

Direction des opérations
 Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon, Ifremer, Sète
 Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires UMR CNRS / Ifremer / UM2 / IRD Université
 Montpellier II
 UMR M100 – Ifremer / Université de Caen Basse Normandie.
 Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade
 Centre de Méditerranée, Ifremer, La Seyne/Mer
 Laboratoire Environnement Ressource Provence-Azur-Corse, Ifremer, La Seyne/Mer

Fabrice Pernet
 Jean Barret
 Patrik Le Gall
 Nathalie Malet
 Annie Pastoureaud
 Dominique Munaron
 Julien De Lorgeril

Evelyne Bachère
 André Vaquer
 Arnaud Huvet
 Charlotte Corporeau
 Julien Normand
 Pierre Boudry
 Jeanne Moal

Claudie Quéré
 Virgile Quillien
 Jean Yves Daniel
 Jean-François Pépin
 Denis Saulnier
 Jean Louis Gonzalez
 Marc Bouchoucha

Avril 2010 - RST.DOP/LER/LR 10-008

Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009

Rapport intermédiaire



Culture de naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau (P. Le Gall, Ifremer)

Mortalité printanière du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009

Rapport intermédiaire

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input type="checkbox"/> restreinte : <input checked="" type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique :		date de publication : Avril 2010 nombre de pages : 86p bibliographie : oui illustration(s) : 31 figures, 9 photos langue du rapport : française
Titre de l'article : Mortalité printanière du naissain d'Huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> dans l'étang de Thau en 2009		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif <input type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal (aux) : Pernet F.	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Direction des opérations / Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon	
Contributeur(s) : Barret J, Le Gall P, Malet N, Pastoureau A, Munaron D. De Lorgeril J, Bachère E, Vaquer A. Huvet A, Corporeau C, Normand J, Boudry P, Moal J, Quéré C, Quillien V, Daniel JY. Pépin JF, Saulnier D. Gonzalez JL. Bouchoucha M.	Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon, Ifremer, Sète Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires UMR CNRS / Ifremer / UM2 / IRD Université Montpellier II UMR M100 – Ifremer / Université de Caen Basse Normandie. Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade Centre de Méditerranée, Ifremer, La Seyne/Mer Laboratoire Environnement Ressource Provence-Azur-Corse, Ifremer, La Seyne/Mer	
Cadre de la recherche : Action ADECOM		
Destinataire : Ifremer, Affaires Maritimes, Région LR, Département 34, Cepralmar		

Résumé

Cette étude conduite en Méditerranée pendant un épisode de mortalité massive du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* généralisé en France en 2009 a pour objectifs d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain, d'identifier les pratiques culturales à risque, et d'approfondir des pistes visant à la réduction de ces mortalités. Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons suivi les paramètres environnementaux de l'étang de Thau en relation avec la mortalité. Par ailleurs, nous avons réalisé une expérience visant à comparer les performances des huîtres en fonction de leur origine, stade de développement et site de culture, en relation avec l'énergétique, la reproduction et la pathologie. Finalement, nous avons fait des expériences de transfert d'huître d'un milieu exempt de mortalité vers l'étang de Thau où des mortalités massives ont été enregistrées. L'analyse des paramètres environnementaux de l'étang de Thau montrent que le seul point commun entre les années à mortalité d'huître (2008-09) est la biomasse phytoplanctonique remarquablement constante et faible par rapport aux moyennes décennales. Les mortalités d'huîtres en 2009 touchent spécifiquement le naissain quelles que soient l'origine et la ploïdie, lorsque la température de l'eau atteint 17.5°C. Par rapport aux années précédentes, la mortalité s'intensifie et le seuil thermique de déclenchement est abaissé de ~2°C. Les huîtres maintenues en mer profonde demeurent indemnes. Le démarrage des mortalités de naissain coïncide avec une accélération du taux de croissance alors qu'il semble y avoir un déficit énergétique avant le déclenchement des mortalités qui fragiliserait particulièrement le naissain caractérisé par des réserves énergétiques inférieures aux adultes. Le démarrage des mortalités coïncide avec l'initiation de l'activité gamétogénique, avant l'atteinte de la maturité sexuelle et bien avant la ponte ce qui est plutôt atypique. Enfin, l'apparition des mortalités coïncide avec une infection soudaine et imprévisible par le virus herpès OsHV-I dans le naissain d'huître suggérant que ce dernier est impliqué dans le phénomène de mortalité. Le transfert d'huîtres triploïdes saines maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau au printemps conduit à une infection massive par le virus herpès, visible dès le 1^{er} prélèvement après seulement 6 jours. Les charges virales sont maintenues à des niveaux élevés jusqu'à la fin de l'expérience après 18 jours, où la mortalité moyenne constatée des huîtres est de 84%. D'un point de vue plus appliqué, nous avons constaté que le risque de mortalité en 2009 est d'autant plus élevé que les animaux sont petits, coïncidant notamment avec des différences marquées en énergie de réserve entre naissains et adultes. Une pratique culturale pour limiter la mortalité consisterait à éviter de déployer des animaux de taille < 30 mm fin mars, c'est à dire éviter les opérations de pré grossissement au printemps en faveur du pré grossissement automnal. Les naissains sont touchés de la même façon par les surmortalités quelles que soient leur origine (naturel vs. éclosion) et leur ploïdie (2n vs 3n), de sorte qu'il n'est pas possible de favoriser une voie d'approvisionnement en naissain plus qu'une autre pour limiter la mortalité. Finalement, il semble que l'ostréiculture en mer profonde puisse être une voie intéressante pour sécuriser le pré grossissement.

Abstract

This study was conducted in the Mediterranean area during a mass mortality event of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The objective of this work was to increase our understanding of the mass mortality phenomena in Pacific oysters, to identify risky cultivation practises and to propose mitigation strategies. In the first part of this work, we followed environmental parameters of the Thau lagoon in relation with mortality events. Then, we compared mortality and growth parameters of oysters as a function of their origins, their development stages and cultivation sites in relation with energetic, reproduction and pathogens. Finally, we conducted transfer experiments where oysters maintained free of mortality in open sea were transferred in the Thau lagoon where mass mortality occurred. From the environmental standpoint, we showed that mortality of oysters in the Thau lagoon occurred during years where phytoplankton levels are low (2008-09) compared to averaged values recorded in 1996-2007. Mortality of oysters specifically hit one year-old animals irrespective of their origins and ploidy levels, when seawater temperature reached 17.5°C. Compared to the two previous years, mortality has increased and temperature threshold decreased of ~2°C. Mortality of one year-old oysters coincides with accelerated growth rates and energetic weakness. In contrast to the well known summer mortality model developed during the Moresst project, mortality in 2009 was observed while oysters were at the onset of gametogenesis which suggests that reproductive effort is not pivotal. Mortality also coincides with elevated viral load of the OsHV-1 herpes in oysters, so that virus may have played a major role in this mortality event. Finally, our study show that oysters maintained in open sea at 22m deep exhibited no mortality. However, when these animals were transferred into the Thau lagoon in spring, mortality reached 84% after only 18 d. This mortality event again coincided with a massive infection by the virus herpes. From a practical standpoint, we showed that mortality increased as a function of size of oysters: larger animals survive better than smaller ones. This agrees well with the fact that large oysters were characterized by higher levels of energy reserves. In order to reduce mortality, growers may want to deploy animals larger than 30 mm shell length at the end of March, which clearly means reducing seeding in spring at the benefit of the fall. Young oysters suffered heavy losses irrespective of their ploidy and origins so that it is not possible to act on these factors to reduce the mortality. Finally, it seemed that maintenance of young oysters in open sea allow protecting them from the mortality risk.

Mots-clés

Huître creuse, Mortalité, Virus herpès, Énergétique, Reproduction, Environnement, Pratiques culturelles.

Words keys

Pacific oyster, Mortality, Herpes virus, Energetic, Reproduction, Environment, Cultivation practises.

Sommaire

Fiche documentaire	5
1. Synthèse	11
2. Introduction	14
2.1. Contexte général.....	14
2.2. Contexte Méditerranéen	15
2.3. Objectifs généraux	16
3. Matériel et Méthode	18
3.1. Sites d'étude	18
3.2. Caractérisation environnementale	19
3.2.1. Caractérisation générale	19
3.2.2. Suivi de la qualité de l'environnement nutritionnel sur Thau	19
3.2.3. Suivi des contaminants organiques hydrophiles et métaux traces sur Thau	21
3.3. Plan d'expérience.....	23
3.3.1. Effet de l'origine, de la ploïdie et de l'âge des huîtres dans l'étang de Thau	23
3.3.2. Effet du site de culture	24
3.3.3. Effet du transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau	25
3.4. Prélèvements	26
3.4.1. Indices de condition	26
3.4.2. Histologie	26
3.4.3. Pathologie	28
3.4.4. Analyses biochimiques	29
3.5. Modélisation DEB.....	33
4. Résultats	35
4.1. L'environnement.....	35
4.1.1. Caractérisation générale	35
4.1.2. Suivi de l'environnement nutritionnel dans l'étang de Thau	37
4.1.3. Suivi des contaminants organiques hydrophiles sur Thau	43
4.1.4. Conclusion	44
4.2. Effet de l'origine, de la ploïdie et de l'âge des huîtres dans l'étang de Thau	46
4.2.1. Mortalité	46
4.2.2. Croissance	49
4.2.3. Reproduction	54
4.2.4. Energétique	57
4.2.5. Pathologie	61
4.2.6. Métabolisme oxydatif et acides gras membranaires	62
4.2.7. Conclusion	65
4.3. Effet du transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau.....	67
4.3.1. Mortalité	67
4.3.2. Pathologie	68
4.3.3. Energétique	69
4.3.4. Environnement nutritionnel.....	70
4.3.5. Métabolisme oxydatif et acides gras membranaires	72
4.3.6. Effet du transfert mer - étang en automne.....	73
4.3.7. Conclusion	74
5. Conclusions générales et perspectives	75
5.1. Les mortalités 2009 sur Thau: un phénomène différent du modèle connu	75
5.2. Retombées du projet.....	76
5.3. Ailleurs en France	77
5.4. Perspectives.....	78
5.4.1. Analyses des mortalités 2009.....	78
5.4.2. Expérience 2010	80



6. Bibliographie	82
------------------------	----



1. Synthèse

Ce rapport fait état d'une étude conduite pendant un épisode de mortalité massive du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* en France en 2009. Des mortalités de naissain d'huître ont été enregistrées dans la plupart des secteurs conchylicoles en 2008, déclenchant la crise la plus importante de la filière ostréicole depuis l'introduction de *C. gigas* en France dans les années 1970.

Ce projet a pour objectifs d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain, d'identifier les pratiques culturales à risque en examinant l'effet de l'origine du naissain (écloserie/naturel, 2n/3n), le stade de développement (naissain/1/2 élevage et élevage) et le site de culture (Etangs de Thau et de Diana, mer ouverte) sur la mortalité, et d'approfondir des pistes visant à la réduction de ces mortalités, qui pourraient apporter des solutions concrètes de « sortie de crise ».

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons suivi les paramètres environnementaux de l'étang de Thau en relation avec la mortalité. Par ailleurs, nous avons réalisé une expérience visant à comparer les performances des huîtres en fonction de leur origine, stade de développement et site de culture, en relation avec l'énergétique, la reproduction et la pathologie des huîtres. Finalement, nous avons fait des expériences de transfert d'huître d'un milieu exempt de mortalité (mer ouverte) vers l'étang de Thau où des mortalités massives ont été enregistrées.

L'analyse des paramètres environnementaux sur Thau montre que les années 2008 et 2009, toutes deux caractérisées par des mortalités massives de naissains d'huîtres creuses, présentent des différences thermiques et pluviométriques hivernales marquées : l'hiver 2008 fut doux et sec alors que 2009 était froid et pluvieux. Le seul point commun entre ces deux années à mortalité du point de vue de l'environnement globale de l'étang de Thau est la biomasse phytoplanctonique remarquablement constante et faible par rapport aux moyennes décennales.

Les mortalités d'huîtres creuses en 2009 touchent spécifiquement le naissain quelles que soient l'origine et la ploïdie, lorsque la température de l'eau atteint 17.5°C. Par rapport aux années 2007 et 2008, la mortalité s'intensifie et le seuil thermique de déclenchement est abaissé de ~2°C, de sorte que les mortalités habituellement « estivales » sont plutôt « printanières ». Alors que les mortalités touchent les huîtres cultivées dans les étangs de Thau et de Diana, les huîtres maintenues en mer à -22m au large de Marseillan demeurent indemnes.

Le démarrage des mortalités de naissain constaté le 11 mai coïncide avec une accélération du taux de croissance de l'huître qui double ou triple selon le descripteur utilisé (longueur de coquille ou masse sèche de chair), alors que les animaux âgés de plus d'un an qui ne subissent pas de surmortalité maintiennent des taux de croissance stable pendant cette période.

D'autre part, le démarrage des mortalités de naissain coïncide avec l'initiation de l'activité gamétogénique, avant l'atteinte de la maturité sexuelle et bien avant la

ponte. Ce décalage entre la maturité sexuelle et l'apparition des mortalités est plutôt atypique. Les observations faites en 2008 sur Thau ou plus généralement dans le cadre du défi Morest (programme de recherche de l'Ifremer mené entre 2001 et 2006 sur les mortalités estivales d'huîtres creuses) montraient que l'apparition des mortalités succédait à l'atteinte de la maturité sexuelle et se situait proche de la période de ponte.

