, L., Zhang, H., 2008. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 151, 191–196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.014>
- Corbeil, S., Williams, L.M., Bergfeld, J., Crane, M.S.J., 2012. Abalone herpes virus stability in sea water and susceptibility to chemical disinfectants. *Aquaculture* 326–329, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.031>
- Corporeau, C., Tamayo, D., Pernet, F., Quéré, C., Madec, S., 2014. Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J. Proteomics* 109, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.030>
- Criscitello, M.F., de Figueiredo, P., 2013. Fifty Shades of Immune Defense. *PLoS Pathog.* 9,

- 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003110>
- Crockett, E.L., 1998. Cholesterol Function in Plasma Membranes from Ectotherms: Membrane-Specific Roles in Adaptation to Temperature. *Integr. Comp. Biol.* 38, 291–304. <https://doi.org/10.1093/icb/38.2.291>
- Da Costa, F., Petton, B., Mingant, C., Bougaran, G., Rouxel, C., Quéré, C., Wikfors, G.H., Soudant, P., Robert, R., 2016. Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquac. Nutr.* 22, 813–836. <https://doi.org/10.1111/anu.12301>
- Dame, R., 1972. The Ecological Energies of Growth, Respiration and Assimilation in the Intertidal American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 17, 243–250. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33903>
- Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Fuhrman, J.A., Middelburg, J.J., Noble, R.T., Suttle, C.A., 2011. Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 993–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x>
- Davison, A.J., 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86, 69–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00492-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00492-8)
- Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R.M., Renault, T., 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86, 41–53. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>
- De Kantzow, M., Hick, P., Becker, J., Whittington, R., 2016. Effect of water temperature on mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with microvariant ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 μ Var). *Aquac. Environ. Interact.* 8, 419–428. <https://doi.org/10.3354/aei00186>
- De la Re Vega, E., Sánchez-Paz, A., Gallardo-Ybarra, C., Lastra-Encinas, M.A., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J.M., López-Torres, M.A., Maldonado-Arce, A.D., 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish Shellfish Immunol.* 71, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.079>
- De La Vega, E., Hall, M.R., Degnan, B.M., Wilson, K.J., 2006. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture* 253, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.041>
- de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy,

- M.A., Pérignon, A., Régler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.* 9, 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>
- Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2013. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>
- Delaporte, M., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00518>
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 343, 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.12.021>
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., Samain, J.F., 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567–576. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5006-9>
- Delisle, L., Fuhrmann, M., Quéré, C., Pauletto, M., Pichereau, V., Pernet, F., Corporeau, C., 2018a. The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* is upaccumulated during infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): an Indicator of the Warburg Effect. *Mar. Biotechnol.* 20, 87–97. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9789-x>
- Delisle, L., Pauletto, M., Petton, P., Bargelloni, L., Pernet, F., Fleury, E., Corporeau, C., n.d. High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinders progress of Ostreid herpes virus (OsHV-1) and promotes survival.
- Delisle, L., Petton, B., Burguin, J.-F., Morga, B., Corporeau, C., Pernet, F., 2018b. Temperature modulate disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.056>
- DeWitte-Orr, S.J., Collins, S.E., Bauer, C.M.T., Bowdish, D.M., Mossman, K.L., 2010. An accessory to the “Trinity”: SR-As are essential pathogen sensors of extracellular dsRNA, mediating entry and leading to subsequent type I IFN responses. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000829>
- Dimmioc, N.J., 1967. Differences between the thermal inactivation of picornaviruses at “high”

- and “low” temperatures. *Virology* 31, 338–353. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90179-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90179-1)
- Dobin, A., Gingeras, T.R., 2015. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 51, 11.14.1-11.14.19. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>
- Donaghy, L., Hong, H.K., Jauzein, C., Choi, K.S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.030>
- Du, H.-H., Li, W.-F., Xu, Z.-R., Kil, Z.-S., 2006. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. *Dis. Aquat. Organ.* 71, 175–8. <https://doi.org/10.3354/dao071175>
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dundon, W.G., Arzul, I., Omnes, E., Robert, M., Magnabosco, C., Zambon, M., Gennari, L., Toffan, A., Terregino, C., Capua, I., Arcangeli, G., 2011. Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.005>
- Dziarski, R., Gupta, D., 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-8-232>
- EFSA, 2015. Oyster mortality. *EFSA J.* 13, 4122. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4122>
- EFSA, 2010. Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters. *Eur. Food Saf. Auth. J.* 8, 1–60. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1894>.
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
- Epelboin, Y., Quéré, C., Pernet, F., Pichereau, V., Corporeau, C., 2015. Energy and Antioxidant Responses of Pacific Oyster Exposed to Trace Levels of Pesticides. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1831–1841. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00269>
- Evans, S.S., Repasky, E.A., Fisher, D.T., 2015. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Publ. Gr.* 15, 335–349. <https://doi.org/10.1038/nri3843>

- Fagain, C.O., 1997. Protein Stability and Stabilization of Protein Function, Landes Bio. ed. Georgetown.
- FAO, 2016. Rapport FAO 2016, La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, G., Foster, W.S., 1972. Oyster Herpes-Type Virus. Science (80-). 178, 759 LP-760.
- Feder, M., Hofmann, G., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243–282.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am Fish Soc Spe 18, 153–138.
- Fisher, W.S., 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function, Suppl. Pub. ed.
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray Analysis Highlights Immune Response of Pacific Oysters as a Determinant of Resistance to Summer Mortality. Mar. Biotechnol. 14, 203–217. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9403-6>
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>
- Frederich, M., Pörtner, H.O., 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 279, R1531–R1538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1531>
- Friedman, C.S., Cherr, G.N., Clegg, J.S., Hamdoun, A. H., Jacobsen, J.L., Jackson, S. A., & Uhlinger, K.R., 1999. Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 18, 297.
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C., Pernet, F., 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. Biol. Open 7, bio028134. <https://doi.org/10.1242/bio.028134>
- Fuhrmann, M., Petton, B., Quillien, V., Faury, N., Morga, B., Pernet, F., 2016. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Aquac. Environ. Interact. 8, 543–552. <https://doi.org/10.3354/aei00197>

- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T., 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.* 42, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-73>
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J.L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53, 187–196. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9>
- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J.L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>
- GIEC, 2018.
- Gilchrist, G.W., 1995. Specialists and Generalists in Changing Environments. I. Fitness Landscapes of Thermal Sensitivity. *Am. Nat.* 146, 252–270. <https://doi.org/10.1086/285797>
- Gittenberger, A., Voorbergen-Laarman, M.A., Engelsma, M.Y., 2016. Ostreid herpesvirus OsHV-1 μ Var in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *J. Fish Dis.* 39, 105–109. <https://doi.org/10.1111/jfd.12332>
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.C., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.075>
- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragon, L., Salazar, M., 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Dis. Aquat. Organ.* 54, 73–78. <https://doi.org/10.3354/dao054073>
- Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, G., Salazar, M., 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Organ.* 68, 175–180. <https://doi.org/10.3354/dao068175>
- Green, T.J., Helbig, K., Speck, P., Raftos, D.A., 2016. Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Mol. Immunol.* 78, 113–120.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.09.002>

- Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051>
- Green, T.J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N., Speck, P., 2014a. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.026>
- Green, T.J., Raftos, D., Speck, P., Montagnani, C., 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *J. Gen. Virol.* 96, 2471–2482. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244>
- Green, T.J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O'Connor, W., Speck, P., 2014b. Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Res.* 110, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.010>
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. du Cons. Int. pour l'Exploration la Mer* 47, 399–403.
- Gu, F., Paillard, C., Pernet, F., Richard, G., Guérard, F., Corporeau, C., Lambert, C., Paillard, C., Pernet, F., 2016. Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Dev. Comp. Immunol.* 60, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.026>
- Guan, Y., Yu, Z., Li, C., 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 257–260. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00068-5)
- Guderley, H., Kraffe, E., Bureau, W., Bureau, D.P., 2008. Dietary fatty acid composition changes mitochondrial phospholipids and oxidative capacities in rainbow trout red muscle. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 178, 385–399. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0231-y>
- Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.G., Franck, V., Philippe, B., Evelyne, B., 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol. Immunol.* 46, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.021>
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguier, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139–145. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01149-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01149-6)

- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P., Bachère, E., 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 313–323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510850200>
- Guo, X., Ford, S.E., 2016. Infectious diseases of marine mollusks and host responses as revealed by genomic tools. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0206>
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., Jouaux, A., 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.018>
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169. <https://doi.org/Doi10.2307/1543236>
- Harvell, C., Mitchell, C., Ward, J., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* (80-.). 296, 2158–2163. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Hayward, S.A.L., Murray, P.A., Gracey, A.Y., Cossins, A.R., 2007. Beyond the Lipid Hypothesis, in: *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19–42. <https://doi.org/Doi10.1146/Annurev.Ph.57.030195.000315>
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S.E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., Guo, X., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.023>
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: Aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 293, 249–265. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00235-1)
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.014>

