

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

- **Date de la demande** (10/01/15) :

**1- Identification du projet (en langue française)**

- **Acronyme du projet** (8 caractères maximum) : **FEDIVER**

- **Intitulé du projet** (en langue française) : **Faune Environnante et DIVERSité: source ou puits d'agents pathogènes pour l'huître creuse? Comment la biodiversité influence-t-elle le risque de maladie dans les écosystèmes marins ?**

**2- Domaine d'innovation stratégique (DIS) du projet**

- **Cocher le DIS prioritaire** au sein duquel le projet de thèse s'intègre. Vous pouvez mentionner un DIS secondaire (choix à indiquer et argumenter au point 5-Présentation du projet, paragraphe 6). Si aucun DIS ne correspond, cocher « Projet Blanc ».

DIS 1 : Innovations sociales et citoyennes pour une société ouverte et créative

DIS 2 : Chaîne alimentaire durable pour des aliments de qualité

DIS 3 : Activités maritimes pour une croissance bleue

DIS 4 : Technologies pour la société numérique

DIS 5 : Santé et bien-être pour une meilleure qualité de vie

DIS 6 : Technologies de pointe pour les applications industrielles

DIS 7 : Observation et ingénieries écologique et énergétique au service de l'environnement

« Projet Blanc »

- **Préciser le sous-domaine correspondant :**

3D- Nouveaux modèles d'exploitation des ressources vivantes aquatiques (pêche et aquacultures)

Pour une plus ample présentation des DIS et des sous-domaines, merci de vous référer au Schéma régional de l'enseignement supérieur et de la recherche disponible à l'adresse suivante : [http://www.bretagne.fr/internet/upload/docs/application/pdf/2013-11/sresr\\_version\\_finale.pdf](http://www.bretagne.fr/internet/upload/docs/application/pdf/2013-11/sresr_version_finale.pdf)

### 3- Présentation de l'établissement porteur (bénéficiaire de l'aide régionale)

- **Établissement porteur du projet** (*implantation obligatoire sur le territoire régional*) :

*NB : C'est-à-dire l'établissement bénéficiaire de l'aide régionale. Un seul établissement peut être indiqué.*

UMR 6539 (UBO CNRS IRD Ifremer) LEMAR, Equipe 2 : PANORAMA – Ifremer PFOM/LPI, Département Ressources Biologiques Marines (RBE), centre de Brest, Technopôle Brest-Iroise, BP 70, 29280 Plouzané.

- **Ecole Doctorale** : Ecole doctorale des Sciences de la mer (EDSM) IUEM-UBO

### 4- Identification du/de la responsable du projet (futur-e directeur-trice de thèse)

- **Nom et prénom** : Dr Fabrice Pernet, HDR

- **Genre du/de la responsable du projet (F/H)** : H

- **e-mail** : [fabrice.pernet@ifremer.fr](mailto:fabrice.pernet@ifremer.fr)

- **Téléphone** : 02 98 22 46 37

- **Nom du laboratoire** : Laboratoire des sciences de l'environnement marin

- **Code du laboratoire (U/UMR/USR/EA/JE/...)** : UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer

- **Nom de l'équipe de recherche** : Panorama

- **Nombre HDR dans le laboratoire** : 41 HDR au Lemar

- **Nombre de thèses en cours** : 46 doctorant au laboratoire, actuellement une thèse codirigée à 30% par le proposant (L. Delisle, soutenance en octobre 2018)

- **Nombre de post-docs en cours** : 12 post-doc au Lemar

- **Publications récentes du directeur-trice de thèse** (*nb total et 5 références max au cours des 5 dernières années*) :

1. Muir A, Nunes F, Dubois S, **Pernet F** (2016) Lipid remodelling in the reef building honeycomb worm, *Sabellaria alveolata*, reflects acclimation and local adaptation to temperature. Scientific Reports
2. Fuhrmann M, Petton B, Quillien V, Fauray N, Morga B, **Pernet F** (2016) Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Aquaculture Env Interact 8:543-552

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

- Richard G, Guérard F, Corporeau C, Lambert C, Paillard C, and **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
- Pernet F**, Lupo C, Bacher C, and Whittington RJ (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 371:20150213
- 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

- **Co-directeur-trice de thèse (éventuellement) :**

- **Laboratoire de recherche co-encadrant** (nom + code U/UMR/USR/EA/JE/...)