L'analyse de la dynamique de l'énergie représentée par les réserves et obtenue par modélisation suggère que les huîtres sont entrées dans une période de déficit énergétique 21 jours avant le constat des mortalités. Compte tenu que les réserves énergétiques des naissains sont inférieures à celles des adultes, les naissains sont probablement plus sensibles à un déficit énergétique que les adultes. Enfin, les lots de naissain présentent des capacités de production d'énergie similaires à celles des adultes alors que nous nous attendions à ce quelles soient supérieures. Par conséquent, les résultats obtenus par voie de modélisation bioénergétique, analyse des sucres totaux ou enzymologie vont tous dans le sens d'un déficit énergétique avant le déclenchement des mortalités qui fragiliserait particulièrement le naissain caractérisé par des réserves énergétiques inférieures aux adultes.

Enfin, l'apparition des mortalités coïncide avec une infection soudaine et imprévisible par le virus herpès OsHV-I dans le naissain d'huître suggérant que ce dernier est impliqué dans le phénomène de mortalité. Le transfert d'huîtres triploïdes saines maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau conduit à une infection massive par le virus herpès, visible dès le 1^{er} prélèvement après seulement 6 jours. Les charges virales sont maintenues à des niveaux élevés jusqu'à la fin de l'expérience après 18 jours, où la mortalité moyenne constatée des huîtres est de 84%.

D'un point de vue plus appliqué, nous avons constaté que le risque de mortalité en 2009 est d'autant plus élevé que les animaux sont petits, coïncidant notamment avec des différences marquées en énergie de réserve entre naissains et adultes. Nos résultats suggèrent qu'une pratique culturale pour limiter la mortalité consisterait à éviter de déployer des animaux de taille < 30 mm fin mars, c'est à dire éviter les opérations de pré grossissement au printemps en faveur du pré grossissement automnal.

D'autre part, nous avons constaté que les naissains sont touchés de la même façon par les surmortalités quelles que soient leur origine (naturel vs. éclosion) et leur ploïdie (2n vs 3n). Par conséquent, il n'est pas possible, à l'heure actuelle, sur la base des données acquises dans le cadre de ce projet, de favoriser une voie d'approvisionnement en naissain plus qu'une autre pour limiter le risque de mortalité.

Nous avons constaté que les naissains déployés en mer ouverte à 22m de profondeur n'ont pas souffert de surmortalité. Malgré l'absence de données scientifiques antérieures à 2009 sur ce site, il semble que cela ait été également le

cas en 2007 et 2008, de sorte que l'ostréiculture en mer profonde peut être une voie intéressante, au moins pour sécuriser le pré grossissement.

Cependant, le transfert d'huîtres triploïdes saines maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau début juin conduit à une infection massive par le virus herpès et une mortalité quasi totale du lot après 18 jours. En revanche, le transfert d'huîtres appartenant au même lot en période automnale lorsque la température de l'eau descend sous 17°C est un succès. Aussi, le potentiel du pré grossissement en mer doit être étudiée de façon plus approfondie afin de vérifier notamment si le naissain protégé du risque de mortalité par isolement en période à risque est résistant quelques mois ou une année plus tard dans un milieu plus agressif en période à risque.



2. Introduction

2.1. Contexte général

Depuis la fin des années 70, des évènements épisodiques à grande échelle tels que des épidémies, des mortalités massives, des efflorescences d'algues toxiques et autres explosions de populations se sont produits dans l'environnement marins à des taux sans précédent historique (Harvell et al. 1999, Hayes et al. 2001, Harvell et al. 2002, Lafferty et al. 2004, Mydlarz et al. 2006). Plusieurs espèces d'invertébrés d'importance économique et écologique sont affectées par des épisodes de mortalités massives (Mydlarz et al. 2006). Bien que le phénomène de mortalité massive soit souvent associé à des agents infectieux, il reflète souvent des changements environnementaux et un équilibre énergétique défavorable chez l'animal. Un modèle d'interaction qui inclut l'animal, ses agents infectieux et l'environnement, a été récemment développé pour expliquer les mortalités estivales d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en France dans le cadre du défi Morest, un programme de recherche multidisciplinaire mené par Ifremer en 2001-2006 (Samain & McCombie 2008).

Les mortalités d'huîtres creuses sont communément appelées « mortalités estivales » puisqu'elles se produisent lorsque la température de l'eau augmente jusqu'à atteindre 19-20°C pendant la période estivale. Au delà de cette température, les huîtres sont généralement en période de pré ponte, un état reproducteur caractérisé par un budget énergétique négatif : les ressources énergétiques sont au plus bas alors que la demande énergétique et l'effort reproducteur sont maximum (Soletchnik et al. 1997, Berthelin et al. 2000, Delaporte et al. 2006, Soletchnik et al. 2006, Samain & McCombie 2008). Au même moment, les hémocytes, qui sont les cellules responsables des défenses immunitaires chez les mollusques, sont moins performants (Delaporte et al. 2006, Gagnaire et al. 2006, Li et al. 2009). Finalement, bien que peu d'information concernant l'effet de la température sur la virulence des agents infectieux soit disponible, 19-20°C représente probablement un seuil au-delà duquel l'activité métabolique des agents infectieux est élevée (Samain & McCombie 2008). Par conséquent, les huîtres en période de pré ponte sont caractérisées par un affaiblissement énergétique et immunitaire qui les rend plus sensibles aux agents infectieux. Toutefois, les caractéristiques physiologiques des huîtres pendant la reproduction et leurs agents infectieux ne sont généralement pas suffisantes pour déclencher les mortalités : des stress environnementaux sont également nécessaires.

La productivité primaire dans les zones côtières augmente avec l'apport en nutriments qui eux mêmes varient en fonction des apports d'eaux douces du bassin versant et des apports anthropogéniques. Des pluies excessives et des apports en nutriments massifs peuvent conduire à de l'eutrophisation, en augmentant la production primaire et causant la dégradation des habitats

benthiques par la diminution du niveau d'oxygène dissout et des conditions redox du sédiment et de l'eau (e. g. Kemp et al. 2005). Par conséquent, l'eutrophisation a longtemps été considérée comme un facteur déclenchant les mortalités d'huîtres (Mori 1979). Des études récentes montrent que des concentrations élevées de phytoplancton favorisent l'émergence de mortalités estivales en augmentant l'effort reproducteur des huîtres au détriment du système de défense (Delaporte et al. 2006, Samain & McCombie 2008). Par conséquent, les facteurs environnementaux tels que les précipitations, les apports d'eaux douces, la production primaire et l'hypoxie sont liés et peuvent contribuer à déclencher des mortalités chez des huîtres déjà affaiblies par leur état reproducteur.

Les mortalités massives d'huîtres *C. gigas* sont rapportées partout où cette espèce est cultivée : au Japon (Mori 1979), aux USA (Perdue et al. 1981, Cheney et al. 2000, Friedman et al. 2005), et en Europe de l'Ouest (France: Soletchnik et al. 2007, Germany: Watermann et al. 2008, Ireland: Malham et al. 2009). Pendant l'été 2008, les mortalités d'huîtres âgées d'un an et moins se sont produites simultanément sur toutes les côtes françaises. Cet événement de mortalité représente la crise écologique la plus importantes pour l'industrie française depuis l'introduction de l'espèce dans les années 70. Les jeunes huîtres âgées d'un an ont été décimées à 40-100% selon les sites et les lots alors que les animaux plus âgés semblent avoir été moins affectés. Ces mortalités massives de naissain se sont reproduites en 2009 et représentent l'objet de notre étude.

2.2. Contexte Méditerranéen

Contrairement aux épisodes de mortalités enregistrés au cours des décennies précédentes, les huîtres cultivées dans les lagunes Méditerranéennes ont été sévèrement touchées en 2007 et 2008 (Pernet et al. 2010) : année 2008, 85% de mortalité sur le naissain. Pour la seule année 2008, la perte financière provoquée par les mortalités de naissain au niveau des entreprises de production conchylicoles de la région Languedoc-Roussillon est estimée à près de 8 M€. Ces mortalités représentent une menace très sérieuse pour l'économie de la filière méditerranéenne et la santé d'entreprises qui reposent sur la quasi-monoculture de l'huître creuse, déjà fragilisées en 2006 (malaïgue à Thau et fermeture de commercialisation due à la présence de phycotoxine à Leucate).

Suite aux mortalités survenues en 2007 (voir <http://www.ifremer.fr/lerlr/actualites/mortnaissain.htm>), un partenariat Cépralmar, Ifremer et professionnels avait mis en place en 2008 un suivi de cinq lots de naissain en élevage. Jusqu'ici, aucune donnée précise sur les mortalités de naissains n'existait pour la région Méditerranée où les conditions hydro-climatiques sont différentes de celles observées en Manche et Atlantique. Le suivi mis en place en 2008 a permis d'obtenir une cinétique précise des mortalités en relation avec les paramètres hydro-climatiques du milieu, la dynamique des réserves énergétiques chez les huîtres et certaines variables biochimiques

associées au métabolisme de base, à l'acclimatation thermique et à la qualité de la ressource trophique (Pernet et al. 2010).

Brièvement, le suivi de cinq lots d'huîtres différents par leur origine (écloserie/sauvage) et ploïdie (2n/3n) montre que la mortalité s'est produite en deux épisodes : entre le 13 mai et le 10 juin puis entre le 24 juin et le 9 juillet (Pernet et al. 2010). Le lot d'huître sauvage subit la mortalité plus tôt que les lots d'huîtres d'écloserie, mais la mortalité finale était de 85% dans tous les groupes. La mortalité se produit lorsque la température est $> 19\text{ }^{\circ}\text{C}$, pendant la période de reproduction, alors que les réserves énergétiques étaient au plus bas. La période du 10 au 24 juin précédant le second épisode de mortalité est caractérisée par un amaigrissement des huîtres (diminution de la teneur en matière organique de 20%), une diminution de 60% de la concentration en sucre dans la matière organique, et un arrêt de l'accumulation des lipides neutres (réserve), témoignant ainsi d'un affaiblissement des huîtres. Cet affaiblissement ne semble pas uniquement lié à la ponte mais également à une ressource trophique limitante : valeur de Chlorophylle *a* et concentration de phytoplancton inférieure à la moyenne décennale, reflétant un hiver précédent particulièrement sec.

2.3. Objectifs généraux

La Section Régionale de la Conchyliculture de la Méditerranée (SRCM), l'Ifremer et le Cépralmar sont à l'initiative d'un projet bi annuel qui prolongera à partir de 2009, en l'affinant, le suivi des mortalités d'huîtres mis en place en 2008 dans les lagunes méditerranéennes. Ce projet a pour objectifs :

- d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain en documentant, à moyen terme (3 ans incluant 2008), la dynamique et la variation interannuelle des mortalités d'huîtres en relation avec les variations des paramètres environnementaux et climatiques;
- d'identifier les pratiques culturales à risque en examinant l'effet de l'origine du naissain (écloserie/naturel, 2n/3n), le stade de développement (naissain/1/2 élevage et élevage) et le site de culture (Etangs de Thau et de Diana, mer ouverte) sur la mortalité;
- et d'approfondir des pistes visant à la réduction de ces mortalités, qui pourraient apporter des solutions concrètes de « sortie de crise », à court ou moyen terme, pour les professionnels.

Ce projet est dimensionné par rapport aux conditions locales (environnement et techniques d'élevage particuliers) afin d'apporter des éléments de réponse et des pistes d'actions spécifiques à la filière régionale.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons suivi les paramètres environnementaux de l'étang de Thau en relation avec la mortalité. Par ailleurs, nous avons réalisé une expérience visant à comparer les performances des huîtres en fonction de leur origine, stade de développement et site de culture, en relation avec l'énergétique, la reproduction et la pathologie des huîtres. Finalement, nous avons fait des

expériences de transfert d'huître d'un milieu exempt de mortalité (mer ouverte) vers l'étang de Thau où des mortalités massives ont été enregistrées.

En parallèle, ce projet a permis de mettre à disposition les données de mortalité via des « bulletins mortalités » (10 n° + un spécial), en temps réel, sur le site du laboratoire environnement ressource du Languedoc Roussillon de l'Ifremer à l'adresse suivante : <http://www.ifremer.fr/delst/actualites/suivimortalite2009.htm> (annexe 1).



3. Matériel et Méthode

Afin de répondre aux objectifs pré cités de l'étude, nous avons suivi des huîtres provenant de différentes origines, l'environnement et les agents infectieux à partir du mois de mars 2009. Ce suivi se terminera en février 2010.

3.1. Sites d'étude

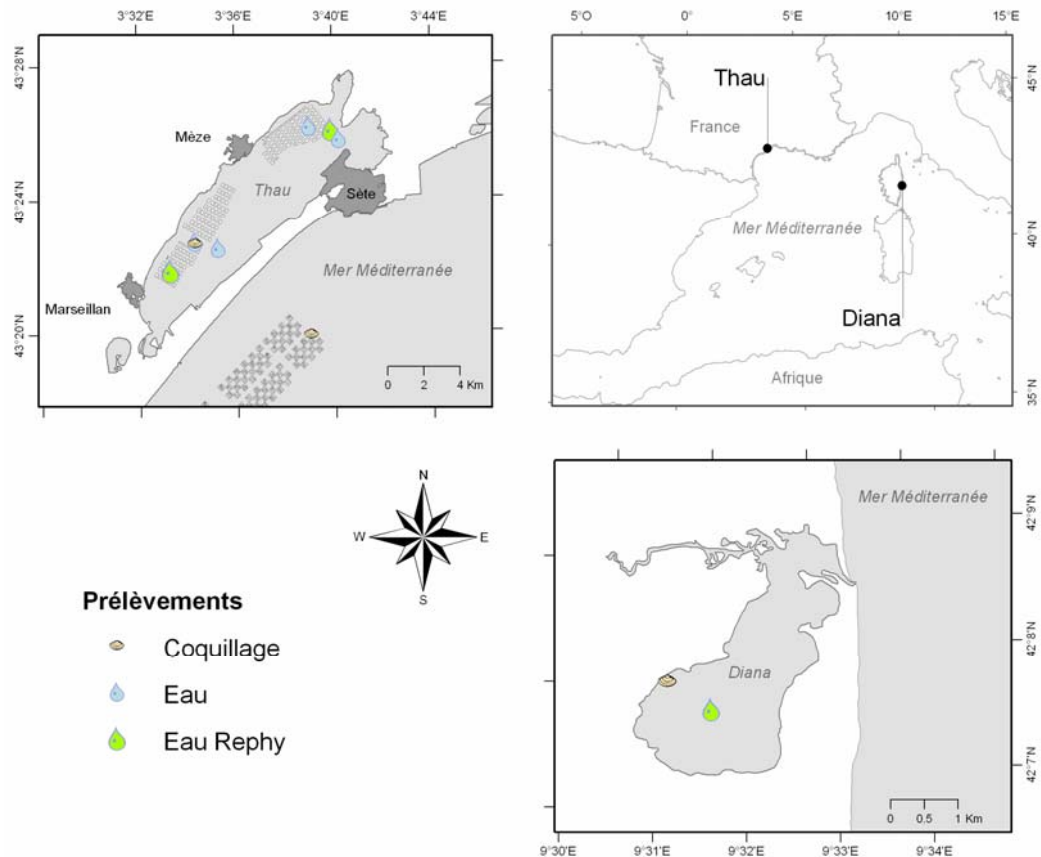


Figure 1. Carte des sites d'étude.