- Helmuth, B., 2002. How do we Measure the Environment? Linking Intertidal Thermal Physiology and Ecology Through Biophysics. *Integr. Comp. Biol.* 42, 837–845. <https://doi.org/10.1093/icb/42.4.837>
- Helmuth, B.S.T., 1998. Intertidal Mussel Microclimates: Predicting The Body Temperature of a Sessile Invertebrate. *Ecol. Monogr.* 68, 51–74. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1998\)068\[0051:IMMPTB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1998)068[0051:IMMPTB]2.0.CO;2)
- Hine, P., Wesney, B., Hay, B., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12, 135–142.
- Hochachka, P., Somero, G., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution., Oxford Uni. ed.
- Hofmann, G.E., Todgham, A.E., 2010. Living in the Now: Physiological Mechanisms to Tolerate a Rapidly Changing Environment. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 127–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135900>
- Honess, R.W., Roizman, B., 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14, 8–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1276>
- Huey, R.B., Kingsolver, J.G., 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends Ecol. Evol.* 4, 131–135. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90211-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90211-5)
- Hulbert, A.J., 2007. Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids* 42, 811–819. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3058-0>
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 2000. Mechanisms Underlying the Cost of Living in Animals. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 207–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.207>
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199, 257–274. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1999.0955>
- Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.008>
- Hwang, J.Y., Park, J.J., Yu, H.J., Hur, Y.B., Arzul, I., Couraleau, Y., Park, M.A., 2013. Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *J. Fish Dis.* 36, 969–972. <https://doi.org/10.1111/jfd.12093>
- Itoh, N., Takahashi, K.G., 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in

- the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 150, 409–417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.011>
- Itoh, N., Xue, Q.G., Li, Y., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2007. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Fish Shellfish Immunol. 23, 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.006>
- Itoh, N., Xue, Q.G., Schey, K.L., Li, Y., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2011. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 158, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.06.006>
- Jackson, S.A., Uhlinger, K.R., Clegg, J.S., 2011. Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of hsp/hsc70 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 317, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.004>
- Jenkins, C., Hick, P., Gabor, M., Spiers, Z., Fell, S., Gu, X., Read, A., Go, J., Dove, M., O'Connor, W., Kirkland, P., Frances, J., 2013. Identification and characterization of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. Dis. Aquat. Organ. 105, 109–126. <https://doi.org/doi.org/10.3354/dao02623>
- Jiravanichpaisal, P., Soderhall, K., Soderhall, I., So, K., So, I., 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish Shellfish Immunol. 17, 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.03.010>
- Jouaux, A., Lafont, M., Blin, J.-L., Houssin, M., Mathieu, M., Lelong, C., 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. BMC Genomics 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-590>
- Kassahn, K.S., Crozier, R.H., Pörtner, H.O., Caley, M.J., 2009. Animal performance and stress: Responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. Biol. Rev. 84, 277–292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x>
- Kilpatrick, D.C., 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1572, 187–197. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00308-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00308-2)
- Kluger, M.J., 1979. Fever in ectotherms: Evolutionary implications. Integr. Comp. Biol. 19, 295–304. <https://doi.org/10.1093/icb/19.1.295>
- Kooijman, S.A.L.M., 2009. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation, third edition. Dyn. Energy Budg. Theory Metab. Organ. Third Ed. 1–514.

<https://doi.org/10.3867/j.issn.1000-3002.2017.04.008>

- Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217.
- Kurtz, J., Franz, K., 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425, 37.
- Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pauletto, M., Segarra, A., Gourbal, B., Montagnani, C., 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13564-0>
- Lagerspetz, K.Y.H., Vainio, L.A., 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81, 237–258. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006998>
- Lam, V.W.Y., Cheung, W.W.L., Reygondeau, G., Rashid Sumaila, U., 2016. Projected change in global fisheries revenues under climate change. *Sci. Rep.* 6, 6–13. <https://doi.org/10.1038/srep32607>
- Le Deuff, R.M., Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpesvirus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J Gen Virol* 80, 1317–1322. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1317>
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., Le Roux, F., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* 9, 1523–1531. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233>
- Li, M., Qiu, L., Wang, L., Wang, W., Xin, L., Li, Y., Liu, Z., Song, L., 2016. The inhibitory role of γ -aminobutyric acid (GABA) on immunomodulation of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 52, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.015>
- Lin, Y.-R., Hung, H.-C., Leu, J.-H., Wang, H.-C., Kou, G.-H., Lo, C.-F., 2011. The Role of Aldehyde Dehydrogenase and Hsp70 in Suppression of White Spot Syndrome Virus Replication at High Temperature. *J. Virol.* 85, 3517–3525. <https://doi.org/10.1128/JVI.01973-10>
- Little, T.J., Kraaijeveld, A.R., 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 19, 58–60. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011>
- Little, T.J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., Read, A.F., 2003. Maternal transfer of strain specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* 13, 489–492. <https://doi.org/10.1016/S>
- Liu, Z., Zhou, Z., Jiang, Q., Wang, L., Yi, Q., Qiu, L., Song, L., 2017. The neuroendocrine immunomodulatory axis-like pathway mediated by circulating haemocytes in pacific

- oyster *Crassostrea gigas*. Open Biol. 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.160289>
- Logue, J.A., de Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R., 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. J. Exp. Biol. 203, 2105–15. <https://doi.org/10.1086/605955>
- Lowe, G.A., 1974. Effect of temperature change on the heart rate of *Crassostrea gigas* and *Mya arenaria* (Bivalvia). Proc. Malac. Soc. Lond. 41, 29–36.
- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 28, 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.008>
- Lynch, S.A., Carlsson, J., O'Reilly, A.J., Cotter, E., Culloty, S.C., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. Parasitology 139, 1526–1532. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0031182012000881>
- Mårdberg, K., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., 2002. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. J. Gen. Virol. 83, 291–300. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-291>
- Martenot, C., Denechère, L., Hubert, P., Metayer, L., Oden, E., Trancart, S., Travaillé, E., Houssin, M., 2015. Virulence of Ostreid herpesvirus 1 μ Var in sea water at 16 ° C and 25 ° C 439, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.012>
- Martenot, C., Gervais, O., Chollet, B., Houssin, M., Renault, T., 2017. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. PLoS One 12, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177448>
- Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J.P., Houssin, M., 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. Virus Res. 160, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.012>
- Martenot, C., Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Houssin, M., Renault, T., 2016. In situ localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. 136, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.04.002>
- Martinez, V.G., Moestrup, S.K., Holmskov, U., Mollenhauer, J., Lozano, F., 2011. The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. Pharmacol. Rev. 63, 967–1000. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004523>

- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.-F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 163, 221–234. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90051-B](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90051-B)
- McCallum, H.I., Kuris, A., Harvell, C.D., Lafferty, K.D., Smith, G.W., Porter, J., 2004. Does terrestrial epidemiology apply to marine systems? *Trends Ecol. Evol.* 19, 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.08.009>
- McTaggart, S.J., Wilson, P.J., Little, T.J., Lett, B., Supplement, D., McTaggart, S.J., Wilson, P.J., 2012. *Daphnia magna* shows reduced infection upon secondary exposure to a pathogen 972–975. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0581>
- Meistertzheim, A., Tanguy, A., Moraga, D., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress 274, 6392–6402. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06156.x>
- Metcalf, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 33, 363–364. <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>
- Migdal, C., Serres, M., 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Medecine/Sciences* 27, 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Milutinović, B., Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. *Semin. Immunol.* 28, 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004>
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 2), 4233–42.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noël, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzet, M., Roch, P., 2000a. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1), 2759–2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000b. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Mojica, K.D.A., Brussaard, C.P.D., 2014. Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 495–515. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12343>
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.016>

- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., Escoubas, J.-M., 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett.* 500, 64–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02559-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02559-5)
- Montes, J.F., Durfort, M., García-Valero, J., 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus sp.* *Cell Tissue Res.* 279, 529–538. <https://doi.org/10.1007/BF00318165>
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.A., Rubinsztein, D.C., Renault, T., 2015. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* 11, 516–526. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188>
- Moret, Y., Schmid-hempel, P., Moret, Y., Schmid-hempel, P., 2014. Survival for Immunity : The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers 1166, 1166–1169. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1166>
- Morga, B., Faury, N., Guesdon, S., Chollet, B., Renault, T., 2017. Haemocytes from *Crassostrea gigas* and OsHV-1: A promising in vitro system to study host/virus interactions. *J. Invertebr. Pathol.* 150, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.09.007>
- Mortensen, S., Strand, Å., Bodvin, T., Alfjorden, A., CK, S., Jelmert, A., Aspán, A., Sælemyr, L., LJ, N., Albretsen, J., 2016. Summer mortalities and detection of ostreid herpesvirus microvariant in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway . *Dis. Aquat. Organ.* 117, 171–176.
- Nicolas, J.L., Comps, M., Cochenne-Laureau, N., 1992. Herpes-like Virus Infecting Pacific-Oyster Larvae, *Cassostrea Gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*
- OIE, 2018. Infection With Ostreid Herpesvirus 1 Microvariants, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- Olicard, C., Didier, Y., Marty, C., Bourgougnon, N., Renault, T., 2005. In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 141–147. <https://doi.org/10.3354/dao067141>
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 249–62. <https://doi.org/10.3354/dao059249>
- Parent, G.J., Pernet, F., Tremblay, R., Sévigny, J.M., Ouellette, M., 2008. Remodeling of membrane lipids in gills of adult hard clam *Mercenaria mercenaria* during declining temperature. *Aquat. Biol.* 3, 101–109. <https://doi.org/10.3354/ab000073>