**5- Présentation du projet (en langue française, 2 à 3 pages)**

- **Résumé du projet (15 lignes) :** Le risque de maladie dépend des interactions hôte-pathogène-environnement, et tout changement dans l'une ou l'autre de ces composantes peut augmenter ou diminuer ce risque. L'effet de facteurs biotiques comme l'abondance, la richesse et la diversité spécifique, sur le risque infectieux en milieu marin n'a jamais été étudié. Pourtant, la littérature scientifique récente suggère un lien entre la diversité spécifique et la prévalence de maladies infectieuses. En fait, la plupart des études considèrent l'hôte et le pathogène, seuls, dans une sorte de vide écologique. L'objectif est de tester l'hypothèse selon laquelle la diversité spécifique influence le risque infectieux en étudiant le couple OsHV-1/*C. gigas*. Pour cela, nous proposons des expériences en milieu contrôlé et en milieu naturel pour (1) évaluer le potentiel de plusieurs espèces de filtreurs à agir comme puits (dilution) ou source (réservoir) d'agents pathogènes et (2) définir comment les caractéristiques biotiques (richesse, abondance et diversité) des habitats influencent-elles le risque infectieux, par une approche couplée d'épidémiologie spatiale et de cartographie des habitats benthiques.

Mots-clés : Biodiversité, Cartographie, Epidémiologie spatiale, Habitat, Virus

- **Présentation détaillée du projet :**

*1-Contexte scientifique et socio-économique du projet :*

Les maladies infectieuses influencent la structure des communautés, les interactions trophiques, la pyramide des âges, et les structures biotiques en milieu marin. De tels effets ont déjà été observés chez des populations de zoostères (Burge et al. 2013), de coraux (Aronson and Precht 2001), d'huîtres (Mann et al. 2009) et d'oursins (Lauzon-Guay et al. 2009) touchées par des maladies (Burge et al. 2014, pour revue, Lafferty et al. 2015). Le risque de maladie dépend des interactions hôte-pathogène-environnement, et tout changement dans l'une ou l'autre de ces composantes peut potentiellement augmenter ou diminuer ce risque. Par exemple, les changements de température, l'acidification de l'eau de mer, les modifications du régime des précipitations, et l'exposition aux tempêtes et aux cyclones déplacent l'équilibre hôte-pathogène-environnement en modifiant la réponse de l'hôte ou l'agent pathogène (Burge et al. 2014). Dans ce contexte, le changement climatique augmente la probabilité d'émergence de maladies (Harvell et al. 2004, Altizer et al. 2013).

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

La conchyliculture est une activité socio-économique particulièrement vulnérable à une augmentation de la fréquence des maladies. L'histoire de l'ostréiculture mondiale a été ponctuée d'épizooties (MacKenzie and Clyde 1996, Gouletquer and Heral 1997, Nell 2001, Buestel et al. 2009, Troost 2010). En Europe, l'ostréiculture a commencé au cours du 17<sup>ème</sup> siècle. Cette activité reposait initialement sur l'exploitation de l'huître plate, *Ostrea edulis* (Gouletquer and Heral 1997, Buestel et al. 2009, Troost 2010). Pendant le 19<sup>ème</sup> siècle, des épisodes de mortalités, la surpêche et l'introduction accidentelle de parasites ont entraîné un déclin des populations et des extinctions locales. En France, *O. edulis* a été remplacée par l'huître portugaise *Crassostrea angulata* en 1925, mais cette espèce y a été anéantie par une maladie causée par un iridovirus autour de 1970 (Comps et al. 1976). Ensuite, l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* a été introduite dans plusieurs pays européens au cours des années 1960 et 1970 et cette espèce est devenue bien établie le long de la côte européenne, où elle est souvent considérée comme invasive (Troost 2010).