Un lot d'huître a été déployé sur l'étang de Thau, ainsi qu'en mer ouverte au large de Marseille sur des filières de moules et sur l'étang de Diana en Corse (Figure 1). Le choix de ces trois sites d'étude repose sur le fait que l'étang de Thau a été fortement touché par les mortalités d'huître en 2007 et 2008, alors que les deux autres sites d'étude sont restés exempts de mortalités. Les huîtres déployées sur l'étang de Thau ont été maintenues sur la table Ifremer localisée sur la zone de Marseille (Figure 1, Photo 1).



Photo 1. Table Ifremer localisée dans la zone de Marseillan (gauche) et pearlnet immergés contenant les naissains (droite).

3.2. Caractérisation environnementale

3.2.1. Caractérisation générale

Les sites expérimentaux localisés dans la lagune de Thau et en mer ouverte font l'objet d'un suivi de la température et de la salinité en haute fréquence (1 mesure toutes les 10 min) à l'aide de sondes multi paramètres STPS (NKE instrumentation, Hennebont, France).

Les trois sites d'étude font l'objet d'un suivi des températures (°C), salinités, teneur en chlorophylle *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) et concentrations et composition spécifiques en phytoplancton (cell L^{-1}) mesurées tous les 14 jours par le réseau REPHY de l'Ifremer (Réseau de suivi des phycotoxines). L'échantillonnage REPHY a lieu depuis 1984 sur la zone conchylicole de Bouzigues pour l'étang de Thau, au large de Sète pour la mer ouverte et dans l'étang de Diana sur les concessions conchylicoles en Corse (Figure 1). Ces données provenant du REPHY seront exploitées dans le cadre de ce projet.

3.2.2. Suivi de la qualité de l'environnement nutritionnel sur Thau

3.2.2.1. Pourquoi ?

La qualité de l'environnement nutritionnel des huîtres a un impact sur la croissance, la reproduction et la survie. Concernant l'effet de la nutrition sur la mortalité estivale de l'huître creuse, il a été montré que les huîtres placées sur le fond à 15 cm du sédiment dans la Baie de Marenne-Oléron présentaient des mortalités largement supérieures aux huîtres maintenues sur tables surélevées (Soletchnik et al. 2005). Ces différences de mortalités coïncidaient entre autres avec des variations marquées de la qualité nutritionnelle de l'environnement des huîtres placées à 15 cm comparativement aux huîtres maintenues à 70 cm qui bénéficiaient d'une nourriture de qualité plus stable dans le temps (Samain & McCombie 2008). Plus largement, le suivi de marqueurs qualitatifs de

l'environnement nutritionnel des huîtres en relation avec les paramètres hydrologiques du milieu permet de mieux comprendre la dynamique de la croissance des huîtres et plus généralement, la dynamique de l'écosystème conchylicole dans son entier.

3.2.2.2. Choix des indicateurs de qualité nutritionnelle du milieu

Pour caractériser l'environnement nutritionnel de l'huître d'un point de vue quantitatif, la teneur en chlorophylle est utilisée comme estimateur de la biomasse phytoplanctonique. En revanche, pour caractériser l'environnement trophique de l'huître d'un point de vue qualitatif, différents marqueurs de l'origine et du devenir de la matière organique peuvent être utilisés de manière complémentaire. Parmi ces marqueurs, les isotopes stables permettent, entre autres, de quantifier les interactions trophiques et distinguer les apports terrestres vs marins ou pélagiques vs benthiques (Fry 2007). Les profils en acides gras permettent d'identifier la contribution relative de groupes différents comme les bactéries, les diatomées, les dinoflagellés, de faire la distinction entre groupes de micro ou de macro algues, et confirmer les résultats de l'approche isotopique (Dalsgaard et al. 2003). L'analyse pigmentaire permet d'évaluer la contribution relative des grandes classes de phytoplancton dans l'échantillon prélevé (Jeffrey et al. 1997). Enfin, la cytométrie en flux et l'analyse en microscopie optique du phytoplancton permettent d'évaluer la contribution relative des groupes phytoplanctoniques en fonction de leur taille (nano, pico et micro phytoplancton).

3.2.2.2.1 Prélèvements d'eau

Les prélèvements d'eau destinés au suivi de la qualité de l'environnement nutritionnel de l'étang de Thau portent sur quatre points au total, localisés dans les zones conchylicole de Marseillan (où les huîtres sont déployées) et de Bouzigues, dans les tables à huître et hors tables (points larges, Figure 1). L'objectif est de caractériser l'environnement en fonction de la zone conchylicole (Marseillan vs. Bouzigues) et de la présence ou de l'absence d'huître (table vs. hors table).

Ces quatre points de prélèvements sont visités tous les 14 jours. La température et la salinité sont mesurées à l'aide d'une sonde WTW ProfiLab LF597-5 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et les échantillons d'eau sont prélevés entre 0.5 et 1.0 m de profondeur à l'aide d'une pompe automatique. L'eau est filtrée à 200 μm puis sur quatre filtres Whatman GF/F pour analyse de la masse totale, masse organique (MOP) et masse inorganique; analyse de la teneur en chlorophylle, analyse pigmentaire, analyse isotopique et composition en acides gras.

Les échantillons sur filtres sont conservés à -20°C (-80°C pour les acides gras et les pigments). Un échantillon d'eau formolée 2% (100 mL) est également conservé pour analyse en cytométrie en flux et détermination de la composition spécifique du phytoplancton à l'Université de Montpellier II (UMR Ecolog).

3.2.2.2.2 Prélèvements d'huîtres

La valeur isotopique ainsi que la composition en acides gras seront également déterminés sur les huîtres afin d'évaluer la contribution relative des différentes sources de carbone. Il est généralement accepté que la valeur isotopique du carbone mesuré dans la glande digestive de l'huître reflète assez bien les variations environnementales (Malet et al. 2007, Malet et al. 2008). De même, la composition en acides gras des lipides de réserve des mollusques bivalves reflète la nourriture ingérée.

3.2.2.2.3 Analyses

3.2.2.2.3.1 Isotope

Les analyses isotopiques sont effectuées sur deux lots d'huître : le naissain et les adultes issus de captage à Arcachon (voir section 3.3.1 pour l'origine des lots). A chaque campagne de prélèvement, trois individus provenant de trois cordes différentes sont maintenus en eau de mer filtrée sur Wathman GF/F à 0.7 µm pendant 24h afin de vider la glande digestive de son bol alimentaire. La glande digestive et le muscle adducteur de chaque individu sont prélevés séparément, immergés rapidement dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 10 %, v/v), rincés deux fois à l'eau distillée et conservés à -20°C. Ces tissus sont ensuite lyophilisés puis broyés en une fine poudre et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Environ 0.3 mg de poudre de tissu d'huître est placé dans une capsule d'étain. Les ratios isotopiques sont mesurés par un spectromètre de masse de rapport isotopique en flux continu (CF-IRMS, IsoPrime stable isotope mass spectrometer Micromass) couplé à un analyseur élémentaire EuroEA3024-IRMS (Eurovector). La précision de l'analyse de 10 échantillons consécutifs est < 0.15% pour N et C. Les résultats sont exprimés en notation standard en delta pour mille (δ ‰) en fonction du standard international, le V-PDB (Vienna Pee Dee Belmenite) pour le C et l'azote atmosphérique N₂ pour l'azote. Les ratios isotopiques stables sont exprimés selon la formule suivante :

$\delta^A X = [(R^{\text{échantillon}} / R^{\text{standard}}) - 1] 10^3 (\text{‰})$, où A est la masse atomique de l'isotope lourd de l'élément X, et R = ¹³C/¹²C pour le carbone et ¹⁵N/¹⁴N pour l'azote.

3.2.2.2.3.2 Acides gras

Les analyses d'acides gras sont effectuées sur les mêmes lots d'huître que ceux utilisés pour l'analyse isotopique. Les détails du prélèvement et de l'analyse sont présentés section 3.4.5.3.

3.2.3. Suivi des contaminants organiques hydrophiles et métaux traces sur Thau

La présence de contaminants organiques émanant des activités agricoles, essentiellement herbicides et pesticides, est considérée comme un facteur fragilisant les huîtres, pouvant contribuer au déclenchement des mortalités estivales (Samain & McCombie 2008). Par exemple, en Charente, le risque de toxicité attribuable aux herbicides est le plus élevé en juin et coïncide avec la période de gamétogenèse active et l'apparition des mortalités estivales. Les

herbicides peuvent agir directement sur l'huître en induisant du stress oxydatif ou des effets génotoxiques (Bouilly et al. 2003, Bouilly et al. 2007), ou indirectement, en influençant négativement la quantité et la qualité du phytoplancton (Samain & McCombie 2008).

En milieu aquatique, la plupart des contaminants chimiques sont présents à l'état de traces, notamment dans la fraction dissoute (voir Gonzalez et al. 2009). L'utilisation d'échantillonneurs passifs permet, pour certains composés, de les extraire et de les concentrer *in situ* réduisant ainsi une partie des difficultés et du coût lié à l'analyse des contaminants à l'état de traces. Les concentrations mesurées grâce à ces dispositifs sont représentatives de la concentration dans l'eau du contaminant sous forme dissoute intégrée dans le temps en fonction de la durée d'exposition *in situ* des échantillonneurs. L'information obtenue est une concentration moyenne des contaminants pendant la période d'exposition de l'échantillonneur.

Un objectif de cette étude consiste à examiner la dynamique de certains contaminants hydrophiles (pesticides) et métalliques sur Thau en relation avec les mortalités d'huîtres creuses. Nous avons mis en œuvre deux techniques d'échantillonnage passif décrites dans Gonzalez et al. (2009). Les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) sont des échantillonneurs intégratifs dédiés aux contaminants chimiques organiques polaires, utilisés pour les composés hydrophiles. Les DGT (Diffusive Gradients in Thin films: gradient diffusif en couche mince) sont utilisés pour suivre les métaux traces. Les DGT permettent une évaluation des espèces métalliques dissoutes les plus biodisponibles.

Ces échantillonneurs passifs sont déployés à chaque campagne de prélèvement d'huître sur Thau (voir section 2.3). Au total, 36 POCIS (phase Oasis HLB) et 21 DGT ont été déployés en triplicata à chaque campagne. Les POCIS sont immergés pendant 3-4 semaines alors que les DGT sont relevés après 48h. Les POCIS ont été dédiés à l'analyse de ~30 pesticides parmi lesquelles le Diuron, un composé très présent sur Thau dans la crique de l'angle (Gonzalez et al. 2009), dont les effets génotoxiques et immunitaires sur l'huître sont avérés (Bouilly et al. 2007). Les DGT retiennent et accumulent de nombreux éléments métalliques tels que Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, certains d'entre eux (Cd) ayant des effets sur le niveau d'aneuploïdie et les paramètres hématocytaires de l'huître creuse (Bouilly et al. 2006).





Photo 2. Echantillonneur passif de type POCIS en suspension dans la colonne d'eau (gauche), détail d'un POCIS après 20 jours d'immersion (centre), Echantillonneurs passifs de type DGT (droite).

3.3. Plan d'expérience

3.3.1. Effet de l'origine, de la ploïdie et de l'âge des huîtres dans l'étang de Thau

Dans le cadre de ce suivi il est proposé de documenter la cinétique des mortalités en 2009 tout en examinant, selon un plan d'expérience rigoureux, l'effet de plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la mortalité. Parmi ces facteurs, le stade de développement, l'origine et la ploïdie des huîtres ont été identifiés. Afin de mettre en évidence le caractère spécifique des mortalités, nous avons suivi deux lots de moule en parallèle.

Nous avons suivi sur l'étang de Thau:

- Deux lots d'huître placés en élevage (adulte, taille initiale de 80 mm), l'un est triploïde issu de 4 écloséries (pool) alors que l'autre est diploïde et provient initialement d'un site de captage à Arcachon (lot adulte de l'observatoire conchylicole national).
- Un lot d'huître placé en pré élevage (taille initiale de 50 mm), triploïde issu de 4 écloséries (pool).
- Six lots de naissain d'huître placés provenant d'une éclosérie A (2n et 3n), B (3n seulement), de 4 écloséries en mélange, de captage naturel de Marennes et de captage naturel de Arcachon.
- Deux lots de naissain de moule issus de captage naturel dans les étangs de Thau et de Berre.