- Parry, H.E., Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 69, 311–325. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.003>
- Parry, L., Dixon, P., 1997. Stability of nine viral *Haemorrhagic septicaemia virus* (VHSV) isolate in seawater. *Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17, 31–36.
- Pasquier, C., Bertagnoli, S., Dunia, D., Izopet, J., 2013. *Virologie humaine et zoonoses*, Dunod. ed.
- Paul-Pont, I., Dhand, N., Whittington, R., 2013. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Dis. Aquat. Organ.* 105, 127–138. <https://doi.org/10.3354/dao02615>
- Paul-Pont, I., Evans, O., Dhand, N.K., Rubio, A., Coad, P., Whittington, R.J., 2014. Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture* 422–423, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.009>
- Peeler, E.J., Allan Reese, R., Cheslett, D.L., Geoghegan, F., Power, A., Thrush, M.A., 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Prev. Vet. Med.* 105, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.02.001>
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.F., Keck, N., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* 2, 215–237. <https://doi.org/10.3354/aei00041>
- Pernet, F., Fuhrmann, M., Petton, B., Mazurié, J., Bouget, J.F., Fleury, E., Daigle, G., Gernez, P., 2018. Determination of risk factors for herpesvirus outbreak in oysters using a broad-scale spatial epidemiology framework. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29238-4>
- Pernet, F., Lagarde, F., Gall, P. Le, D'Orbcastel, E.R., 2014a. Associations between farming practices and disease mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a Mediterranean lagoon. *Aquac. Environ. Interact.* 5, 99–106. <https://doi.org/10.3354/aei00096>
- Pernet, F., Lagarde, F., Jeanné, N., Daigle, G., Barret, J., Le Gall, P., Quere, C., D'orbcastel, E.R., 2014b. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088469>
- Pernet, F., Lupo, C., Bacher, C., Whittington, R.J., 2016. Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371,

20150213. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0213>

- Pernet, F., Petton, B., Tamayo, D., 2013. Effet de traitements thermiques sur la résistance du naissain d'huître creuse au phénomène de mortalité massive.
- Pernet, F., Tamayo, D., Fuhrmann, M., Petton, B., n.d. Balancing disease resistance, growth and energetics in oysters (in prep).
- Pernet, F., Tamayo, D., Petton, B., 2015. Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* 445, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.010>
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *J. Exp. Biol.* 210, 2999–3014. <https://doi.org/10.1242/jeb.006007>
- Pernet, F., Tremblay, R., Redjah, I., Sevigny, J.-M.J.-M., Gionet, C., 2008. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 211, 969–977. <https://doi.org/10.1242/jeb.014639>
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., Pernet, F., 2015a. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 6, 205–222. <https://doi.org/10.3354/aei00125>
- Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., Le Roux, F., 2015b. *Crassostrea gigas* mortality in France: The usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686>
- Petton, B., De Lorgeril, J., Mitta, G., Le Roux, F., Daigle, G., Pernet, F., Alunno-Bruscia, M., n.d. Fine-scale temporal dynamics of a polymicrobial infection in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using an ecologically-realistic method of pathogenesis. prep.
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., Boudry, P., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 3, 257–273. <https://doi.org/10.3354/aei00070>
- Pilder, S., Logan, J., Shenk, T., 1984. Deletion of the Gene Encoding the Adenovirus 5 Early Region 52, 664–671.
- Ponce de Leon, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., 1977. Ribonucleotide reductase from herpes simplex virus (types 1 and 2) infected and uninfected KB cells: properties of the partially purified enzymes. *J Gen Virol* 36, 163–173.

- Pörtner, H., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s001140100216>
- Pörtner, H.-O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.O., Mark, F.C., Bock, C., 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.011>
- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Sanz, V.A., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P., Nauwynck, H.J., 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261, 842–849. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.007>
- Rakus, K., Ronsmans, M., Vanderplasschen, A., 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.027>
- Renaud, F., 2014. Quand l’homme favorise les épidémies. *Le J. CNRS*.
- Renault, T., Bouquet, A.L., Maurice, J.T., Lupo, C., Blachier, P., 2014. Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: Relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5419–5426. <https://doi.org/10.1128/AEM.00484-14>
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K., 2011. Suppression substructive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.02.004>
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenec, N., Gerard, A., 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 173–183. <https://doi.org/10.3354/dao042173>
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J.-F., Segarra, A., Webb, S., 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *J. Virol.* 86, 5942–5947. <https://doi.org/10.1128/JVI.06534-11>
- Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* 17, 394–409. <https://doi.org/10.1051/alr>

- Richetta, C., Faure, M., 2013. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cell. Microbiol.* 15, 368–376. <https://doi.org/10.1111/cmi.12043>
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Rodbard, D., Wachslight-Rodbard, H., Rodbard, S., 1980. Temperature: A Critical Factor Determining Localization and Natural History of Infectious, Metabolic, and Immunological Diseases. *Perspect. Biol. Med.* 23, 439–474.
- Roque, A., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Gairin, I., Rodgers, C.J., Furones, M.D., 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324–325, 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.018>
- Rosani, U., Varotto, L., Domeneghetti, S., Arcangeli, G., Pallavicini, A., Venier, P., 2015a. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 17, 4200–4212. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12706>
- Rosani, U., Varotto, L., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., 2015b. IL-17 signaling components in bivalves: Comparative sequence analysis and involvement in the immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 52, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.001>
- Rosani, U., Venier, P., 2017. Oyster RNA-seq data support the development of *Malacoherpesviridae* genomics. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01515>
- Ruggeri, B., Thoroughgood, C., 1985. Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 301–306. <https://doi.org/10.3354/meps023301>
- Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., 2006. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Curr. Biol.* 16, 1206–1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Samain, J.F., McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oyster. *Crassostrea gigas*.
- Sanchez, E.L., Lagunoff, M., 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology* 479–480, 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.038>
- Sauvage, C., Pépin, J.F., Lapègue, S., Boudry, P., Renault, T., Franc, J., Lapègue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA

- detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 142, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.013>
- Schikorski, D., Faury, N., Pépin, J.F., Saulnier, D., Tourbiez, D., Renault, T., 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.* 155, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.031>
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 41, 91–101. <https://doi.org/10.1080/00288330709509898>
- Segarra, A., 2015. Étude des interactions hôte / virus chez l' huître creuse, *Crassostrea gigas* , et son virus Ostreid herpesvirus 1 To cite this version : HAL Id : tel-01192622 Etude des interactions hôte / virus chez l' huître creuse *Crassostrea gigas* et son virus Ostr.
- Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Tourbiez, D., Renault, T., 2015. Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *J. Invertebr. Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.013>
- Segarra, A., Faury, N., Pépin, J.F., Renault, T., 2014a. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J. Invertebr. Pathol.* 119, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.002>
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2014b. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 15, 580. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-580>
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 153, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>
- Seo, J.K., Lee, M.J., Go, H.J., Kim, G. Do, Jeong, H. Do, Nam, B.H., Park, N.G., 2013. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* 53, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.003>
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous Adaptation-A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 522–525. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
- Smolowitz, R., Leavitt, D., Perkins, F., 1998. Observations of a Protistan Disease Similar to

- QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the Coast of Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 9–25. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4706>
- Somero, G.N., 2002. Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals : Optima , Limits , and Costs of Living. *Integr. Comp. Biol.* 42, 780–789. <https://doi.org/10.1093/icb/42.4.780>
- Spear, P.G., 2004. Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.* 6, 401–410. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x>
- Spear, P.G., Longnecker, R., 2003. Herpesvirus Entry: an Update. *J. Virol.* 77, 10179–10185. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10179-10185.2003>
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., Florin, L., 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003313>
- Stanley-Samuelson, D., 1987. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. *Biol. Bull.* 173, 92–109.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Brazilian J. Med. and Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220, 214–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00562.x>
- Tamayo, D., Corporeau, C., Petton, B., Quere, C., Pernet, F., 2014. Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 μ Var. *Aquaculture* 432, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.023>
- Thomas, M., Blanford, S., 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* 18, 344–350. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00069-7)
- Thomas, Y., Pouvreau, S., Alunno-Bruscia, M., Barillé, L., Gohin, F., Bryère, P., Gernez, P., 2016. Global change and climate-driven invasion of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) along European coasts: A bioenergetics modelling approach. *J. Biogeogr.* 43, 568–579. <https://doi.org/10.1111/jbi.12665>
- Tomanek, L., 2008. The Importance of Physiological Limits in Determining Biogeographical Range Shifts due to Global Climate Change: The Heat-Shock Response. *Physiol.*

- Biochem. Zool. 81, 709–717. <https://doi.org/10.1086/590163>
- Van Spriel, A.B., Figdor, C.G., 2010. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 12, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.11.001>
- Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, F., Brock, J.A., Salazar, M., 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.* 32, 364–372. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00462.x>
- Wang, L., Song, X., Song, L., 2018. The oyster immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 80, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025>
- Wang, X., Wang, L., Zhang, H., Ji, Q., Song, L., Qiu, L., Zhou, Z., Wang, M., Wang, L., 2012. Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1016–1026. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.026>
- Ward, J., Lafferty, K., 2004. The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing? *PLoS Biol.* 2, 542–547. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020120>
- Williams, E., Somero, G., 1996. Seasonal-, tidal-cycle- and microhabitat-related variation in membrane order of phospholipid vesicles from gills of the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *J Exp Biol* 199, 1587–1596.
- Woese, C., 1960. Thermal Inactivation of Animal Viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 83, 741–751. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40943.x>
- Wu, X., Xiong, H., Wang, Y., Du, H., 2015. Immunomodulatory effects of hyperthermia on resisting WSSV infection in *Procambarus clarkii*. *J. Fish Dis.* 38, 567–574. <https://doi.org/10.1111/jfd.12268>
- Xie, N., Huang, K., Zhang, T., Lei, Y., Liu, R., Wang, K., Zhou, S., Li, J., Wu, J., Wu, H., Deng, C., Zhao, X., Nice, E.C., Huang, C., 2012. Comprehensive proteomic analysis of host cell lipid rafts modified by HBV infection. *J. Proteomics* 75, 725–739. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.011>
- Xue, Q., Renault, T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 155–163. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4965>
- You, X. xin, Su, Y. quan, Mao, Y., Liu, M., Wang, J., Zhang, M., Wu, C., 2010. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected

- Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture* 305, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.024>
- Young, T., Kesarcodi-Watson, A., Alfaro, A.C., Merien, F., Nguyen, T. V., Mae, H., Le, D. V., Villas-Bôas, S., 2017. Differential expression of novel metabolic and immunological biomarkers in oysters challenged with a virulent strain of OsHV-1. *Dev. Comp. Immunol.* 73, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.025>
- Yu, J.H., Song, J.H., Choi, M.C., Park, S.W., 2009. Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Macra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). *J. Invertebr. Pathol.* 102, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.002>
- Yu, Y., Clippinger, A.J., Alwine, J.C., 2011. Viral effects on metabolism: Changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* 19, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.002>
- Zbikowska, E., Cichy, A., Papierkiewicz, D., 2013. Viral pyrogen affects thermoregulatory behavior of wintering *Planorbarius corneus* (L.) snails (Mollusca: Gastropoda). *J. Therm. Biol.* 38, 543–547. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2013.09.007>
- Zhang, G., 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., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., Song, L., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 141–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015>
- Zhang, Li, L., Guo, X., Litman, G.W., Dishaw, L.J., Zhang, G., 2015a. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci. Rep.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep08693>
- Zhang, Li, L., Zhang, G., 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.023>

Zhang, Sun, J., Mu, H., Li, J., Zhang, Y., Xu, F., Xiang, Z., Qian, P.-Y., Qiu, J.-W., Yu, Z., 2015b. Proteomic Basis of Stress Responses in the Gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteome Res.* 14, 304–317. <https://doi.org/10.1021/pr500940s>

Annexes

Annexe 1

Marine Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s10126-017-9789-x>

ORIGINAL ARTICLE



The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* Is Upaccumulated During Infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): an Indicator of the Warburg Effect

Lizenn Delisle^{1,2} · Marine Fuhrmann¹ · Claudie Quéré¹ · Marianna Pauletto³ · Vianney Pichereau⁴ · Fabrice Pernet¹ · Charlotte Corporeau¹

Received: 12 July 2017 / Accepted: 7 December 2017
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Voltage-dependent anion channel (VDAC) is a key mitochondrial protein. VDAC drives cellular energy metabolism by controlling the influx and efflux of metabolites and ions through the mitochondrial membrane, playing a role in its permeabilization. This protein exerts a pivotal role during the white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, through its involvement in a particular metabolism that plays in favor of the virus, the Warburg effect. The Warburg effect corresponds to an atypical metabolic shift toward an aerobic glycolysis that provides energy for rapid cell division and resistance to apoptosis. In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the Warburg effect occurs during infection by Ostreid herpesvirus (OsHV-1). At present, the role of VDAC in the Warburg effect, OsHV-1 infection and apoptosis is unknown. Here, we developed a specific antibody directed against *C. gigas* VDAC. This tool allowed us to quantify the tissue-specific expression of VDAC, to detect VDAC oligomers, and to follow the amount of VDAC in oysters deployed in the field. We showed that oysters sensitive to a mortality event in the field presented an accumulation of VDAC. Finally, we propose to use VDAC quantification as a tool to measure the oyster susceptibility to OsHV-1 depending on its environment.

Keywords Voltage-dependent anion channel · Warburg effect · *Crassostrea gigas* · Ostreid herpes virus

Introduction

Since 2008, massive mortality events of young oysters *C. gigas* have been reported in France (Miossec et al. 2009; EFSA 2010;

Barbosa Solomieu et al. 2015; Pernet et al. 2016). These mortality events are associated with the infection of oysters with a newly described genotype (μ Var) of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Segarra et al. 2010). A causal relationship between OsHV-1 and oyster mortality has been established (Schikorski et al. 2011; EFSA 2015). OsHV-1 is a double-strand DNA virus which belongs to Malacoherpesviridae family (Davison 2005; Segarra et al. 2010) and is now distributed along the European coastline from Portugal to Scandinavia, and closely related variants have been detected in Australia, New Zealand, and Asia (EFSA 2015; Barbosa Solomieu et al. 2015; Pernet et al. 2016). Mortalities of juveniles range from 40 to 100%, resulting in huge losses in Pacific oyster production (Pernet et al. 2012; Dégremont 2013).

To date, there is only limited data on how OsHV-1 interacts with its host, and the pathogenesis of the disease is not completely understood. The first study of this interaction, used global protein expression profiling to investigate the oyster cellular response to OsHV-1 infection, was carried out in 2014 (Corporeau et al. 2014). This study demonstrated that during early stages of infection (2 days after injection), several

✉ Lizenn Delisle
 Lizenn.Delisle@ifremer.fr

¹ Ifremer, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), 29280 Plouzané, France

² Ifremer, Laboratoire de physiologie des invertébrés (LPI), Unité de physiologie fonctionnelle des organismes marins (PFOM), Centre Ifremer de Bretagne, 1625 Route de Saint Anne, CS 10070, 29280 Plouzané, France

³ Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy

⁴ Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), 29280 Plouzané, France

Published online: 17 January 2018



biological pathways were modulated and that infected oysters exhibited an increased glycolysis and accumulation of the protein voltage-dependent anion channel (Cg-VDAC) that reflected a “Warburg effect” (Corporeau et al. 2014). Recently, Li et al. further illustrated the upregulation of the Cg-VDAC transcript in hemolymph of OsHV-1 infected oysters (Li et al. 2016).

The Warburg effect was first described by Otto Warburg in the 1930s in cancer cells (Warburg 1956), and partly results from deregulation of cellular energy pathways (Poliseno 2012). Cells experiencing the Warburg effect show a metabolic shift toward an “aerobic glycolysis,” which presents several benefits to support the high energy and macromolecular synthesis requirement in rapidly dividing cells (Pedersen 2007; Vander Heiden et al. 2009; Puyraimond-Zemmour and Vignot 2013). Several human viruses reprogram the host energy metabolism toward the Warburg effect to support the biosynthesis of viral building blocks (Mesri et al. 2014): human papillomavirus (HPV) (Guo et al. 2014), human cytomegalovirus (HCMV; β -herpesvirus) (Munger et al. 2006), Kaposi’s sarcoma herpesvirus (KSHV) (Delgado et al. 2010), or hepatitis C virus (Diamond et al. 2010).

To date, the Warburg effect has been shown to occur in the shrimp *Litopenaeus vannamei* as a metabolic shift that provides cellular energy and building blocks during the replication phase of the white spot syndrome virus (WSSV) (Chen et al. 2011; Su et al. 2014). The WSSV infection is a lethal disease that can cause up to 100% mortality in 10 days (Chen et al. 2011; Su et al. 2014). In *Litopenaeus vannamei*, the Warburg effect is an essential component of the host-viral interaction, providing essential energy for successful WSSV viral replication (Wang et al. 2010; Su et al. 2014).

The voltage-dependent anion channel (VDAC) is a mitochondrial protein that plays a pivotal role in normal cells, but is also involved in the Warburg effect, occurring with cancer and viral infection in mammals. In normal cells, VDAC is a major membrane protein located in the mitochondrial outer membrane that controls metabolism and apoptosis, and it is considered as a multiple stress sensor, being an apoptotic checkpoint during stress and pathological conditions (Lemasters and Holmuhamedov 2006; Martel et al. 2014; Brahim-Horn et al. 2015). The VDAC pore mediates the transport of metabolites such as ADP, ATP and NADH, ions, and even larger molecules up to 4–6 kDa (Rostovtseva et al. 2002; Naghdi and Hajnóczky 2016). This channel is a key protein that drives cellular energy metabolism by controlling the influx and efflux of metabolites and ions, and participates in mitochondrial membrane permeabilization (Martel et al. 2014). VDAC acts as a platform for many proteins supporting glycolysis and prevents apoptosis by interacting with hexokinase, or members of the Bcl-2 family, respectively. VDAC is thus involved

in the metabolic reprogramming of cancer cells toward the Warburg effect (Mazure 2017). In shrimp, when the expression of VDAC is silenced by RNA interference (RNAi) before WSSV infection, the mortality decreases by 50%, the detection of WSSV DNA drop markedly, and the Warburg effect does not occur (Wang et al. 2010; Chen et al. 2011). The accumulation of VDAC during infection has also been reported in some other species including the flounder *Paralichthys olivaceus* infected with the *Scophthalmus maximus* rhabdovirus (Lü et al. 2007), and during Grass carp hemorrhagic disease in the grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Shen et al. 2014). In *Crassostrea gigas* infected by OsHV-1, both the mRNA (Renault et al. 2011; Li et al. 2016) and the protein VDAC (Corporeau et al. 2014; Young et al. 2017) were upaccumulated during the infection processes linked with the metabolic shift toward the Warburg effect (Young et al. 2017).

In this context, characterizing the Cg-VDAC protein and quantifying its accumulation becomes a key component for following OsHV-1 infection processes in oyster. VDAC was recently described in oyster (Li et al. 2016). Like other invertebrates, oysters have only one type of VDAC. Cg-VDAC clustered into the group of VDAC 2, strongly conserved gene from cnidarians to mammals. This study showed that VDAC transcripts were expressed during all oyster developmental stages and in all tissues at adult stage.

As a first step toward the study of VDAC functioning in infection processes of *C. gigas*, the objectives of the present study are as follows: (1) producing and validating a specific antibody directed against *C. gigas* VDAC, (2) analyzing VDAC tissue-specific expression and electrophoretic profiles, and finally (3) assessing the VDAC amount in oysters exposed to OsHV-1 in the field.

Materials and Methods

Experimental Design

Ethics Statement

The Pacific oyster, *C. gigas*, used in this study is a marine-cultured animal and cultured in the Ifremer facilities in Argenton (Brittany, France; 48° 34' 30" N, 4° 36' 18" W). All of the experiments were conducted according to local and national regulations. Permission for deploying oysters outside of farming areas was issued by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development, dept. of maritime affairs, in February 2013. For locations within farming areas, the owner of the farm gave permission to conduct the study on this site. The present field studies did not involve endangered or protected species.