Les mortalités estivales d'huîtres *C. gigas* ont été rapportées partout où cette espèce est cultivée (Samain and McCombie 2008). Pendant l'été 2008, les mortalités d'huîtres âgées d'un an et moins se sont produites sur toutes les côtes françaises (Miossec et al. 2009, EFSA 2010). Ces mortalités ont été associées à l'infection des huîtres par un génotype nouvellement décrit ( $\mu$ Var) de l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Segarra et al. 2010). Depuis, ce virus s'est répandu le long de la côte européenne, du Portugal à la Scandinavie, et des variants de ce virus ont été détectés en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Asie (EFSA 2015). Une relation causale entre OsHV-1  $\mu$ Var et la mortalité des huîtres a été récemment établie sur le plan épidémiologique (Schikorski et al. 2011, Bingham et al. 2013, EFSA 2015, Paul-Pont et al. 2015). Le virus OsHV-1 pose aujourd'hui un défi majeur pour la production de l'huître du Pacifique dans le monde entier et son interaction avec l'huître et l'environnement fait l'objet de ce sujet de thèse.

La gestion des risques de mortalité associés aux agents pathogènes est un élément clé de la durabilité de la conchyliculture. Bien que plusieurs facteurs de risque de transmission du virus OsHV-1 aient été identifiés (température, salinité, pH, âge des huîtres, bagage génétique, biomasse infectieuse, connectivité hydrodynamique, état énergétique), l'effet de facteurs environnementaux comme les caractéristiques biotiques des habitats telles que l'abondance, richesse, et diversité des espèces, sur la transmission d'OsHV-1 sont inconnus (Pernet et al. 2016). Pourtant, la littérature scientifique récente suggère un lien entre la diversité spécifique et la prévalence de maladies infectieuses (Keesing et al. 2006, Keesing et al. 2010). Néanmoins, le rôle des autres espèces animales ou végétales sur le risque infectieux en milieu aquatique est peu connu car la plupart des expériences et des modèles considèrent l'hôte et le pathogène, seuls, dans une sorte de « vide écologique » (Ben-Horin et al. 2015). Toutefois, nous avons déjà observé que le risque de mortalité causée par OsHV-1 est plus faible chez les huîtres maintenues au voisinage de moules que chez les huîtres placées avec leur congénères, suggérant ainsi que les moules qui ne sont pas sensibles à OsHV-1 peuvent diluer l'abondance des particules virales dans la colonne d'eau de par leur activité de filtration (Pernet et al. 2014, Burge et al. 2016). Ce constat est en accord avec l'idée selon laquelle une diversité élevée d'hôtes est plus susceptible de diminuer que d'augmenter le risque de maladie (Keesing et al. 2006, Keesing et al. 2010).

**2-Hypothèse et questions posées, identification des points de blocages scientifiques que le travail de thèse se propose de lever :**

Bien que le risque de maladie dépende des interactions hôte-pathogène-environnement, et que tout changement dans l'une ou l'autre de ces composantes peut augmenter ou diminuer ce risque, l'effet de facteurs biotiques comme l'abondance, la richesse et la diversité spécifique, sur le risque infectieux en milieu marin n'a jamais été étudié. Pourtant, la littérature scientifique récente suggère un lien entre la diversité spécifique et la prévalence de maladies infectieuses. En fait, la plupart des études considèrent l'hôte et le pathogène, seuls, dans une sorte de vide écologique.

L'objectif de ce projet est de tester l'hypothèse selon laquelle la diversité spécifique influence le risque infectieux en

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

milieu marin. Ce projet portera sur un cas d'étude : le couple OsHV-1/*C. gigas*.