Les animaux ont été reçus à la station Ifremer de Sète entre le 12 et le 17 mars 2009. Chaque lot de naissain a été placé en pearl nets (9) répartis sur 3 cordes indépendantes. Les animaux en ½ élevage et élevage sont maintenus en paniers australiens (9 par lots) afin d'éviter le collage des huîtres et faciliter la manutention. Ces structures d'élevage ont été déployées sur la table Ifremer localisée sur la zone de Marseillan (Figure 1, Photo 1). La première campagne de

mesure a été réalisée le 30 mars. Par la suite, les animaux ont été échantillonnés le 27 avril, 11 mai, 18 mai, 25 mai, 08 juin, 23 juin, 06 juillet, 27 juillet, 24 août, 21 septembre, 20 octobre et 30 novembre, le rapprochement du pas d'échantillonnage reflétant l'occurrence de surmortalités.

A chaque échantillonnage, les effectifs dans chaque panier contenant initialement 250 individus ont été dénombrés, en discriminant les individus morts (qui sont retirés) et vivants afin de déterminer le pourcentage de mortalité par rapport à l'échantillonnage précédent. Vingt-cinq individus par panier sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (Mitutoyo, Paris, France) relié à un ordinateur par USB et pesés à l'aide d'une balance de précision (Mettler-Toledo, Viroflay, France) après avoir enlevé les organismes fixés sur les coquilles (Photo 3 et 4). Ces animaux sont remis en panier alors que d'autres sont prélevés sans remise pour analyses ultérieures (voir section 3.4.).



Photo 3. Examen des huîtres une-à-une par panier (gauche) et atelier de biométrie (droite).



Photo 4. Adapteur USB pour pied à coulisse (gauche) et pied à coulisse digital (Mitutoyo, Paris, France).

3.3.2. Effet du site de culture

Le naissain d'huître triploïde provenant de l'écloserie B a été déployé en Corse dans l'étang de Diana où l'huître creuse est élevée en faible densité, et en mer ouverte, au large de Marseillan, sur filière de moules (Figure 1). Ces deux sites ont été choisis en raison du fait qu'ils ont été épargnés de la mortalité en 2008.

Les animaux déployés en Corse ont été maintenus dans des conditions similaires à celles des animaux élevés à Thau. En revanche, les huîtres déployées en mer ont

été élevées à 22 m de profondeur dans deux lanternes distinctes (10 étages par lanterne, 250 individus par étage).



Photo 5. Relevage en mer des lanternes contenant les huîtres.

3.3.3. Effet du transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau

Compte tenu des surmortalités observés entre le 11 et le 25 mai 2009 dans l'étang de Thau (voir section 4.2.1), nous avons transféré le 29 mai du naissain d'huître triploïde provenant de l'écloserie B maintenu en mer et exempt de mortalité, sur l'étang de Thau, où le même lot transféré en mars avait succombé. L'objectif de cette expérience additionnelle est de déterminer si le naissain transféré survit dans l'étang, et de suivre l'évolution des paramètres physiologiques et pathologiques des huîtres.

Brièvement, 750 individus prélevés aléatoirement dans les deux lanternes maintenues en mer ont été repartis dans trois paniers indépendants déployés sur la table Ifremer localisée dans la zone de Marseillan (250 individus par panier). La première campagne de mesure a été réalisée le 29 mai. Par la suite, les animaux ont été échantillonnés après 21h, 44h, 68h, 92, 139, 163, 283, 409, 426, 435 et 450h après le déploiement. Le rapprochement du pas d'échantillonnage à la fin de l'expérience reflète l'occurrence des surmortalités. A la fin de l'expérience, les animaux témoins maintenus en mer ont également été échantillonnés.

A chaque échantillonnage, les effectifs dans chaque panier contenant initialement 250 individus ont été dénombrés, en discriminant les individus morts (qui sont retirés) et vivants afin de déterminer le pourcentage de mortalité par rapport à l'échantillonnage précédent. A chaque point de prélèvement, 12 huîtres au total (4 par panier) ont été prélevées, broyées dans de l'eau de mer artificielle puis préparées en vue d'analyses microbiologiques et virales au LER/LR selon le protocole décrit section 3.4.3, et congelées à -80°C pour envoi et analyse ultérieure au laboratoire de génétique et pathologie de l'Ifremer à La Tremblade. Malheureusement, les échantillons expédiés de Sète vers La Tremblade par Cryoexpress sont arrivés décongelés et sont inexploitable. Cependant, les huîtres ont été également prélevées à 0, 139, 283 et 450h pour analyses biochimiques et moléculaires (voir section 3.4.4.). Ces tissus conservés à -80°C puis réduit en

poudre sous azote liquide à -196°C au LER/LR ont pu également servir aux analyses de détection de virus herpès et *Vibrio*.

Cette expérience a été renouvelée le 19 octobre 2009 de manière identique afin d'examiner le caractère saisonnier des mortalités. Seulement 300 individus ont été prélevés aléatoirement dans les deux lanternes maintenues en mer pour être repartis dans trois paniers déployés sur la table Ifremer (100 individus par panier). Les huîtres ont été prélevées le 19 octobre, 26 octobre (168h), 02 novembre (312h), 18 novembre (528h), et bien plus tard après le transfert le 21 décembre pour analyse en pathologie, biochimie et moléculaire.

3.4. Prélèvements

3.4.1. Indices de condition

Neuf individus par corde (3 huîtres par panier sur Thau et Diana, 3 huîtres aux étages 1, 5 et 9 des lanternes en mer ouverte) ont été prélevés. Les coquilles groupées par corde ont été pesées après séchage à 60°C pendant 48h (après avoir enlevé les organismes fixés). Les tissus groupés par corde ont été pesés frais puis après séchage à 60°C pendant 48h et brûlage à 450°C pendant 5h au four à



cendre.

Photo 6. Prélèvement des tissus d'huîtres (gauche) pour détermination de la masse sèche après séchage à 60°C sur coupelle en aluminium (droite).

3.4.2. Histologie

Les tissus des huîtres provenant de 9 individus par corde (3 huîtres par panier ou étage 1, 5 et 9 des lanternes en mer) ont été prélevés et inclus dans le mélange Davidson. Le muscle adducteur des huîtres a été proprement sectionné pour ouvrir l'animal sans abîmer les tissus périphériques. Une section médiane de tissu a été placée dans les cassettes d'histologie et imprégnée de paraffine dans un automate à inclusion qui déshydrate les tissus par plusieurs lavages à l'éthanol et au xylène avant de les imbiber de paraffine liquide. Les tissus ont été ensuite inclus dans un bloc de paraffine et refroidis jusqu'à solidification. Le bloc est débité en prisme autour du fragment de tissus. Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome à $5\mu\text{m}$. Le ruban est déplié dans un bain d'eau distillée chauffée à 38°C , et étalé sur

une lame microscopique. L'ensemble est laissé à sécher à l'étuve (37°C) 15 heures au moins, avant de subir la coloration.



Photo 7. Prélèvement et stockage des échantillons dans le mélange Davidson pour préparation des coupes histologiques.

Les tissus reproducteurs sont colorés avec un mélange hématoxyline-éosine. Les tissus sont déparaffinés par des bains successifs d'alcool absolu et claral, avant d'être plongés dans les colorants, et rincés par des bains d'alcool, puis claral. Une goutte de résine est alors apposée sur les tissus afin d'y placer une lamelle d'observation, l'évaporation du solvant assurant le durcissement de la résine et la fixation de la lamelle. L'ensemble lame + tissus colorés + lamelle est finalement laissé à sécher 24 heures sous hotte avant observation microscopique, pour s'assurer de l'élimination complète du claral.

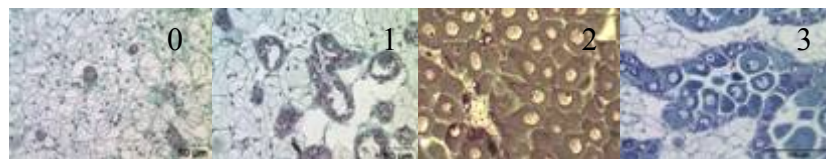


Photo 8. Détermination par histologie du sexe et du stade reproducteur selon une échelle de 0 (vide, indifférencié) à 3 (maturité). Chaque photo correspond à un stade de développement chez des individus femelles indiqué dans le coin supérieur droit.

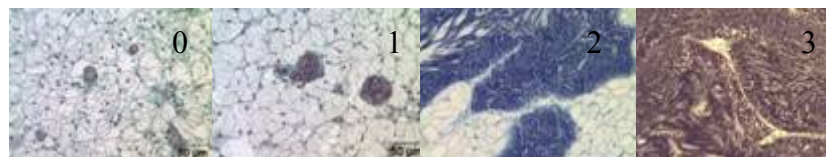


Photo 9. Détermination par histologie du sexe et du stade reproducteur selon une échelle de 0 (vide, indifférencié) à 4 (ponte). Chaque photo correspond à un stade de développement chez des individus mâles indiqué dans le coin supérieur droit.

Pour chaque individu, une coupe complète de la masse viscérale a été numérisée par un système de caméra numérique connectée à un ordinateur et montée sur une loupe binoculaire. Le stade de maturation a été évalué visuellement sous microscope selon les critères inspirés de Lango-Reynoso (2000) tel que décrit dans Normand et al. (2008). La mesure de l'occupation gonadique est effectuée à l'aide du logiciel Imaq Vision Builder (v6.0, National Instrument). L'image en

couleur est d'abord transformée en image en niveau de gris. Une sélection automatique de l'ensemble de la surface de la masse viscérale puis des tissus gonadiques est réalisée par contour manuel, la surface de l'image sélectionnée (correspondant à une zone de gris homogène) étant réglée finement pour chaque image. Les surfaces de la masse viscérale, et de la surface occupée par les tissus gonadiques en pixels sont alors exportées vers Excel.

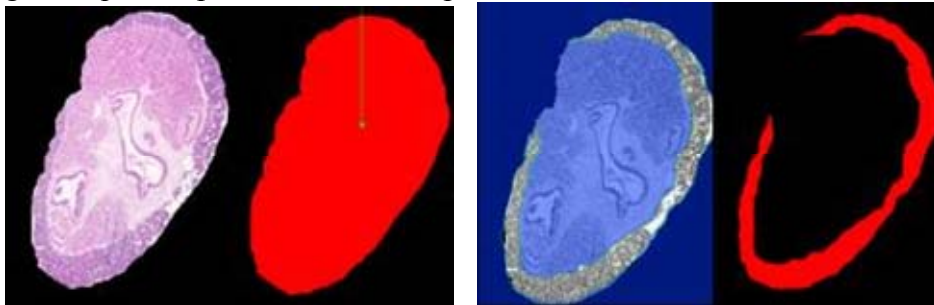


Photo 10. Détermination par histologie quantitative de la surface totale de la coupe (gauche) et de la surface occupée par les produits sexuels. Le rapport surface gonade / totale indique l'effort reproducteur des huîtres.

3.4.3. Pathologie

En période de surmortalité, des huîtres entières ont été expédiées sur lit de glace par Chronopost au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade (LGP) suivant une procédure similaire celle employé par le Réseau de pathologie des Mollusques de l'Ifremer (REPAMO). A réception, les animaux de longueur < 6mm sont traités en totalité avec la coquille (~200mg). Les animaux de taille comprise entre 6mm et 15mm sont décoquillés et traités en totalité (100-200mg). Les échantillons sont placés en tube Eppendorf (2 mL) et pesés. Quatre volumes d'eau de mer artificielle sont ajoutés pour 1 équivalent poids de tissu (20 mg pour 80µl deau) d'eau de mer artificielle (m/v). Les échantillons sont broyés avec un piston pellet puis centrifugés à 1000g. Nous procédons au prélèvement de 100 µl de surnageant congelé à -80°C pour analyse de portage herpès virus et 100 µl de surnageant auquel on ajoute 100 µl de Marine Broth + 30% de glycérol suivi d'une congélation à -80°C pour analyse des communautés microbiennes.

La préparation des échantillons et du milieu se fait en milieu stérile (sous la flamme). Tubes Eppendorf et embouts de micro pipettes sont préalablement autoclavés. L'ADN total des échantillons a été extrait au moyen d'un kit commercial, sur colonne QIAgen et l'ADN obtenu a été quantifié.

3.4.3.1. Recherche de l'herpès virus OsHV-1

La méthode analytique utilisée est basée sur une technique développée au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade et publiée (Pepin et al. 2008). Elle consiste en une amplification en temps réel basée sur la chimie SYBR green et l'utilisation du couple d'amorces DP-F/DP-R ciblant le gène de l'ADN polymérase du virus OsHV-1. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode. En cas de détection d'ADN viral d'OsHV-1, une

quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être mesurée et associée. Elle renseigne sur l'implication ou non de l'agent infectieux en cas de mortalité. Les charges virales supérieures à 1.10^4 copies/mg de tissu frais (ou 1.10^7 copies/g) sont le signe d'une répllication active du virus dans l'hôte et témoigne de son action dans le processus morbide.

3.4.3.2. Recherche de bactéries appartenant au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus*

La méthode analytique utilisée pour l'identification de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus* est basée sur une technique de PCR Taqman multiplex qualitative développée au Laboratoire de Génétique et Pathologie et en cours de publication (Saulnier et al., en préparation). Cette méthode s'inspire en partie de la méthode de quantification par PCRq de *V. aestuarianus* (Saulnier et al. 2009). Elle consiste en une amplification par PCRq multiplex d'ADN d'isolats bactériens, à l'aide du couple d'amorces et sonde Taqman (16S SpF2/16S SpR2 et 16S probe) pour *V. splendidus* et (DNAjF/DNAjR et DNAj probe) pour *V. aestuarianus*. Tous les isolats bactériens appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* sont détectés de façon spécifique. Ce groupe est actuellement représenté, en l'état actuel des connaissances, par huit espèces, génétiquement très proches: *V. lentus*, *V. cyclitrophicus*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. splendidus*, *V. kanaloae*, *V. gigantis* et *V. crassostreae*.