Expt 1. Validation of a Specific Antibody Directed Against *C. gigas* VDAC and Tissue-Specific Analysis of VDAC

Specific-pathogen-free (SPF) oysters were produced according to Petton et al. (2015). Spawning occurred on 18 August 2014 (cohort NSI 01/15) in Ifremer facilities in Argenton (Brittany, France; 48° 34' 30" N, 4° 36' 18" W). The fecundation rates were up to 90%. The embryos developed in 150 L tanks at 21 °C for 48 h, and D-larvae were transferred to flow-through rearing systems at 25 °C. After 15 days, competent larvae were collected and allowed to settle in downwellers. On 6 October 2014, oysters were transferred to Ifremer facilities in Bouin (46° 57' N–2° 02' O). Before being transferred to Ifremer facilities in Argenton, oysters were deployed in farming area located in the Bay of Brest at Pointe du Chateau (48° 20' 06.19" N, 4° 19' 06.37" W) for 11 months since 5 March 2015 (Petton et al. 2013). Oysters were sampled on 15 February 2016. The flesh of 16 oysters were pooled, flash-frozen, crushed, and stored in liquid nitrogen for further validation of the antibody. The mantle, gills, digestive gland, labial palp, striated and smooth adductor muscle, heart, and visceral ganglia were carefully dissected from 50 oysters on ice, immediately flash-frozen in liquid nitrogen, pooled together by tissues, crushed, and stored in liquid nitrogen.

Expt 2. Quantification of the Protein VDAC in Oysters Exposed to OshV-1 in the Field

Specific-pathogen-free (SPF) oysters were produced according to Petton et al. (Petton et al. 2015). Animals were reared under controlled conditions until the age of 8 months (mean individual wet mass = 0.51 g). The oysters were screened for the herpesvirus by qPCR at the different stages of production, and it was undetected in all cases. These SPF oysters (also called "sentinel oysters") were deployed at 46 sites located along an inshore-offshore gradient in the Mor-Braz area, South Brittany (France). This deployment took place before the start of a disease-induced mortality event on 8 April 2013 that lasted for 171 days until 26 September 2013 (Pemet et al. in prep). At each site, 16 small mesh bags containing 85 individual oysters were grouped in one big mesh bag. These bags were attached to iron tables for the sites situated in the intertidal farming area or immersed vertically at 2 m depth and attached to a mooring point for the sites in the offshore area. The oysters were sampled 15 times at each site at low tide slack water \pm 2 h. Upon arrival in the laboratory, live and dead oysters were counted to evaluate survival. Individual shell length and wet mass were measured on a sub-sample of 25 live oysters per bag. The soft tissues of these oysters were removed from the shells, pooled together, dipped into liquid nitrogen, and stored at -80 °C until laboratory analyses. Western blot analyses were conducted on samples collected at two inshore sites located within the oyster farming area

where mortality occurred the earliest between 7 and 14 June (sites 37 and 39, Fig. 1), at two offshore sites where mortality occurred later, from 6 to 14 July (sites 33 and 38), and at two sites where no mortality occurred (sites 32 and 36). Analyses were conducted on samples collected before (30 April and 27 May), at the onset (7 and 14 June) and during the earliest mortality event (20 June).

Total Protein Extraction

Total protein extraction was performed using 1 g of oyster powder (flesh or tissues) that was homogenized with a Polytron® PT 2500 E (Kinematica). Proteins were solubilized during 40 min at 4 °C by adding 5 mL of lysis buffer (Guévelou et al. 2013) (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, and 0.5% Igepal; pH 7.4 at 4 °C) containing phosphatase and protease inhibitors (1% of phosphatase inhibitor cocktail II [Sigma-Aldrich], 2% of NaPPI 250 mM, and one tablet of complete EDTA free protease inhibitor cocktail [Roche] in 25 mL of lysis buffer). Solubilized proteins were extracted by centrifugation at 4000g for 1 h at 4 °C to eliminate lipids and cellular debris. The phase containing proteins was then collected and centrifuged at 10,000g for 45 min at 4 °C. Total protein content in each lysate was analyzed using the DC protein assay (Bio-Rad), in 96-well microplates (Nunc™) using a microplate reader (Bio-Tek® Synergy™ HT). Concentration was obtained using Gen5 version 2.03 software (Bio-Tek). The resulting lysates were divided in aliquots and stored at -80 °C for further analysis.

Antibody

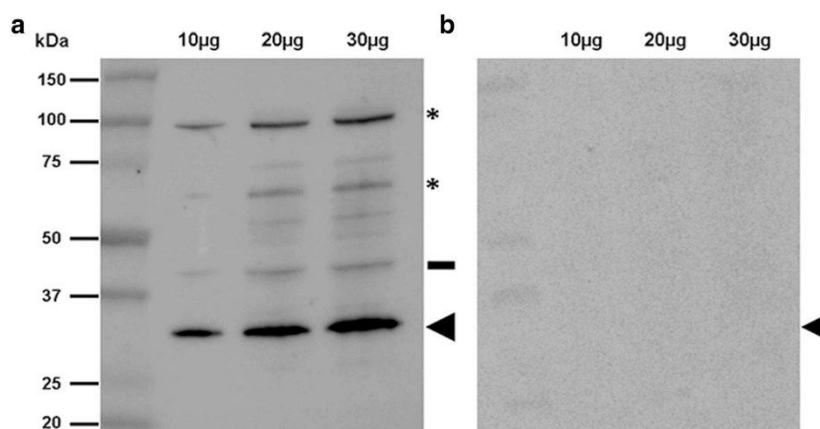
The *Crassostrea gigas* VDAC protein BAF63641.1 is a 280 amino acids protein with a predicted size of 30.33 kDa and a pI at 8.25 (http://web.expasy.org/compute_pi). A polyclonal anti-Cg-VDAC antibody was produced in rabbit by Eurogentec (France) using the protocol describe in (Fabioux et al. 2009), against one peptide (104-QTGTKSGKIKTSYKM-118) located in the middle of the *C. gigas* VDAC protein sequence, in a turn and β -structure.

The antibody was purified and analyzed by indirect ELISA against the purified peptide to compare with pre-immune serum, large bleed, and final bleed (Eurogentec, France). Purified anti-CgVDAC antibody was provided in PBS-BSA 0.1% with thimerosal (0.01%) as preservative and was diluted vol/vol in glycerol for preservation in aliquots at -20 °C.

Immunodetection on Western Blot

Immunodetection on western blot was done after mono-dimensional electrophoresis of total protein lysates: 10, 20, or 30 μ g. Protein lysates were heated in Laemmli buffer for

Fig. 1 Validation of anti-Cg-VDAC antibody. Immunodetection on western blot with 10 to 30 μ g of protein lysates from whole-body protein extracts using **a** anti-Cg-VDAC as primary antibody (dilution 1:5000) or **b** by pre-immune serum. VDAC was detected at 30 kDa (arrow), 45 kDa (line), 60 kDa, and 90 kDa (asterisks). The bands detected at 60 and 90 kDa in SDS-PAGE immunoblots correspond to the size of VDAC oligomers



10 min at 100 °C and loaded onto 4–15% SDS-PAGE (Criterion® TGX™ Precast Gels Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in parallel with broad range SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) molecular weight markers (Precision Plus Protein™Dual Color Standard, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). SDS-PAGE run at 200 V constant voltage, 40 mA, for 10 min then 200 V constant voltage, 80 mA, for 40 min. Proteins were then transferred onto a PVDF membrane (Trans-Blot®Turbo™Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the Trans-Blot®Turbo™Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For the immunodetection, we used the anti-Cg-VDAC (Eurogentec; dilution 1:5000 in PBS-BSA 3%-Tween 1%), or the pre-immune serum as the primary antibody, overnight at 4 °C. Blots were revealed using a secondary horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit antibody (dilution 1:2500 in PBS-BSA 3%-Tween 1%) and a horseradish peroxidase detection kit (GE-Healthcare). The relative amount of protein detected was quantified using gel imaging for fluorescence and chemiluminescence G:Box Chemi XX6 (Syngene, Gene tools software-Syngene) with the background signal removed. The value obtained was expressed in OD/mm² and represents the band intensity. To ensure that identical amounts of total protein samples were loaded into gels, membranes were stained 5 min with Ponceau S (0.2% with TCA 0.3%, 5-sulfosalicylic acid 3%), then rinsed in distilled water under gentle shaking until the background signal had been removed.

Two-Dimensional Electrophoresis and Immunodetection

Anti-Cg-VDAC was used for immunodetection on two-dimensional electrophoresis (2-DE) followed by western blot using mantle, gills, smooth adductor muscle, or heart protein

lysates. For 2-DE, 500 μ g of tissue protein lysates were precipitated and desalted by adding 4 volumes of TCA 20% during 2 h at 4 °C, followed by centrifugation at 12,000g for 15 min at 4 °C. Pellets were washed 20 times with 80% acetone in 0.05 M Tris-HCl, pH 8. Proteins were resuspended in DeStreak rehydration solution (GE Healthcare). Protein concentrations were determined using a modified Bradford assay (Ramagli 1999) and all samples were adjusted to 200 μ g in 125 μ l of DeStreak rehydration solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer, then samples were placed at room temperature for 1 h before isoelectric focusing (IEF). The first dimension was conducted on Bio-Rad protean IEF Cell System™, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples were loaded onto each strip (Immobiline DryStrip pH 4–7, 7 cm, GE Healthcare) and passive rehydration was allowed at room temperature overnight using mineral oil to prevent sample evaporation. The IEF was carried out at 20 °C in four steps: a calibration step at 250 V constant voltage for 10 min, an active hydration step at 250 V for 30 min, a continuous increase in voltage up to 3500 V over 2 h, then kept at 3500 V for 2 h. Finally, 50 V were maintained for 1 h. Before the second dimension, IPG strips were equilibrated for 15 min in a solution containing 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol, and 1% DTT in 0.05 M Tris-HCL, pH 8.8. The strips were then further equilibrated for 15 min in a similar buffer in which DTT was replaced with 2.5% iodoacetamide to alkylate the proteins. For the second dimension, 10% acrylamide gels were used and run on Mini protean tetra cell system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The gels were loaded with broad range SDS-PAGE molecular weight markers (Precision Plus Protein™Dual Color Standard, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Migration was carried out at 200 V constant voltage, 40 mA, 10 min, and 200 V constant voltage, 80 mA, 1 h. After 2-DE, immunodetection on western blot was performed using anti-Cg-VDAC as described above.