Nous proposons de réaliser des expériences en milieu contrôlé et en milieu naturel pour (1) évaluer le potentiel de plusieurs espèces de filtreurs à agir comme puits (dilution) ou source (réservoir) d'agents pathogènes et (2) définir plus largement l'influence des caractéristiques biotiques (richesse, abondance et diversité) des habitats dans la transmission du virus et la réceptivité de l'hôte par une approche couplée d'épidémiologie spatiale et de cartographie des habitats benthiques.

Ce travail permettra de proposer des scénarios de gestion des maladies en milieu marin par la gestion des habitats et de la biodiversité. De plus, ce travail contribuera au développement d'un modèle hydro-épidémiologique de transmission des maladies infectieuses dans les écosystèmes conchylicoles appliqué à la rade de Brest.

*3-Approche méthodologique et technique envisagée :*

Nous proposons d'évaluer en milieu contrôlé (station marine de l'Ifremer à Argenton), le potentiel de plusieurs espèces de filtreurs à agir comme puits (dilution) ou source (réservoir) d'agents pathogènes. Le virus OsHV-1 sera injecté à des huîtres « donneuses » placées en bassin de 45 L, et l'eau de mer environnante sera utilisée comme source infectieuse (Figure 1). Ce protocole modifié de Petton et al. (2015) a déjà été mis en œuvre avec succès dans le cadre des travaux de thèses de M. Fuhrmann (Fuhrmann et al. 2016) et de L. Delisle (en cours). La source infectieuse transitera dans des bassins contenant les filtreurs « tests » (ou témoin sans animaux) avant d'être distribuée dans des bassins contenant des huîtres « receveuses ». Les animaux tests et les huîtres receveuses seront préalablement acclimatés pendant 2 semaines. Le temps de résidence de l'eau de mer dans le bassin test correspondra au temps qu'il faut aux filtreurs pour filtrer le volume d'eau de mer. La survie des hôtes receveurs sera suivie quotidiennement. Les animaux receveurs, les filtreurs « tests » et l'eau avant et après passage dans le bassin test seront régulièrement prélevés pour analyser les quantités d'ADN et d'ARN d'OsHV-1. Des échantillons seront également conservés pour analyses ultérieures en microbiologie. Dans un premier temps, les espèces de filtreurs « tests » sont (1) des bivalves comme la moule bleue (*Mytilus edulis*), la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*), la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*), l'huître plate (*Ostrea edulis*), le pétoncle noir (*Chlamys varia*) et l'huître creuse (adulte et naissain *C. gigas*), et (2) des ascidies que l'on retrouve en association avec l'huître, dont l'ascidie blanche (*Phallusia mamillata*). Ce plan expérimental comporte un témoin positif (compartiment test = naissain d'huître creuse) et un témoin négatif (compartiment test = vide), soit un total de 9 traitements nécessitant deux bassins (un test et un receveur, soit 18 bassins) et chaque traitement sera répliqué (36 bassins). Selon les résultats obtenus, d'autres espèces (filtreurs ou non) pourraient être testées. Bien que certaines espèces tests sont des hôtes connus d'OsHV-1 (EFSA 2015), leur rôle dans la transmission du virus en tant que puits ou source doit être approfondi.