3.4.4. Analyses biochimiques

Les tissus des huîtres provenant de 9 individus par corde (3 huîtres par panier) sont prélevés et maintenus à -80°C avant d'être réduit en poudre à l'aide du vibrobroyeur à bille MM200 (Retsch, Eragny sur Oise, France) sous azote liquide à -196°C . Les poudres sont par la suite divisées en sous échantillons pour l'analyse des (1) sucres totaux (2) activités enzymatiques, (3) triglycérides et acides gras (4) ADN pour la détection de virus herpès et *Vibrio* et (5) ARN des huîtres (présenté en perspective du projet).

3.4.4.1. Sucres totaux et triglycérides

Les sucres et les triglycérides (une classe des lipides neutres) sont les réserves énergétiques principales des mollusques bivalves. Ces variables sont donc des indicateurs de l'état énergétique des huîtres. Notre hypothèse est que les mortalités succèdent à un affaiblissement énergétique tel qu'observé en 2008 sur Thau (Pernet et al. 2010) ainsi que durant le défi Morest (Samain & McCombie 2008).

3.4.4.1.1 Sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés selon la méthode de Dubois (1956). Brièvement, un échantillon de poudre (~ 200 mg) est dilué dans 3 mL d'eau MilliQ. L'échantillon est dilué d'un facteur 2.5, 5.0 ou $10.0 \times$ selon la concentration initiale en sucre. Un aliquot de l'échantillon dilué (250 μl) est mélangé avec 500 μl d'une solution de Phénol (5%) puis 2.5 mL de H_2SO_4 . Après 20 min., l'échantillon est placé dans un spectrophotomètre pour lecture de l'absorbance de l'échantillon à 490 nm et 600 nm. La densité optique (DO) est calculée selon la formule : $\text{DO} = \text{DO}_{490} - 1.5 \times (\text{DO}_{600} - 0.003)$. La concentration en sucre est par la suite calculée à partir d'une gamme étalon et exprimée en % de la masse sèche de tissu d'huître.

3.4.4.1..2 Classes de lipides

Un échantillon de poudre (~150 mg) est dilué dans 3 mL de mélange de Folch (chloroforme/méthanol 2:1 v/v) stocké à -80°C dans des tubes en verre de 4 mL munis de bouchons à vis, à joint en téflon, sous atmosphère d'azote. Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch (1957) puis déposés sur des Chromarods SIII (Iatron laboratories, Tokyo, Japon). Les classes de lipides sont séparées en immergeant la base des Chromarods SIII dans un système de solvant de polarité croissante tel que décrit dans Parrish (1999). Les classes de lipides sont quantifiées par un détecteur à ionisation de flamme (FID) d'un Iatroscan MK-VI (Iatron laboratories, Tokyo, Japon). Ces analyses sont en cours.

3.4.4.2. Activités enzymatiques

Nous avons suivi l'activité de la citrate synthase (CS), une enzyme clé du métabolisme énergétique impliquée dans la production d'énergie et l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme impliquée dans le système antioxydant et dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène ou ROS.

L'activité de la CS varie en fonction de l'état physiologique et reproducteur des mollusques (Garcia-Esquivel et al. 2002, Moran & Manahan 2004). Une étude récente montre que l'activité de la CS chez les larves d'huître *C. virginica* diminue avant un épisode de mortalité traduisant une baisse de la production d'énergie (Génard et al. soumis).

Les huîtres résistantes aux mortalités estivales présentent des niveaux plus faibles de ROS que les huîtres sensibles (Lambert et al. 2007, Samain et al. 2007) associant le phénomène de mortalité à un stress oxydatif. Le gène de la SOD est surexprimé 8 semaines avant les mortalités chez les huîtres sensibles, de sorte que l'expression de ce gène est considérée comme un indicateur précoce du risque de mortalité (Fleury et al. 2009, Fleury et al. sous presse).

La détermination de l'activité enzymatique est basée sur le taux de consommation d'un cofacteur que l'on suit par spectrophotométrie. Les analyses sont réalisées à température ambiante (25°C). La consommation ou la production du cofacteur permet d'évaluer la cinétique ou la variation dans le temps (10 minutes avec une mesure toute les 10 secondes) de la concentration d'un substrat spécifique à l'activité de l'enzyme. L'unité internationale de l'activité enzymatique U correspond au nombre de μ moles de substrat converti par minute et par mg de protéine.

3.4.4.2..1 Citrate synthase (CS)

La CS transfère le groupe acyl de l'acétyl coenzyme A à l'oxaloacetate formant le citrate. Le protocole de cette réaction est basé sur la réaction du DTNB ou 5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) avec le groupe -SH du coenzyme A libre. Le NTB ou 2-nitro (acide 5-thiobenzoïque) produit est de couleur jaune et absorbe à 412 nm. L'activité de la CS est déterminée dans 100 mM de tampon Tris/HCl (pH 8 à 25°C) contenant 0.2 mM d'acétyl co-enzyme A et 0.1 mM de DTNB. La réaction s'effectue avec 20 μ l d'échantillon auxquels on ajoute 20 μ l d'oxaloacétate 500 μ M et 160 μ l de milieu réactionnel.

3.4.4.2..2 Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La méthode d'analyse de la SOD est basée sur la compétition entre la

SOD et le cytochrome C oxydé pour les anions superoxydes. Ceux-ci sont générés par la réaction entre l'hypoxanthine et la xanthine oxydase (XOD, EC 1.1.3.22). Le milieu réactionnel est composé de 2 μM de cytochrome C et de 5 μM d'hypoxanthine diluée dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7.8, 25°C) contenant 1 mM d'EDTA. La solution finale contient 20 μl d'échantillon, 160 μl du milieu réactionnel et 20 μl de XOD à 0.2 U/ml qui initie la réaction.

3.4.4.3. Acides gras

La composition en acides gras des lipides de réserves permet d'identifier le type de proies ingérées par l'animal, compte tenu que ces molécules sont peu modifiées lors de la fabrication de réserve et qu'elles sont caractéristiques de la source alimentaire (bactérien, groupes phytoplanctoniques, détritiques) (Delaunay et al. 1993, Dalsgaard et al. 2003). Par conséquent, la composition en acides gras des lipides neutres dans les huîtres pourrait révéler des informations intéressantes quant aux sources de nourriture utilisées par les huîtres. Nous suivrons donc l'évolution de plusieurs signatures acides gras typiques de diatomées, dinoflagellés, bactéries et matière terrigène dans les lipides de réserve des huîtres afin d'identifier les sources principales de nourriture des huîtres en fonction du temps et de l'origine des lots. Ces données seront analysées en relation avec les paramètres hydrologiques et les valeurs isotopiques du carbone de la MOP et des huîtres.

A l'inverse, la composition en acides gras des membranes cellulaires est moins sensible aux changements de source de matière organique. La composition membranaire varie en fonction de la température environnementale puisque les animaux ectothermes compensent l'effet de la température sur la fluidité membranaire en modifiant la composition en acides gras, un processus connu sous le nom d'adaptation homéovisqueuse (Hazel 1995). Compte tenu que l'adaptation membranaire est considérée comme un contributeur majeur du métabolisme de base (Hulbert & Else 1999), de l'adaptation et de l'acclimatation thermique (Hochachka & Somero 2002), ce caractère semble particulièrement utile pour améliorer notre compréhension du phénomène de mortalité d'huître creuse qui reflète un problème de capacité adaptative dès l'atteinte d'une température seuil, jusqu'à présent fixée à 19°C. Plus récemment, il a été montré que les variations interspécifiques de la composition en acides gras des lipides membranaire reflètent les différences de taux métaboliques et de stress oxydatif et dommages cellulaires associés (Hulbert & Else 1999, Hulbert et al. 2007). Par conséquent, l'indice d'insaturation ou de peroxydation des lipides membranaires varie en fonction de la température du milieu, du métabolisme de base et du métabolisme oxydatif, ce dernier étant étroitement associé au stress et aux agents infectieux. Les observations réalisées en 2008 montrent que la mortalité succède à une diminution marquée de l'indice d'insaturation des lipides membranaires suggérant un accroissement du stress oxydatif dont les causes sont à déterminer.

Enfin, les acides gras polyinsaturés en C₂₀ agissent comme précurseurs des eicosanoïdes, un groupe d'hormone incluant les prostaglandines, leukotriènes et acides hydroxyeicosatetraénoïques (Smith & Murphy 2003). La production d'eicosanoïdes est associée à des événements stressants ou coûteux d'un point de vue énergétique, tels que la gamétogenèse et la ponte ou la stimulation des fonctions immunitaires (Osada et al.

1989, Stanley et al. 1999). Chez les bivalves, les membranes des hémocytes sont caractérisées par des niveaux particulièrement élevés d'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) probablement pour réguler les réponses immunitaires (Delaporte et al. 2003). En 2008, la mortalité des huîtres maintenues sur l'étang de Thau coïncide avec une augmentation marquée en 20:4n-6 jusqu'à atteindre plus de 3% des lipides membranaires.

Dans le cadre de ce projet, nous avons suivi l'évolution de la composition en acides gras des lipides polaires des huîtres en fonction du temps et de l'origine des lots. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'acide arachidonique 20:4n-6 ainsi que sur les acides gras essentiels à la croissance et à la survie des bivalves, c'est à dire 20:5n-3 et 22:6n-3. A partir de la composition en acide gras, nous avons évalué les indices de peroxidation et d'insaturation des lipides polaires selon les formules suivantes (Hulbert et al. 2007):

Indice de peroxidation = $0.025 \times (\% \text{ monoenoïques}) + 1 \times (\% \text{ dienoïques}) + 2 \times (\% \text{ trienoïques}) + 4 \times (\% \text{ tetraenoïques}) + 6 \times (\% \text{ pentaenoïques}) + 8 \times (\% \text{ hexaenoïques})$.

Indice d'insaturation = $1 \times (\% \text{ monoenoïques}) + 2 \times (\% \text{ dienoïques}) + 3 \times (\% \text{ trienoïques}) + 4 \times (\% \text{ tetraenoïques}) + 5 \times (\% \text{ pentaenoïques}) + 6 \times (\% \text{ hexaenoïques})$.

3.4.4.3.1 Séparation des lipides neutres (réserves) et polaires (membrane)

Un sous échantillon de 750 µl de l'échantillon de poudre utilisé pour le dosage des classes de lipides est prélevé, évaporé à sec sous azote gazeux puis repris trois fois dans 500 µl de CHCl₃-MeOH (98:2 v/v) pour être placé en tête de micro colonne de silice [30×5 mm i.d.; Kieselgel; 70–230 mesh (Merck, Lyon, France); brûlée à 450°C puis désactivée avec 5% d'eau MilliQ]. Les lipides neutres (réserves) sont élués avec 10 mL de CHCl₃-MeOH (98:2 v/v; puis 1). Les lipides polaires sont récupérés avec 20 mL de méthanol. Chacune des fractions est recueillie dans un tube où l'on rajoute 2.3µg de C23:0 à 0.23µg/ml, soit 10µl. Chaque fraction est évaporée à sec sous azote ou sous vide.

3.4.4.3.2 Méthode de transesterification

Chaque fraction de chaque échantillon reçoit 1 mL de BF₃-MeOH (10%), est mélangée vigoureusement puis chauffée 10 min à 100°C tel que décrit dans Metcalfe et Schmitz (1961). Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits et analysés selon la méthode développée par Marty et al. (1992). Les EMAG sont analysés par chromatographie en phase gazeuse par injection directe dans une colonne capillaire de type DB-wax (30 m × 0.25 mm; 0.25 µm) et ionisation de flamme au laboratoire de physiologie des invertébrés à l'Ifremer de Brest.

3.5. Modélisation DEB

Un modèle d'énergie dynamique (Dynamic Energy Budget ou DEB) pour l'huître creuse *C. gigas* basé sur la théorie de bioénergétique développée par Kooijman (2000), est en cours de validation à l'Ifremer. Ce modèle permet de simuler la croissance et la reproduction de l'huître à partir des données de phytoplancton et de température (Pouvreau et al. 2006, Bourlès et al. 2009). Le modèle parvient bien à simuler la croissances et la reproduction de l'huître creuse dans des environnements où les forçages (température et nourriture) sont connus avec précision et exactitude : laboratoire, claires ostréicoles et lagune de Thau. Dans ces 3 environnements, le modèle fonctionne très bien à condition de le calibrer sur un paramètre d'ingestion, le coefficient de demi-saturation X_K (Pouvreau et al. 2006).