Citrate Synthase Activity

Citrate synthase (CS; EC 2.3.3.1) activity was measured in oyster tissues using 20 μ l of total protein lysate obtained as describe before. CS assay buffer contains 100 mM Tris/HCl at pH 8, 0.1 mM 5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic] acid (DNTB), 0.2 mM acetyl-coenzyme A, and 0.5 mM oxaloacetate. CS activity is measured by following the increase in TNB absorbance for 10 min at 412 nm using a Synergy HT microplate reader (BioTek). Enzyme activity was related to the total protein concentration of each sample.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using R software (<http://www.R-project.org>). For all tests, the differences were accepted as statistically significant at the 95% of confidence level ($p < 0.05$). Linear regressions were used to investigate the relation between VDAC relative protein level (30 kDa) and the activity of citrate synthase among tissues (Expt 1). Analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test were conducted to investigate the effect of tissues (Expt 1) and time and sites (Expt 2) on VDAC relative protein levels.

VDAC Amino Acid Sequence Comparison

In order to evaluate the amino acid sequence conservation of the VDAC epitope across bivalves, we searched the VDAC transcript through several transcriptome assemblies. Contigs putatively encoding VDAC were identified through BlastX similarity searches against the non-redundant protein sequences database (nr). Coding sequences were predicted by similarity to *C. gigas* VDAC transcript (AB262088.1) and amino acid sequences were obtained by means of ExpASY translate tool (<http://web.expasy.org/tools/translate/>). The predicted amino acid sequences are aligned to *C. gigas* VDAC protein (BAF63641.1) by using BlastP.

Results

Validation of Anti-Cg-VDAC

As demonstrated by immunodetection on western blot, the purified synthetic polyclonal anti-Cg-VDAC (Eurogentec) strongly and rapidly recognized a band with an apparent molecular weight of 30 kDa in oyster flesh (Fig. 1a), which corresponds to the predicted size for VDAC protein in *C. gigas* (GI:148717311). No signal was revealed when primary antibody was replaced by pre-immune serum (Fig. 1b). As a result, we validated anti-Cg-VDAC as a specific tool to quantify the amount of VDAC in *C. gigas*. Anti-Cg-VDAC also

detected a signal at around 45, 60, and 90 kDa (Fig. 1a). These signal likely corresponded to the size of multimeric forms of VDAC, i.e., dimers (60 kDa) and trimers (90 kDa). The existence of monomers to tetramers and higher oligomers of VDAC has already been characterized in many other species (Hoogenboom et al. 2007).

Tissue-Specific Relative Abundance of VDAC

The 30 kDa VDAC was constitutively expressed in the eight tissues tested (Fig. 2) in accordance with the Cg VDAC mRNA expression pattern (Li et al. 2016). Oligomers at 60, 90, and 120 kDa were also detected at low levels, depending on the tissue (Fig. 2a). The 30 kDa VDAC was less abundant in striated and smooth adductor muscle than in other tissues (Fig. 2b). Also the electrophoretic profile of VDAC was specific to muscle since VDAC was mainly detected at 45 kDa rather than at 30 kDa in other tissues. This could be due to muscle-specific post-translational modifications of VDAC such as glycosylation. The relative levels of VDAC among tissues were correlated with their citrate synthase activities ($p < 0.001$, Fig. 2c).

2-DE Profile of VDAC

The immunodetection on western blot after 2-DE was performed in order to compare the 2-DE electrophoretic profiles of VDAC in four tissues: mantle, gills, smooth adductor muscle, and heart (Fig. 3). VDAC was detected in one specific train of spots at 30 kDa in the mantle (pI 6.2 to 9.6) and in the gills (pI 7.5 to pI 9.2). In the smooth muscle, the 2-DE profile revealed that VDAC was mainly detected at 45 kDa in a train of spot from pI 6.8 to 7.5 as observed in the mono-dimensional electrophoresis. In the heart, VDAC was detected in a spot at 30 kDa (pI = 8 and 8.3) with a shift at around 32 kDa (pI = 7.6) that might be due to heart-specific post-translational modifications. In vertebrates, VDAC modifications refer mainly to acetylation, phosphorylation, and S-nitrosylation. (Martel et al. 2014). In mammals and plants, VDAC has been found to be phosphorylated (Martel et al. 2014). According to what is known about the structure of VDAC, the horizontal trains on gels could correspond to different phosphorylation states of the protein, and the vertical shifts could be due to glycosylation. In the four tested tissues, the spots detected at 60 or 90 kDa might indicate that some multimerization of VDAC remains visible even after protein denaturation followed by IEF.

VDAC Amount in Oysters During a Field Experiment

The relative amounts of VDAC were followed in oysters deployed at six locations in the field for 2 months when OshV-1 outbreaks (Fig. 4). The sites 37 and 39 correspond to inshore

July (Fig. 4a). Finally, the sites 32 and 36 were also located offshore, and there was no abnormal mortality (Fig. 4a). The levels of VDAC at 30 kDa in oysters varied as a function of sites and time, the interaction of site and time being not significant ($p = 0.081$). Overall, the level of VDAC at 30 kDa increased with precocity of the mortality event (Fig. 4b–d). On 30 April, the levels of VDAC at 30 kDa were similar irrespective of locations (Fig. 4d). Then, the level of VDAC at 30 kDa increased between 30 April and 27 May and reached a plateau until 14 June, at the onset of the mortality period (Fig. 4c).

VDAC in Other Marine Species

We identified a contig encoding VDAC in the transcriptomes of six bivalve species: *Crassostrea rhizophorae*, *Pecten maximus*, *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, and *Mytilus edulis*. As compared to *C. gigas*, the entire VDAC amino-acid sequence of the six marine species listed above showed a percentage of identity ranging from 64 to 97% (Table 1). In these species, we investigated the conservation of the epitope employed for the anti-Cg VDAC antibody synthesis, which consisted of 15 amino acids. With 10 to 14 conserved amino acids in the epitope, we could assume that anti-Cg VDAC antibody might be able to detect VDAC in these bivalve species (Table 1). The best record of epitope conservation was found for *C. rhizophorae* with 14 conserved amino acids.

Discussion

Owing to the purified anti-Cg VDAC antibody developed in our study, we showed that VDAC was constitutively expressed in all the tissues analyzed. This result agrees with the repartition of Cg VDAC transcripts in oysters (Li et al. 2016). The protein VDAC (30 kDa) was particularly accumulated in the heart, the labial palp, the ganglia, and the gills. The amount of VDAC was correlated with a high activity of citrate synthase in these tissues, a proxy of mitochondria number in tissues (Moran and Manahan 2004; Holmborn et al. 2009).

Analyses of Cg VDAC electrophoretic profile using both the western blot and the 2-DE western blot might reveal the existence of dimers and trimers and their tissue-specific regulations. The detection of bands corresponding to VDAC oligomers can vary between immunoblots, due to either a low level of band detection in a complex protein sample, or to the protocol of denaturation of protein extracts before analysis. VDAC oligomerization is well documented and VDAC is present as a dimer in rat liver (Lindén and Gellerfors 1983), as both dimers and trimers in yeast (Krause et al. 1986), and higher oligomers in plants (Hoogenboom et al. 2007). In striated and smooth muscles, VDAC was mainly detected at 45 kDa rather than at 30 kDa. In fact, specific post-translational modifications of VDAC might occur depending on the tissue, and this was confirmed by 2D immunoblots. Tissue-specific regulation of VDAC likely reflects post-translational modifications, as previously reported in rats (Martel et al. 2014). These authors show that various VDAC

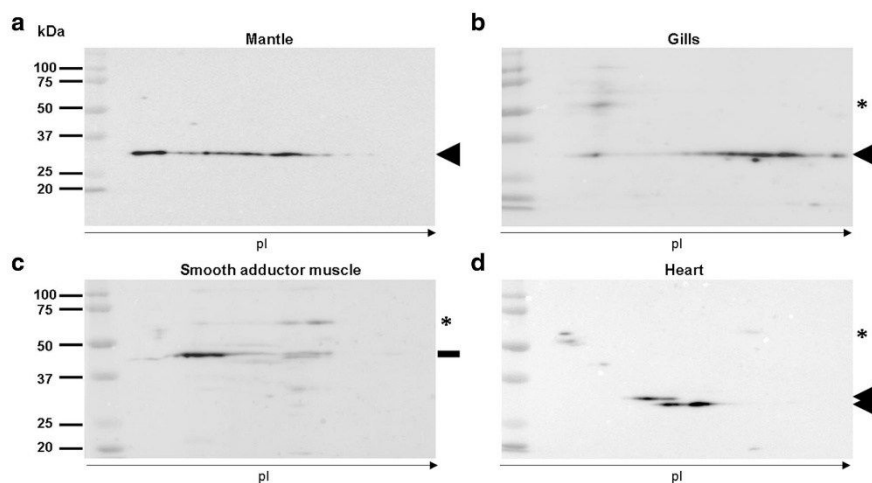


Fig. 3 Tissue-specific 2-DE profile of VDAC. Immunodetection on western blot using anti-Cg VDAC after 2-DE with 500 µg of a mantle, b gills, c smooth adductor muscle, and d heart protein lysates. VDAC was

detected in spots at 30 kDa (arrows), 45 kDa (line), and 60 kDa (asterisks) depending on the tissue. The spots detected at 60 kDa in 2-DE immunoblots correspond to the size of VDAC dimers