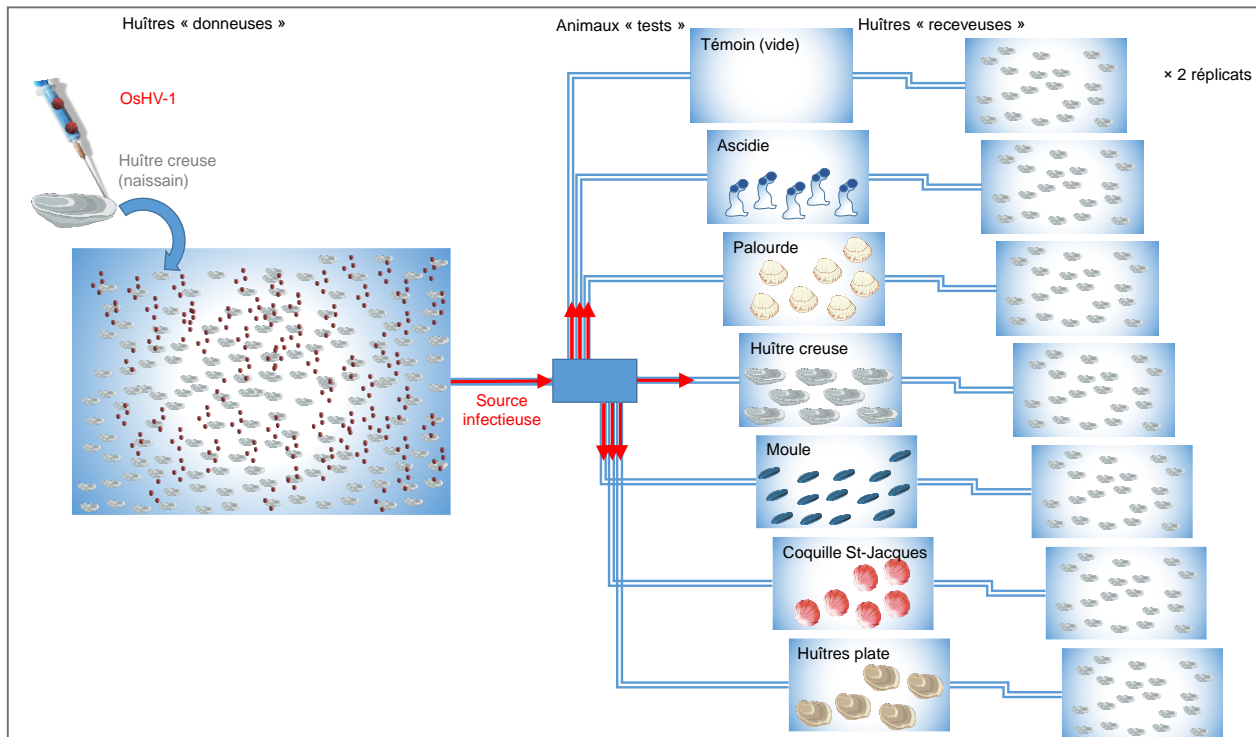
**Allocations de recherche doctorale (ARED)**
**Fiche projet 2017**


Figure 1. Schéma du dispositif expérimental en milieu contrôlé.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la diversité influence le risque infectieux en milieu naturel, nous allons décrire et analyser des variations géographiques de l'occurrence d'une maladie par rapport à des caractéristiques des habitats (Elliott and Wartenberg 2004). Concrètement, nous allons (1) déployer des huîtres saines « sentinelles », produite en éclosure selon Petton et al. (2015), sur une vingtaine de sites en Rade de Brest, (2) suivre les processus d'infection, de morbidité ou de surmortalité sur une durée d'un an, et (3) relier ces processus aux caractéristiques des habitats. Les sites seront choisis de manière à optimiser les contrastes, notamment à partir de la cartographie des habitats benthiques des côtes de Bretagne et du suivi de leur biodiversité par le laboratoire Dyneco de l'Ifremer dans le cadre du REBENT.

Des structures métalliques supportant chacune une poche ostréicole contenant 18 sous-poches de 100 naissains d'huîtres seront déployées début avril 2018 sur chaque site. A chaque campagne d'échantillonnage (18 campagnes réparties sur 1 an), une sous-poche d'huîtres sera prélevée afin d'évaluer la survie, la croissance, la quantité d'ADN d'OsHV-1, la charge en vibrions, et les paramètres physiologiques de l'hôte (énergétique, nutrition). Des photographies du site seront prises à chaque visite afin de mesurer l'abondance, la richesse et la diversité spécifique pour chaque site à plusieurs échelles spatiales. Les paramètres environnementaux classiques (température, salinité, turbidité, fluorescence, et oxygène dissout) seront également mesurés à chaque visite.