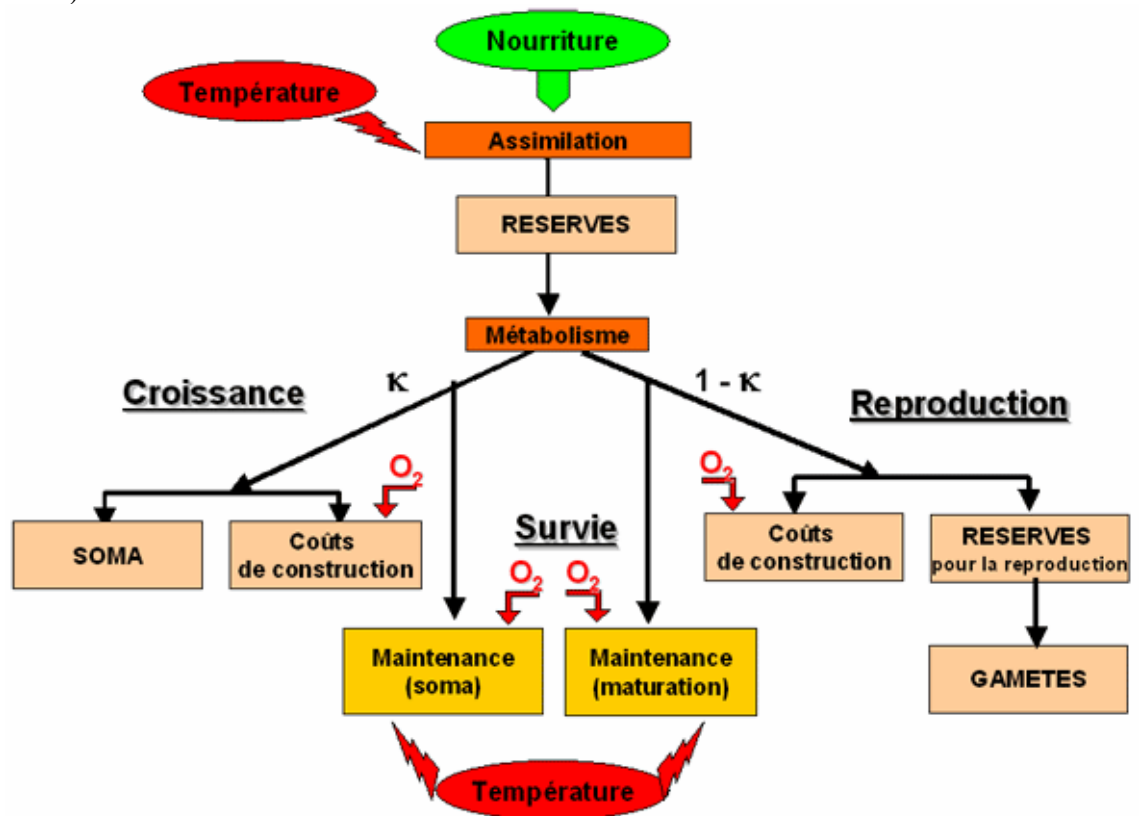


Figure 2. Schéma conceptuel des échanges énergétiques qui régissent les grandes fonctions physiologiques de croissance, de reproduction et de survie chez les organismes vivants (d'après Kooijman, 2000, dans <http://www.ifremer.fr/aquadeb/fr/presentation/concepts.htm>)

Dans le modèle DEB, les fonctions physiologiques sont traduites en équations différentielles et sur la base de 11 paramètres seulement (<http://www.ifremer.fr/aquadeb/fr/presentation/concepts.htm>). Quelle que soit l'espèce considérée, cette approche consiste à séparer l'utilisation et la répartition de l'énergie en grandes fonctions : croissance, développement, reproduction et maintenance. Dans la théorie DEB, l'énergie entre dans l'organisme sous forme

de nourriture qui est absorbée, en fonction de la température, à une vitesse proportionnelle à la surface de l'organisme (Figure 2). Cette énergie est dirigée dans un compartiment de réserve pour être utilisée, en fonction d'un taux catabolique, pour la maintenance, la croissance, le développement et la reproduction. La perte d'énergie due à la maintenance est proportionnelle au volume des organismes. La théorie DEB pose l'existence d'une loi de fractionnement de l'énergie, selon laquelle l'énergie intégrée est répartie entre différents compartiments : une fraction de l'énergie est allouée à la croissance des tissus structurels et à la maintenance des fonctions vitales, alors que la fraction restante est consacrée à la reproduction.

Dans le cadre de ce projet, nous avons dans un premier temps vérifié que la croissance prédite par le modèle DEB des huîtres diploïdes naissains et adultes provenant de Arcachon maintenues en culture sur Thau correspond bien aux valeurs effectivement mesurées sur le terrain en 2009, tel qu'observé par Pouvreau et al. (2006) en 2000 et 2001. Dans la mesure où le modèle fonctionne bien pour 2009, alors nous pourrions examiner l'évolution de la dynamique de l'énergie de réserve dans les huîtres en fonction du temps (variable d'état du modèle: dE/dt) et tester l'hypothèse selon laquelle les mortalités coïncident avec des périodes de déficit énergétique (Pouvreau et al. 2006, Samain & McCombie 2008).

Le modèle a été utilisé sous le logiciel STELLA 8.0 en utilisant les paramètres définis dans Pouvreau et al. (2006) mis à jour par Bourlès et al. (2009). Les valeurs initiales des variables d'état sont : l'énergie de structure E_v était de 500 J ou 2700 J, l'énergie de stockage E était fixée à 166 J ou 800 J et l'énergie du compartiment de reproduction E_r était à 133 ou 1000 J selon qu'il s'agit de naissain ou d'adulte respectivement. Les valeurs initiales de E et E_r ont été déduites pour obtenir les masses initiales totales correctes (0.054 g et 0.317 g pour les naissains et adultes respectivement), ainsi que des valeurs réalistes de densité en énergie E . Les variables forçantes utilisées dans le modèle sont la température mesurée en haute fréquence et la teneur en chlorophylle a .



4. Résultats

4.1. L'environnement

4.1.1. Caractérisation générale

La température moyenne mensuelle de l'eau dans l'étang de Thau en 2009 augmente graduellement de 5.7°C en janvier (min : 4.5°C) jusqu'à atteindre 24.5°C en août (max : 28.1°C, Fig. 3A). L'augmentation printanière de la température a lieu de façon quasi linéaire par rapport à 2008 où la température augmentait par paliers (Fig. 3A, encadré). Les températures mesurées en hiver 2008-09 sont dans les moyennes décennales inférieures, voire en anomalie négative en janvier, alors que l'hiver 2007-08 était marqué par une anomalie thermique positive (Fig. 3A).

La salinité enregistrée en 2008-09 varie entre 39.6 et 34.4 selon des tendances saisonnières plutôt normales, reflétant des apports pluvieux en hiver et au printemps dans les normales voir largement excédentaires certains mois. Alors que le cumul des précipitations à Sète de septembre 2007 à février 2008 était de seulement 164 mm contre 388 ± 143 mm en moyenne au cours des 10 dernières années, faisant de l'année 2007-08 la plus sèche de la dernière décennie pour cette période, le cumul observé en 2008-09 pour cette période est de 418 mm, faisant de cette année la plus pluvieuse de la dernière décennie.

Les concentrations en chlorophylle *a* sont généralement sous les moyennes minimales enregistrées au cours de la dernière décennie, similaires à 2008, et reflètent assez bien l'évolution des concentrations cellulaires du phytoplancton, sauf en mai où une efflorescence importante de *Pseudonitzschia* sp. ne se reflète pas dans les teneurs en chlorophylle *a*.

Les flores totales des 10 dernières années montrent une succession de communautés dominées par les diatomées *Skeletonema costatum* en hiver, *Chaetoceros* sp. au printemps et *Nitzschia* sp. et *S. costatum* en juin et juillet. La transition vers des communautés phytoplanctoniques dominées par *Nitzschia* sp. et *S. costatum* n'a pas eu lieu en 2008 et en 2009, suggérant la présence de facteurs limitants dans le milieu tel qu'indiqué par les faibles concentrations cellulaires en phytoplancton et Chl *a*.

Les années 2008 et 2009, toutes deux caractérisées par des mortalités massives de naissains d'huîtres creuses, présentent des différences thermiques et pluviométriques hivernales marquées : l'hiver 2008 fut doux et sec alors que 2009 était froid et pluvieux. Le seul point commun entre ces deux années à mortalité du point de vue de l'environnement globale de l'étang de Thau est la biomasse phytoplanctonique remarquablement constante et faible par rapport aux moyennes décennales.

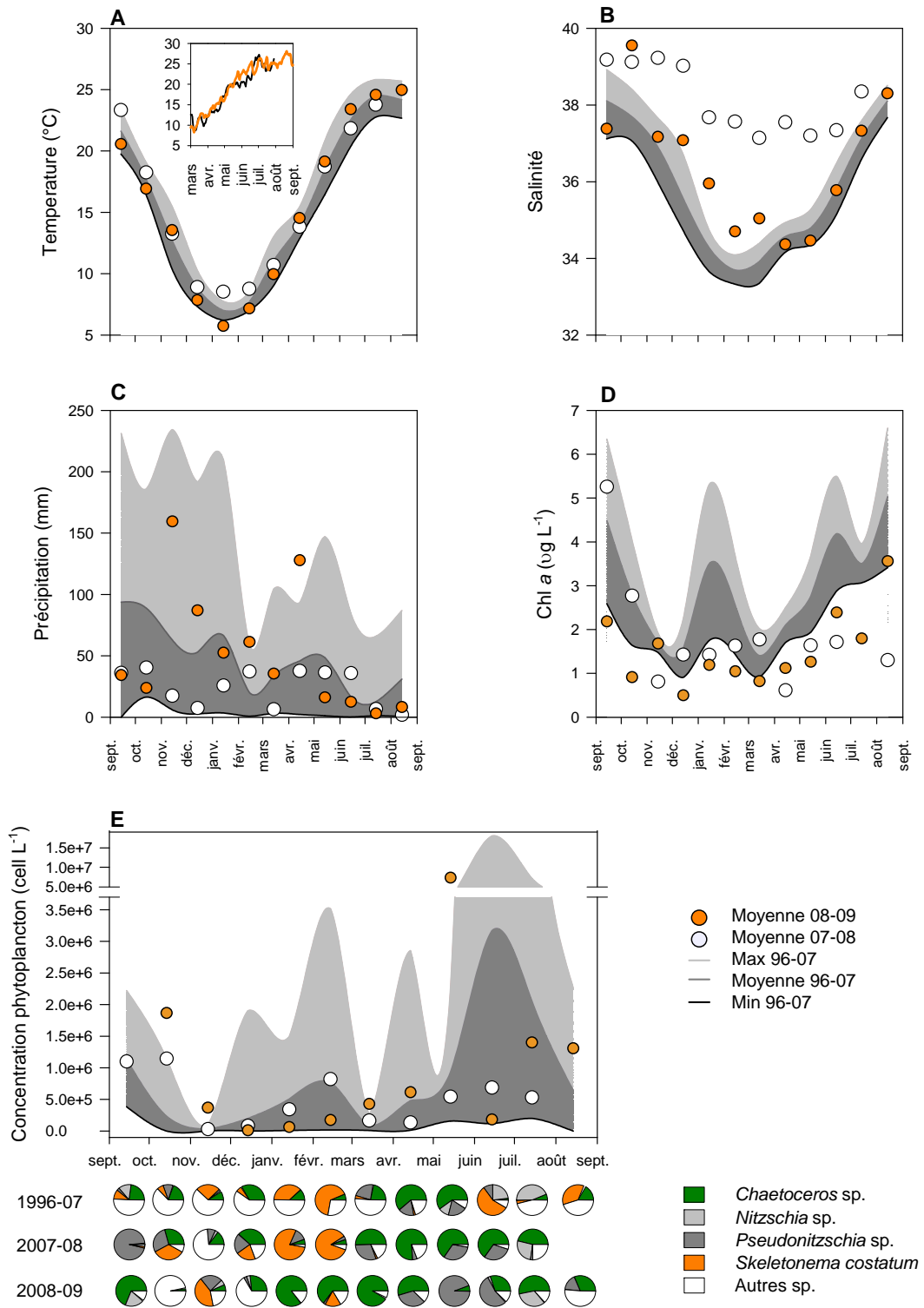


Figure 3. Paramètres environnementaux enregistrés sur l'étang de Thau à Bouzigues: (A) température de l'eau, (B) salinité, (C) précipitation (source Météo France), (D) concentration en chlorophylle *a* et (E) en phytoplancton. Les données sont des moyennes mensuelles en 2007-08 et 2008-09 (cercles blancs et oranges respectivement), et minima, moyennes et maxima mensuels calculés à partir des données prises entre 1996 et 2007 (graphe d'aire). L'encadré dans la figure A représente la température de l'eau enregistrée en continu en 2008 (noir) et 2009 (orange) sur la table Ifremer à Marseillan. Les graphes en camembert dans la figure E indiquent l'abondance relative des principaux groupes taxonomiques ou espèces de phytoplancton basée sur des moyennes mensuelles en 1996-07, 2007-08 et 2008-09 à Bouzigues (source Ifremer Rephy).

4.1.2. Suivi de l'environnement nutritionnel dans l'étang de Thau

4.1.2.1. Matière organique particulaire et chlorophylle *a*

La concentration en matière organique particulaire (MOP) varie en fonction du temps dans l'étang de Thau ($P < 0.001$, Fig. 4). La MOP est élevée en avril et mai, reflétant l'intensité des épisodes pluvieux printaniers et demeure constamment faible à $\sim 3 \text{ mg L}^{-1}$ à partir de juin. Il n'y a pas d'effet significatif des tables ou de la station (Bouzigues vs. Marseillan) sur la concentration de la MOP.