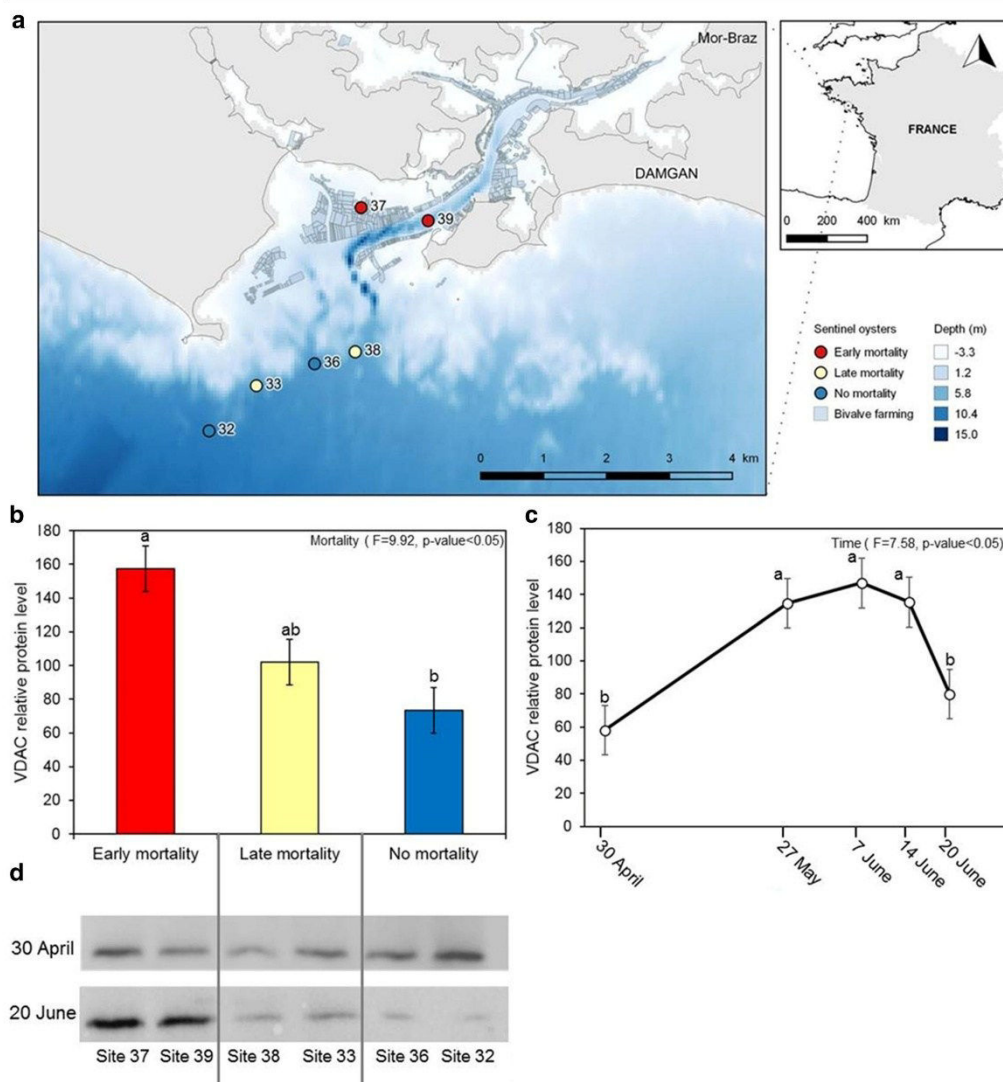


Fig. 4 VDAC amount in oysters in the field. **a** Map of 6 sampling sites, located along an inshore-offshore gradient in the Mor-Braz area, South Brittany (France). Sites 37 and 39 correspond to sites where mortalities occurred “early” (in red), sites 38 and 33 correspond to sites where mortalities occurred “late” (in yellow), and in sites 36 and 32, “no mortality” (blue) were recorded. **b** Effect of mortality level on the

relative level of VDAC (30 kDa) in oysters in early mortality site (red), in late mortality site (yellow), and in site without mortality (blue). **c** Effect of time on the relative level of VDAC (30 kDa) in oysters from 30 April 2013 to 20 June 2013. **d** Representative blots of western blot obtained the 30 April 2013 and 20 June 2013 in each site using anti-Cg VDAC antibody

post-translational modifications can occur, such as phosphorylation, acetylation, S-nitrosylation, and they influence the interactome and the activity of VDAC (Martel et al. 2014). In our case, further analysis should be carried out to verify the

identities of the putative post-translational modifications and oligomerization found at 32, 45, 60, 90, and 120 kDa in western blotting. The anti-Cg VDAC antibody developed here might help to study the functioning of VDAC in oyster in

Mar Biotechnol

Table 1 VDAC in *C. gigas* and other marine species

	% identity Cg VDAC	Epitope	Epitope identity (number aa)
<i>Cg</i> VDAC <i>Crassostrea gigas</i>	–	<u>QTG</u> <u>TKSGKIKTSYKM</u>	–
<i>Cr</i> VDAC <i>Crassostrea rhizophorae</i>	97	<u>QTG</u> <u>TKSGKIKSSYKM</u>	14/15
<i>Mg</i> VDAC <i>Mytilus galloprovincialis</i>	67	<u>QTG</u> <u>KKQGTIKTGYKQ</u>	10/15
<i>Me</i> VDAC <i>Mytilus edulis</i>	67	<u>QTG</u> <u>KKQGTIKTGYKQ</u>	10/15
<i>Pm</i> VDAC <i>Pecten maximus</i>	65	<u>QTG</u> <u>KKNGQIKTAYKM</u>	11/15
<i>Rp</i> VDAC <i>Ruditapes philippinarum</i>	64	<u>QTG</u> <u>KKSGKVKTGYKQ</u>	11/15
<i>Rd</i> VDAC <i>Ruditapes decussatus</i>	64	<u>QTG</u> <u>KKSGKVKTGFKQ</u>	10/15

Comparison of VDAC amino acid sequence between *C. gigas* and other marine mollusks (in percentage of identity). The conserved amino acids from the epitope of anti-Cg VDAC are bold and underlined. Epitope identity is expressed as the number of amino acids conserved with *C. gigas* epitope

further studies designed to investigate the post-translational modifications and oligomerization of Cg VDAC.

In *C. gigas*, the role of VDAC remains unclear. A recent study strongly supported the well-conserved role of VDAC in the control of apoptosis during UV exposure and the direct interaction between VDAC and the pro-apoptotic protein Bak (Li et al. 2016). However, VDAC could be involved in the early stage of viral infection in invertebrates. This was already proposed in *C. gigas*/OsHV-1 (Corporeau et al. 2014; Young et al. 2017) and demonstrated in shrimps/WSSV. For instance, VDAC is accumulated during WSSV infection in *L. vannamei*, and it facilitates the infection process (Wang et al. 2007, 2010; Leu et al. 2013). Indeed, when the expression of VDAC is silenced, the infection process is delayed (Chen et al. 2011).

For the first time, our study shows that VDAC is upaccumulated in oysters exposed to OsHV-1 in the field. This result agrees with the accumulation of transcripts of Cg VDAC in the hemolymph of oysters infected with OsHV-1 (Renault et al. 2011) 6 h after the viral injection (Li et al. 2016).

In marine invertebrates, knowledge on proteins playing a role in viral infection is still limited (Li et al. 2016) and studies have mainly explored the host or viral transcriptomes (Jouaux et al. 2013; Segarra et al. 2014). In shrimp, the Warburg effect is induced by viral mechanisms that alter the host metabolome through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathways for production of energy and metabolic precursors for viral biogenesis (Su et al. 2014). In shrimp infected by WSSV, VDAC is upregulated, and silencing of VDAC reduces WSSV-induced mortalities and virion copy number (Chen et al. 2011). As a key component of the Warburg effect, it now seems important to develop tools to study VDAC in *C. gigas* at the proteomic level, and to further evaluate its ability to bind partners, like hexokinase, depending on the infection status and the oyster environment.

For the first time, we proved the validity of the anti-Cg VDAC antibody as a tool to follow the amount of VDAC in

oyster deployed in the field. We showed that the relative amount of VDAC at 30 kDa, as a monomer can be informative even if it does not represent all the VDAC oligomers. We demonstrated a higher accumulation of VDAC at 30 kDa in tissues exhibiting a higher citrate synthase activity, and in oysters from sites suffering from higher levels of mortality compared to control animals. These results likely indicate that (1) increasing amount of VDAC is related to the susceptibility of oysters to OsHV-1, and (2) disease-susceptibility of oyster and the amount of VDAC in oyster tissues are influenced by the local environment. The high amount of VDAC might reflect the ability of the oyster in the field to shift toward the Warburg effect and to replicate the virus, thus leading to death. Ongoing studies are investigating the role of environmental factors on the interaction between VDAC, *C. gigas* metabolism, and OsHV-1 replication. The antibody anti-Cg VDAC is a new tool to measure the impact of environmental factors on oyster metabolism.