Des analyses de survie et des analyses de risques (modèle de Cox) permettront d'établir des relations entre le risque infectieux et les caractéristiques des habitats. Cette approche permettra aussi d'identifier des sources ou des puits de particules virales. En effet, la corrélation entre la prévalence d'une maladie et la présence d'une espèce donnée pourrait indiquer une source (corrélation positive) ou un puits (corrélation négative) d'agents pathogènes (Pernet et al. 2016).

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

*4-Profil du candidat (compétences scientifiques et techniques requises) :*

L'objectif de ce projet est de tester l'hypothèse selon laquelle la diversité spécifique influence le risque infectieux en milieu marin. Ce projet portera sur un cas d'étude : le couple OsHV-1/*C. gigas*. Nous proposons de réaliser des expériences en milieu contrôlé et en milieu naturel pour (1) évaluer le potentiel de plusieurs espèces de filtreurs à agir comme puits (dilution) ou source (réservoir) d'agents pathogènes et (2) définir plus largement l'influence des caractéristiques biotiques (richesse, abondance et diversité) des habitats dans la transmission du virus et la réceptivité de l'hôte par une approche couplée d'épidémiologie spatiale et de cartographie des habitats benthiques. Le candidat retenu devra planifier des expériences en laboratoire à petite échelle et des expériences à grande échelle sur le terrain. Plus particulièrement, l'objectif des expériences de terrain est de déterminer la structure spatiale des agents infectieux et des mortalités d'huîtres en relations avec les caractéristiques des habitats. Ce poste nécessite un fort intérêt pour l'écologie marine au sens large, l'épidémiologie, la biologie expérimentale et les statistiques (multivariées, géostatistique et analyses de survie). Le candidat retenu travaillera au laboratoire de physiologie des invertébrés de l'Ifremer (Plouzané, France) en collaboration avec les partenaires du projet européen Vivaldi.

*5-Positionnement et environnement scientifique dans le contexte régional, et le cas échéant, national et international :*

Ce sujet de thèse fait partie intégrante du WP4 du projet européen Vivaldi, dont l'objectif consiste à « identifier les effets des paramètres environnementaux sur la sensibilité des bivalves aux maladies à l'aide d'expériences en milieu contrôlé et en milieu naturel (tâches 3 et 4) » afin de « produire un modèle de dissémination et de transmission des agents pathogènes qui pourra être utilisé pour améliorer la planification spatiale et le contrôle des maladies (tâche 5) sur le site atelier Rade de Brest ». Ce sujet de thèse est une opportunité de collaboration entre plusieurs laboratoires de l'Ifremer (Dyneco, LGPMM et PFOM-LEMAR), qui a été initiée dans le cadre du projet ANR Gigassat qui s'est terminé en décembre 2016, et qui permettra d'agréger écologie, pathologie et physiologie des bivalves. Ce projet de thèse, profitera de l'environnement scientifique du consortium VIVALDI ainsi que de la proximité des chercheurs de l'UMR 6529 LEMAR, de l'Institut Universitaire Européen de la Mer, et du LabexMer.

Au niveau national :

Ifremer/LGPMM : Benjamin Morga et Isabelle Arzul (pathologie des mollusques)

Ifremer/DYNECO : Stanislas Dubois (écologie benthique et diversité fonctionnelle des habitats), Antoine Carlier et Touria Bajouk (Cartographie des habitats), Cédric Bacher (modélisation).

Ifremer/LSEM : Dominique Hervio Heath (écologie microbienne)

LEMAR-CNRS : Christine Paillard (microbiologie et écologie des mollusques) et Ika Paul-Pont (écotoxicologie et épidémiologie)

Au niveau international :

Colleen A. Burge (University of Maryland) et Richard J. Whittington (University of Sydney) sont membres du comité international du projet Vivaldi, et l'étudiant pourra profiter des échanges en cours avec ces deux partenaires dans le cadre de bourse de mobilité de la direction scientifique de l'Ifremer et du LabexMer. Colleen et Richard s'intéressent notamment au rôle des communautés de filtreurs sur le risque d'épizootie.