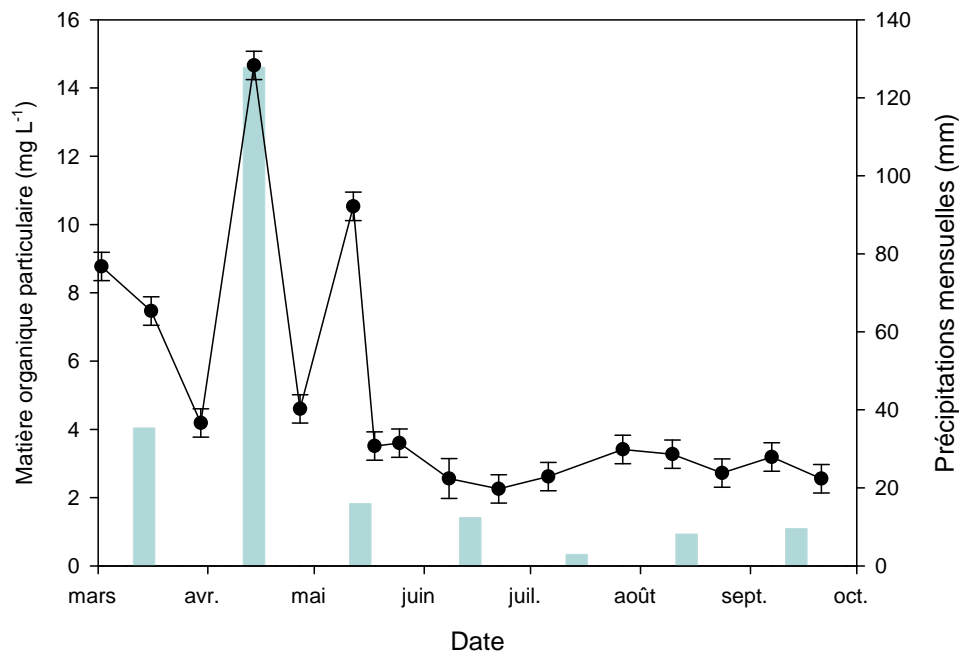


Figure 4. Concentration en matière organique particulaire dans l'eau en fonction du temps dans l'étang de Thau en 2009 (moyenne \pm erreur type, $n=4$ sites). L'histogramme représente les précipitations enregistrées à Sète (source Météo France) en fonction du temps en 2009.

Les teneurs en Chl *a* mesurées dans les tables (2.0 ug L^{-1}) ne sont pas significativement différentes de celles mesurées hors table (2.5 ug L^{-1}), quelles que soient les dates et les stations d'échantillonnage (Fig. 5). En revanche, la concentration en Chl *a* varie en fonction du site en interaction avec le temps ($P=0.010$, Fig. 5). La concentration en Chl *a* augmente de façon marquée au printemps à Marseillan et demeure constante à Bouzigues. A l'automne, la concentration en Chl *a* augmente sur les deux sites, mais de façon nettement plus marquée à Bouzigues.

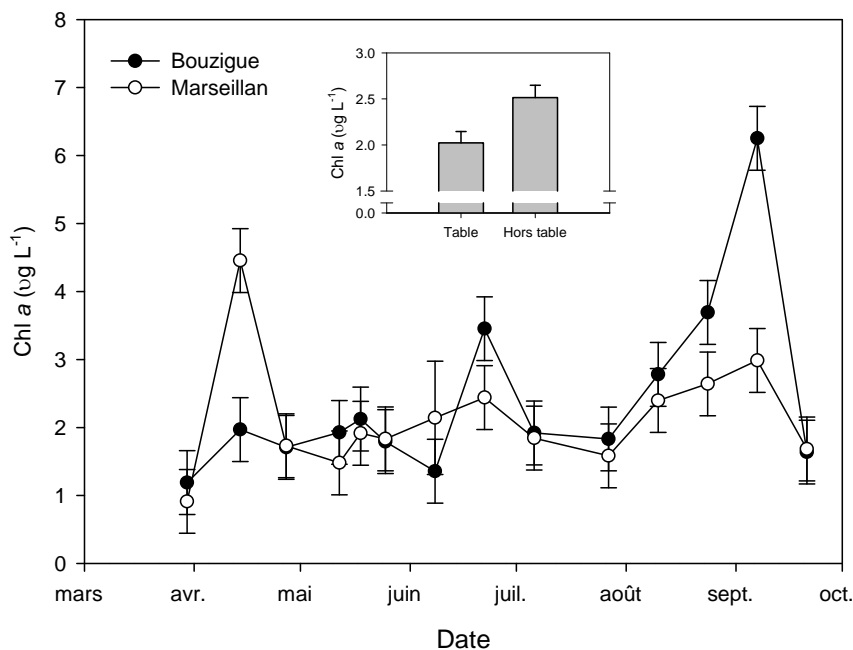


Figure 5. Concentration en chlorophylle *a* en fonction du site et du temps dans la matière organique particulaire dans l'étang de Thau en 2009 (moyenne \pm erreur type, $n=2$ sites). L'encadré illustre l'effet table vs hors table sur la teneur en chlorophylle *a*.

4.1.2.2. Valeur isotopique du carbone

Le suivi du ratio isotopique de la matière organique particulaire en fonction du temps dans l'étang de Thau en relation avec les paramètres hydrologiques (MOP, précipitations et Chl *a*) permet d'évaluer la contribution relative des différentes sources de carbone (continentales vs. lagunaires, pélagiques vs. benthiques, etc.). Nos résultats montrent que le ratio isotopique, et donc les sources de carbone disponibles, varient en fonction du temps et du site (Fig. 6, $P_{\text{site} \times \text{date}}=0.010$), de façon très marquée par rapport à d'autres écosystèmes conchylicoles français (Leal et al. 2008). Au mois de mars, les valeurs faibles de ratio du carbone (-24‰) dénotent une forte influence des apports continentaux, reflétant les épisodes pluvieux précédents et en cours (Fig. 4). L'enrichissement en ^{13}C pendant la période printanière ($\sim -22\text{‰}$) reflète une réduction des apports continentaux et l'augmentation des apports lagunaires pélagiques, témoignant de la diminution des précipitations. Entre le 18 et le 25 mai, le site de Bouzigues se distingue clairement de Marseillan où une augmentation marquée du ratio isotopique du

carbone jusqu'à atteindre $\sim -19\%$ reflète une contribution benthique dominante probablement du à la proximité du sédiment. La période estivale est caractérisée par une valeur isotopique similaire à celle observée au printemps ($\sim -22\%$). Toutefois, l'absence de précipitation et les faibles teneurs en Chl *a* pendant la période estivale comparativement au printemps suggère que les apports continentaux sont remplacés par des apports benthiques régénérés. Enfin, l'enrichissement sensible en ^{13}C en septembre pourrait refléter une contribution lagunaire essentiellement pélagique puisque la teneur en Chl *a*, proxy de la biomasse phytoplanctonique, augmente à ce moment alors que les précipitations demeurent faibles.

Les valeurs isotopiques du carbone des huîtres adultes et des naissains maintenus sur l'étang de Thau à Marseillan sont similaires ($P_{\text{stade}}=0.649$, $P_{\text{stade}\times\text{date}}=0.484$), suggérant que le naissain et les adultes utilisent les mêmes sources de nourriture. Les valeurs isotopiques des huîtres sont les plus faibles en mars (-21.5% , Fig. 7), reflétant les valeurs enregistrées dans la MOP typiques d'apports continentaux et lagunaires à cette période (Fig. 6). A partir du 18 mai jusqu'à début juin, la valeur isotopique augmente de façon marquée dans les huîtres jusqu'à atteindre $\sim -19.3\%$ le 8 juin, reflétant l'enrichissement de la MOP due à l'augmentation des apports lagunaires pélagiques et benthiques. Enfin, la valeur isotopique du carbone dans les huîtres diminue graduellement jusqu'à fin août pour atteindre -20% , alors que la valeur isotopique du carbone dans la MOP diminue rapidement entre juin et juillet pour atteindre -21.5% . La différence du taux de diminution de la valeur isotopique du carbone entre la MOP et l'huître s'explique par le fait que la quantité de MOP est faible, et par conséquent, l'effet d'une variation importante de la qualité de la MOP ne se traduit pas nécessairement dans l'huître.

4.1.2.3. Composition en acides gras

L'analyse préliminaire de la composition en acides gras de la MOP présente des caractéristiques plutôt inhabituelles. En effet, les acides gras de la MOP sont dominés par le groupe des saturés qui représentent 76% du total, puis dans une moindre mesure par les polyinsaturés (21%) et les monoinsaturés (3%).

Etonnamment, les acides gras à longues chaînes tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3), deux oméga-3 essentiels à la croissance et à la survie des organismes marins incluant les bivalves (Langdon & Waldock 1981), constituent chacun seulement 0.5% du total, ce qui est atypique du phytoplancton marin. A titre d'exemple, les bacillariophycées (diatomées) sont riches en EPA ($16.2\% \pm 10.5$ selon les espèces) alors que les dinophycées sont caractérisés par des teneurs élevées en DHA ($17.5\% \pm 11.0$) (Volkman et al. 1989, Viso & Marty 1993, Dalsgaard et al. 2003).

Les acides gras d'origine bactérienne, comprenant les formes ramifiés et les acides gras à nombres impairs de C à courtes chaînes (15:0 et 17:0), représentent en moyenne 5.5% du total et peuvent contribuer jusqu'à 11.3% des acides gras totaux. Cette contribution élevée du compartiment bactérien à la MOP est

également atypique et pourrait refléter l'importance de la matière organique en décomposition.

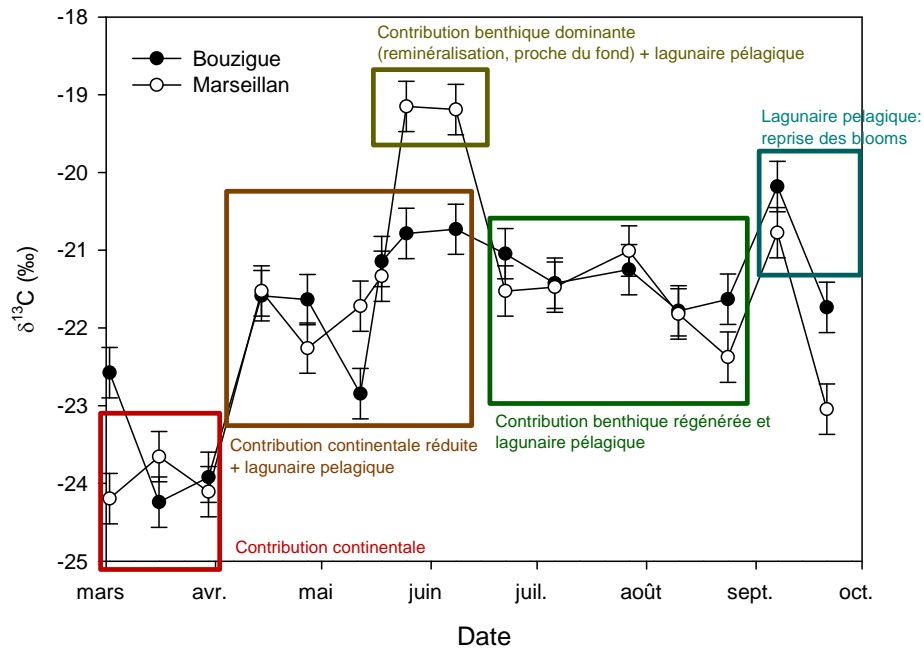


Figure 6. Valeur isotopique du carbone dans la matière organique particulaire dans l'étang de Thau en 2009 à Bouzigues et Marseillean (moyenne \pm erreur type, n=2 sites). L'effet table vs hors table est non significatif.

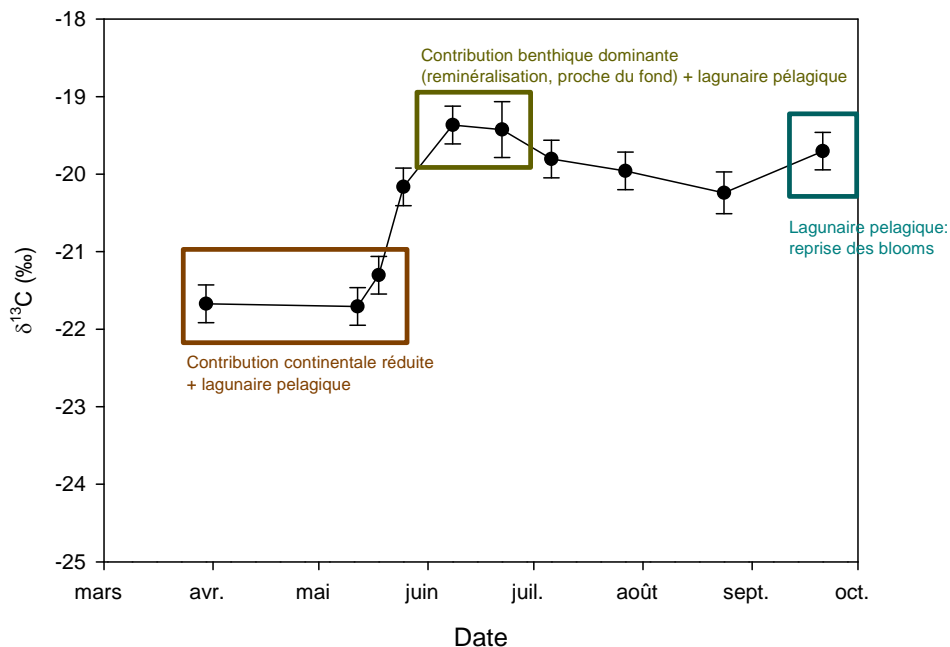


Figure 7. Valeur isotopique des huîtres diploïdes maintenues sur l'étang de Thau à Marseillean en 2009 en fonction du temps. L'effet lot (naissain vs adulte) est non significatif, de sorte que les données sont des moyennes des 2 lots \pm erreur type (n=2 lots et N=3 échantillons par lot).