Acknowledgments We are grateful to Ifremer and the French ministry of agriculture for partly supporting this study. We acknowledge E. Hamey for his help in editing English. The authors are grateful to Bruno Petton and the Ifremer staff involved in oyster and algae production Argenton for their help and delivery of animals used in the study. We thank the shellfish network Resco II (http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M-A (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2–10
- Brahimi-Horn MC, Lacas-Gervais S, Adaixo R, Ile K, Rouleau M, Notte A, Dieu M, Michiels C, Voeltzel T, Maguer-Satta V, Pelletier J, Ilie M, Hofman P, Manoury B, Schmidt A, Hiller S, Pouyssegur J,

- Mazure NM (2015) Local mitochondrial-endolysosomal microfusion cleaves voltage-dependent anion channel 1 to promote survival in hypoxia. *Mol Cell Biol* 35(9):1491–1505
- Chen I-T, Aoki T, Huang Y-T, Hirono I, Chen TC, Huang JY, Chang GD, Lo CF, Wang HC (2011) White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J Virol* 85(24):12919–12928
- Corporeau C, Tamayo D, Pernet F, Quéré C, Madec S (2014) Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J Proteome* 109:176–187
- Davison AJ (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86(1):41–53
- Dégremont L (2013) Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 416–417:129–134
- Delgado T, Carroll PA, Punjabi AS, Margineantu D, Hockenbery DM, Lagunoff M (2010) Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 107(23):10696–10701
- Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters KA, Proll SC, McDermott JE, Gritsenko MA, Zhang Q, Zhao R, Metz TO, Camp DG, Waters KM, Smith RD, Rice CM, Katze MG (2010) Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog* 6(1):e1000719
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2010) Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, (*Crassostrea gigas*). *EFSA J* 8(11):1894
- EFSA (2015) Oyster mortality: oyster mortality. *EFSA J* 13(6):4122
- Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, Favrel P, Huvet A (2009) In vivo RNA interference in oyster—*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* 276(9):2566–2573
- Guévelou E, Huvet A, Sussarellu R, Milan M, Guo X, Li L, Zhang G, Quillien V, Daniel JY, Quéré C, Boudry P, Corporeau C (2013) Regulation of a truncated isoform of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Comp Physiol B* 183(5):597–611
- Guo Y, Meng X, Ma J, Zheng Y, Wang Q, Wang Y, Shang H (2014) Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1 α induced Warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1 α interaction. *Int J Mol Sci* 15(5):7974–7986
- Holmborn T, Dahlgren K, Holeten C, Hogfors H, Gorokhova E (2009) Biochemical proxies for growth and metabolism in *Acartia biflosa* (Copepoda, Calanoida). *Limnol Oceanogr Methods* 7(11):785–794
- Hoogenboom BW, Suda K, Engel A, Fotiadis D (2007) The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol* 370(2):246–255
- Jouaux A, Lafont M, Blin J-L, Houssin M, Mathieu M, Lelou C (2013) Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* 14(1):590
- Krause J, Hay R, Kowolik CH, Brdiczka D (1986) Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 860(3):690–698
- Lemasters JJ, Holmuhamedov E (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor—thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis* 1762(2):181–190
- Leu J-H, Lin S-J, Huang J-Y, Chen TC, Lo CF (2013) A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish Shellfish Immunol* 34(4):1011–1017
- Li Y, Zhang L, Qu T, Li L, Zhang G (2016) Characterization of oyster voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) suggests its involvement in apoptosis and host defense. *PLoS One* 11(1):e0146049
- Lindén M, Gellerfors P (1983) Hydrodynamic properties of porin isolated from outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 736(1):125–129
- Lü A-J, Dong C-W, Du C-S, Zhang Q-Y (2007) Characterization and expression analysis of *Paralichthys olivaceus* voltage-dependent anion channel (VDAC) gene in response to virus infection. *Fish Shellfish Immunol* 23(3):601–613
- Martel C, Wang Z, Brenner C (2014) VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion* 19:69–77
- Mazure NM (2017) VDAC in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg* 1858(8):665–673
- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K (2014) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15(3):266–282
- Miossec L, Le Deuff R-M, Goulletquer P (2009) Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop Res Rep* 299:1–41
- Moran A, Manahan D (2004) Physiological recovery from prolonged “starvation” in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 306(1):17–36
- Munger J, Bajad SU, Collier HA, Shenk T, Rabinowitz JD (2006) Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog* 2(12):e132
- Naghdi S, Hajnóczy G (2016) VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure. *Biochim Biophys Acta* 1863(10):2503–2514
- Pedersen PL (2007) Warburg, me and hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):211–222
- Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, Pépin JF, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact* 2(3):215–237
- Pernet F, Lupo C, Bacher C, Whittington RJ (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371(1689):20150213
- Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* 3(3):257–273
- Petton B, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact* 6(3):205–222
- Poliseno L (2012) Pseudogenes: newly discovered players in human cancer. *Sci Signal* 5:5
- Puyraimond-Zemmour D, Vignot S (2013) Le métabolisme de la cellule tumorale: l'effet Warburg. *Oncologie* 15(9):435–440
- Ramagli LS (1999) Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. In: Link AJ (eds) 2-D proteome analysis protocols, vol 112. Humana Press, New York
- Renault T, Faury N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K (2011) Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev Comp Immunol* 35(7):725–735
- Rostovtseva TK, Komarov A, Bezrukov SM, Colombini M (2002) VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J Membr Biol* 187(2):147–156
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T (2011) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* 155(1):28–34
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153(1):92–99

Mar Biotechnol

- Segarra A, Baillon L, Tourbiez D, Benabdelmouna A, Faury N, Bourgougnon N, Renault T (2014) Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* 45(1):103
- Shen X, Wang T, Xu D, Lu L (2014) Proteomic identification, characterization and expression analysis of *Ctenopharyngodon idella* VDAC1 upregulated by grass carp reovirus infection. *Fish Shellfish Immunol* 37(1):96–107
- Su M-A, Huang Y-T, Chen I-T, Lee DY, Hsieh YC, Li CY, Ng TH, Liang SY, Lin SY, Huang SW, Chiang YA, Yu HT, Khoo KH, Chang GD, Lo CF, Wang HC (2014) An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway. *PLoS Pathog* 10(6):e1004196
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930):1029–1033
- Wang H-C, Wang H-C, Leu J-H, Kou GH, Wang AHJ, Lo CF (2007) Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol* 31(7):672–686
- Wang H-C, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2010) The *Marsupenaeus japonicus* voltage-dependent anion channel (MjVDAC) protein is involved in white spot syndrome virus (WSSV) pathogenesis. *Fish Shellfish Immunol* 29(1):94–103
- Warburg (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309–314
- Young T, Kesarcodi-Watson A, Alfaro AC, Merien F, Nguyen TV, Mae H, Le DV, Villas-Bôas S (2017) Differential expression of novel metabolic and immunological biomarkers in oysters challenged with a virulent strain of OsHV-1. *Dev Comp Immunol* 73:229–245

Titre : Rôle de la température dans l'interaction huître creuse - Ostreid Herpesvirus de type 1: réponses transcriptomiques et métaboliques.

Mots clés : huître creuse, *Crassostrea gigas*, OsHV-1, transcriptomique, température, interaction hôte/virus, protéomique.

Résumé : *Crassostrea gigas* est la principale espèce d'huître cultivée dans le monde. Depuis 2008, de sévères épisodes de mortalités affectent les huîtres âgées de moins d'un an en Europe et en Océanie et sont associées à l'émergence de l'Ostreid herpesvirus μ Var (OsHV-1 μ Var). En Europe, ces mortalités sont saisonnières et surviennent lorsque la température de l'eau de mer est comprise entre 16°C et 24°C. Dans le cadre de ce travail, l'effet des hautes températures (21°C, 26°C et 29°C) est évalué sur la sensibilité des huîtres à OsHV-1 mais aussi sur la persistance et la virulence du virus. La survie des huîtres infectées maintenues à 29°C (86%) est supérieure à la survie des huîtres placées à 21°C (52%) et à 26°C (43%).

Les températures élevées (29°C) diminuent la sensibilité des huîtres à OsHV-1 sans altérer l'infectivité du virus et sa virulence. L'exposition des huîtres infectées à 29°C pourrait réduire l'expression des gènes viraux et la synthèse de virions par la réduction de l'expression de gènes hôtes codant pour des protéines impliquées dans la transcription et la traduction, la réduction de l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme, le transport des métabolites, et synthèse de macromolécules. Finalement, l'induction conjointe de l'apoptose, des processus d'ubiquitylation et de la réponse immunitaire, pourrait permettre l'élimination d'OsHV-1.

Title: Effects of temperature on the interaction between Pacific oysters and OsHV-1: transcriptomic and metabolic responses.

Keywords : Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, OsHV-1, RNAseq, temperature, host/pathogen, proteomic

Abstract : *Crassostrea gigas* is the main species of oyster cultivated in the world. Since 2008, mass mortality events have been affecting oysters aged less than one year old in Europe and Oceania and have been associated with the emergence of the Ostreid herpes virus μ Var (OsHV-1 μ Var). In Europe, these events are seasonal and occur when the seawater temperature is between 16°C and 24°C. In this work, the effect of high temperatures (21°C, 26°C and 29°C) was evaluated on the susceptibility of oysters to OsHV-1 but also on the virulence of virus.

High temperatures (29°C) reduce the susceptibility of oysters to OsHV-1 without altering the infectivity of the virus and its virulence. High temperature could reduce viral infection and virus synthesis by reducing the expression of host genes that encode proteins involved in transcription and translation, catabolism, metabolites transport, and macromolecules biosynthesis. Finally, the induction of apoptosis, ubiquitylation processes and immune response could lead to the elimination of OsHV-1.