*6-Pertinence du projet au regard du DIS de rattachement (et/ou du DIS secondaire). Si « projet blanc », préciser les raisons de ce choix :*

Région Bretagne - Fiche Projet ARED

**Allocations de recherche doctorale (ARED)**

**Fiche projet 2017**

Ce projet s'inscrit pleinement dans le DIS 3/ Activités maritimes pour une croissance bleue, D Nouveaux modèles d'exploitation des ressources vivantes aquatiques (pêche et aquacultures). En effet, selon les résultats obtenus, ce travail permettra de proposer des pistes de gestion des maladies en milieu marin par la gestion des habitats et de la diversité biologique (aquaculture multi espèces pour limiter le risque d'épizootie par exemple). De plus, ce travail contribuera au développement d'un modèle hydro-épidémiologique de transmission des maladies infectieuses dans les écosystèmes conchylicoles en rade de Brest. Plus généralement, ce projet contribuera à intégrer le risque infectieux dans la gestion des écosystèmes marins, un élément clé de la durabilité des écosystèmes ostréicoles (Pernet et al. 2016).

7-Autres informations utiles (projet relevant des Objets d'excellence -OBEX-, ou des « Projets émergents de recherche » régionaux...):

**6- Projet de thèse en cotutelle internationale**

- **S'agit-il d'un projet de thèse en cotutelle internationale** (oui/non) : non mais une mobilité internationale sera proposé à l'étudiant avec les laboratoires internationaux impliqués (USA, Australie, voir section 5)

- **Si oui, préciser l'établissement pressenti** (et le pays de rattachement) :

- **Ce projet de thèse fera-t-il l'objet d'un cofinancement international** (oui/non) : non

(Rémunération du doctorant par l'établissement implanté sur le territoire régional (18 mois sur 36 mois), et l'établissement étranger, qui s'engage également à rémunérer le doctorant dans le cadre de son séjour à l'étranger, soit durant 18 mois -a minima-)

- **En cas de cofinancement international, préciser -si vous en avez connaissance- l'organisation du calendrier des périodes de séjour :**

**7- Financement du projet de thèse**

- **Part de l'enveloppe financière régionale affectée au projet :**

Financement Région 100 %

Financement Région 50 % (préconisé)

- **En cas de financement à 50 %, le cofinancement est-il déjà identifié** (oui/non) : oui

- **Si oui, préciser la nature du cofinancement** (ANR, partenaire privé, Ademe, etc.) : Projet européen H2020

Région Bretagne - Fiche Projet ARED



<b>Allocations de recherche doctorale (ARED)</b>	<b>Fiche projet 2017</b>
--	--------------------------

VIVALDI (2016-20): Scientific basis and tools for preventing and mitigating farmed mollusc diseases. Ce financement sera versé au doctorant par l'Ifremer qui a obtenu la recette de l'Europe.

- **Si le cofinancement n'est pas encore confirmé, date prévue de réponse du cofinancier :**

- **En cas de non-obtention du cofinancement demandé, une autre source de cofinancement est-elle identifiée (oui/non) :**

*NB : attestation d'obtention d'un cofinancement ou à défaut, de la demande effectuée, à joindre au dépôt de cette fiche-projet.*

→ **Ce document est à renvoyer par l'établissement porteur pour le 29 janvier au plus tard à :**  
[ared@bretagne.bzh](mailto:ared@bretagne.bzh) en mettant en copie l'ED concernée, ainsi que votre référente ARED au service SDENSU de la Région Bretagne : [caroline.mével@bretagne.bzh](mailto:caroline.mével@bretagne.bzh)