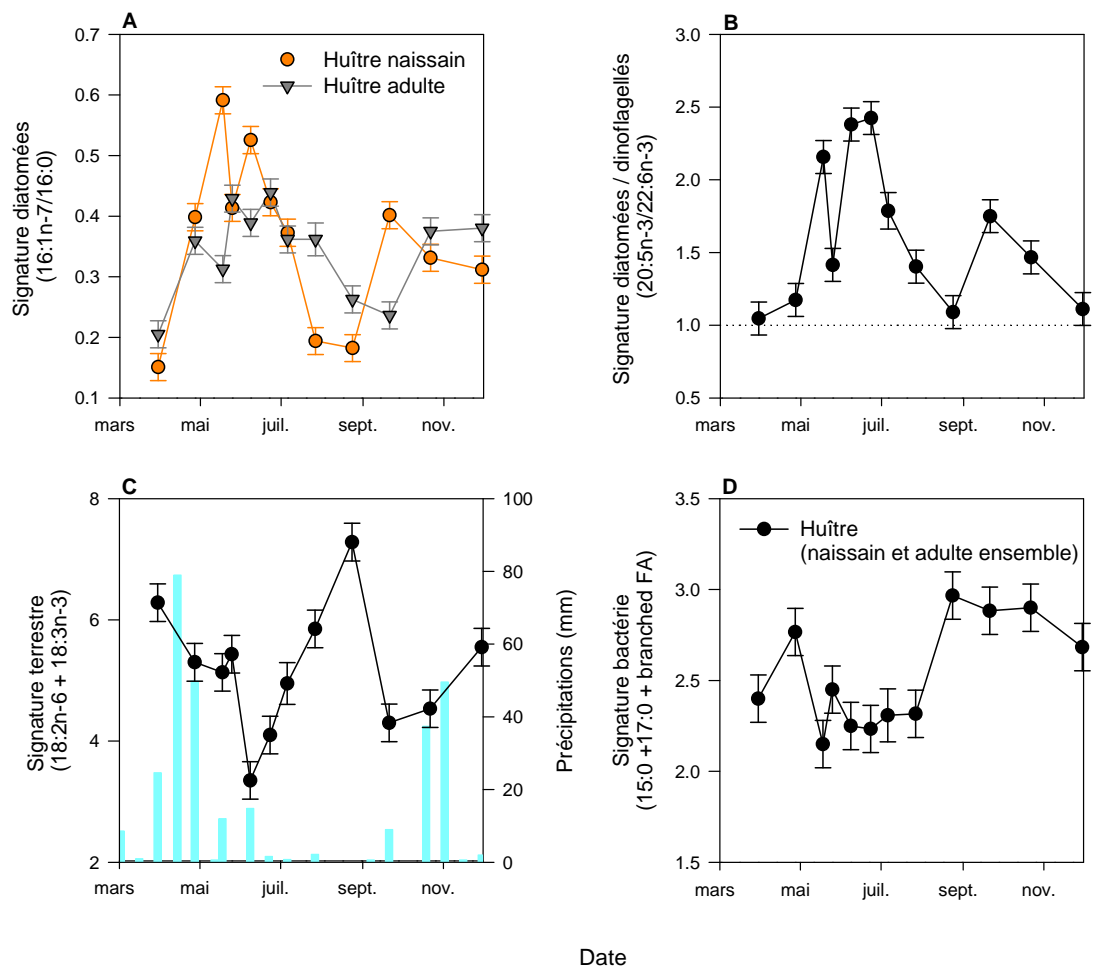


Figure 8. Evolution temporelle des principales signatures en acides gras dans les lipides de réserve des huîtres diploïdes maintenues sur l'étang de Thau à Marseillan en 2009. Lorsque l'effet lot (naissain vs adulte) est non significatif les données sont des moyennes des 2 lots \pm erreur type ($n=2$ lots et $N=3$ échantillons par lot). L'histogramme sur le graphe C représente les précipitations.

Enfin, l'acide gras polyinsaturé dominant la MOP présente un temps d'éluion typique du 22:2NMI ce qui à notre connaissance n'a jamais été rapporté dans la littérature. Ces données sont donc à prendre avec précaution et nécessiteront une analyse plus approfondie de la littérature existante.

En revanche, la composition en acides gras des lipides neutres des huîtres présente des profils classiques et des changements marqués à mettre en relation avec les changements hydrologiques (précipitation, MOP et Chl *a*) et isotopiques (MOP et huître). Un indicateur général et robuste de la présence de diatomées est le rapport de 16:1n-7 et 16:0 (Budge & Parrish 1998). Il est généralement accepté que des valeurs de ratio >1.6 reflète une dominance des diatomées dans le système étudié. Les faibles valeurs de 16:1n-7/16:0 (<0.6 , Fig. 3A) dans cette étude suggèrent que les diatomées ne sont pas des sources dominantes de nourriture dans le régime alimentaire de l'huître. En revanche, le rapport de 20:5n-3 et 22:6n-3 qui est un

indicateur de l'abondance relative des bacillariophycées (diatomées) par rapport aux dinophycées (dinoflagellés) est généralement élevé (Fig. 8B) et toujours >1 , suggérant que la contribution des diatomées au régime alimentaire de l'huître est dominant par rapport au dinophycées (Budge & Parrish 1998). Les valeurs de $18:2n-6 + 18:3n-3$, deux acides gras typiques d'espèces marines non dominantes mais aussi de plantes vasculaires terrestres (Budge & Parrish 1998), représentent plus de 2.5% des acides gras des lipides de réserve des huîtres, valeur seuil au delà de laquelle cette source de nourriture est considérée comme significative. Enfin, les acides gras d'origine bactérienne représentent seulement 2-3% du total comparativement à 5.5% dans la MOP, suggérant que cette source contribue faiblement au régime alimentaire de l'huître.

Globalement, les valeurs de $16:1n-7/16:0$ et $20:5n-3/22:6n-3$ augmentent de façon marquée à deux reprises : entre le 30 mars et 11-18 mai puis entre le 24 août et le 22 septembre, traduisant une augmentation de la contribution des diatomées dans le régime alimentaire de l'huître à ces périodes, qui coïncide avec les valeurs isotopiques du carbone dans la MOP et dans les huîtres typiques de contributions lagunaires pélagiques (Fig. 6 et 7) et les valeurs de Chl *a* dans la MOP (Fig. 5).

Les valeurs de $18:2n-6 + 18:3n-3$, deux acides gras typiques de plantes vasculaires terrestres, diminuent de 6% à 3% entre le 30 mars et le 8 juin, ce qui coïncide parfaitement avec l'enrichissement concomitant en ^{13}C témoignant de la diminution des apports continentaux probablement due à la baisse des précipitations. Les proportions de $18:2n-6 + 18:3n-3$ augmente du 8 juin au 22 septembre pour atteindre la valeur maximale de 7.3%. Cette augmentation ne traduit probablement pas une contribution croissante des plantes vasculaires terrestres puisque les précipitations étaient quasi-nulles, réduisant les apports continentaux au minimum à cette période. L'enrichissement en ^{13}C en période sèche reflèterait plus probablement la contribution grandissante d'algues marines non dominantes ou des plantes marines en dégradation. Cette interprétation est compatible avec l'enrichissement en ^{13}C observé au même moment dans la MOP et dans l'huître typique des apports lagunaires benthiques. Les valeurs de $18:2n-6 + 18:3n-3$ diminuent à ~4% traduisant l'augmentation de la contribution des autres compartiments, dont les diatomées.

Enfin, les acides gras d'origine bactérienne augmentent sensiblement entre le 30 mars et le 11 mai pour atteindre 2.9%, puis diminuent abruptement à 2.1% où ils demeurent stable jusqu'au 27 juillet. Ces acides gras augmentent à nouveau le 24 août pour atteindre 3%. Ces variations suivent assez bien celles de la MOP (données non présentées).



4.1.3. Suivi des contaminants organiques hydrophiles sur Thau

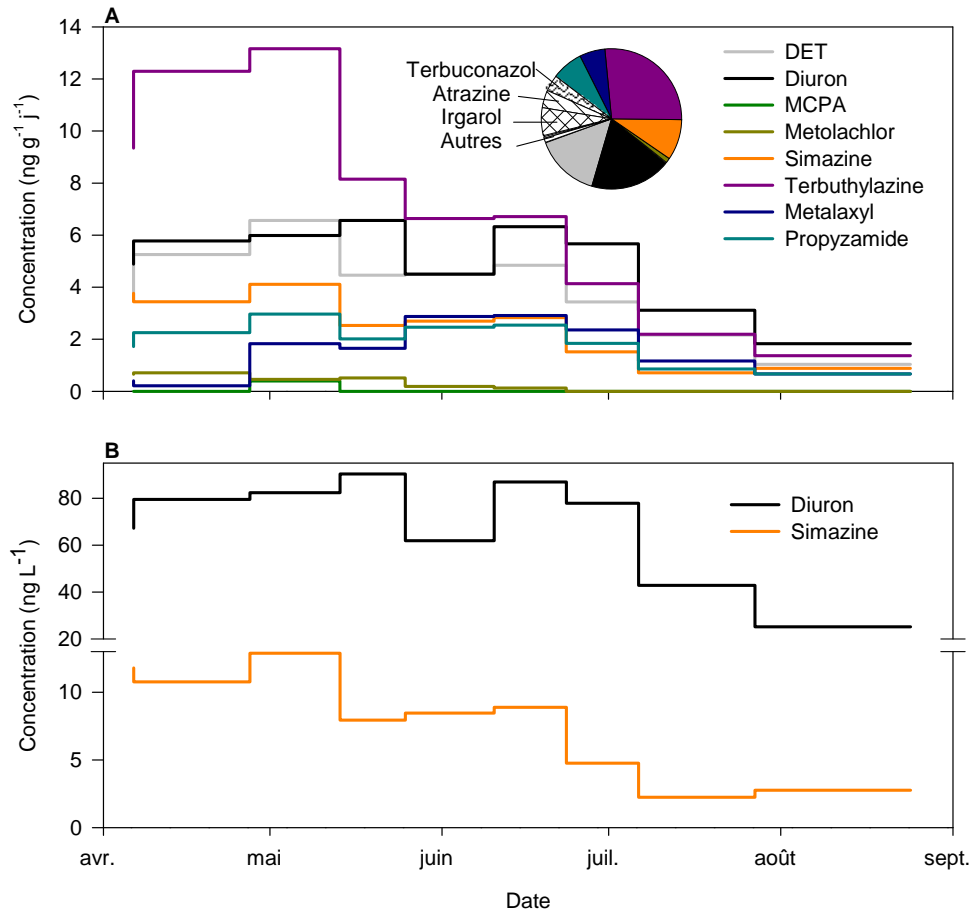


Figure 9. Concentration moyenne pondérée dans le temps des principaux pesticides présents dans l'étang de Thau en 2009 sous la table Ifremer localisée dans la zone de Marseillan. Les concentrations sont exprimées (A) en ng par gramme de phase adsorbante et par jour et (B) en ng L^{-1} lorsque les coefficients de diffusion des composés sont connus. Seuls les contaminants dont les concentrations varient significativement dans le temps sont présentés. Le camembert représente les proportions relatives moyennes de tous les contaminants détectés, évaluées à partir à partir des concentrations exprimées en $\text{ng g}^{-1} \text{j}^{-1}$.

Parmi les 89 contaminants chimiques recherchés dans les échantillonneurs passifs de type POCIS déployés dans l'étang de Thau, 16 pesticides ont été fréquemment détectés entre avril et août 2009, parmi lesquels 8 composés présentent des différences significatives de concentration en fonction du temps (MANOVA, $P < 0.05$, Fig. 9A). Quelque soient les composés considérés, les concentrations sont maximales de avril à juin et diminuent pendant la période estivale pour atteindre des valeurs quasi-nulles fin août. Par conséquent, la dynamique des contaminants coïncide avec les épisodes pluvieux et les apports du bassin versant. D'autre part,

les mortalités de naissain qui ont lieu mi-mai coïncident avec la période pendant laquelle les concentrations en contaminants chimiques sont maximales.

Toutefois, les concentrations calculées pour les composés dont on connaît les coefficients de diffusion de la colonne d'eau vers la phase adsorbante des échantillonneurs passifs sont plutôt faibles. Dans notre étude, la concentration moyenne de diuron est de 68 ng L^{-1} (max = 90 ng L^{-1} , Fig. 9B). Par ailleurs, l'exposition d'huîtres creuses aux stades larvaires et adultes à des concentrations de diuron équivalentes à 300 ou 3000 ng L^{-1} n'a pas engendrée de surmortalités malgré des effets génotoxiques et immunitaires (Bouilly et al. 2007). Par conséquent, les concentrations de diuron observées dans l'étang de Thau suggèrent qu'il n'y a pas de lien direct entre la présence de ce composé (pris isolément) et les mortalités de naissain observées. La même conclusion s'applique à l'atrazine, l'isoproturon et la simazine, pour lesquelles les concentrations sont encore plus faibles (respectivement 7, 0.3 et 8 ng L^{-1} en moyenne).

En revanche, nous observons aussi de la terbuthylazine accompagnée de son principal métabolite actif, la DET, en quantité importante (Fig. 9A). Ces deux composés représentent en effet ~42% de la masse totale de contaminants retrouvés dans les POCIS. De même, un antifouling (Irgarol), et trois fongicides (metalaxyl, tebuconazole et propyzamide) sont également retrouvés dans les POCIS mais à des quantités moindres. Les coefficients de diffusion de ces composés ne sont pas encore connus et il est donc impossible de calculer leurs concentrations moyennes dans l'eau. Par conséquent, bien que le diuron représente ~20% de la masse de contaminant présent dans les échantillonneurs passif et que sa concentration dans l'eau n'est pas en mesure d'entraîner à elle seule les mortalités observées, il n'est pas exclu que l'ensemble des contaminants constitue un facteur affaiblissant le naissain d'huîtres.

4.1.4. Conclusion

L'analyse des paramètres environnementaux de l'étang de Thau montrent que le seul point commun entre les deux années à mortalité d'huître (2008-09) est la biomasse phytoplanctonique remarquablement constante et faible par rapport aux moyennes décennales.

D'autre part, notre étude suggère qu'il n'y a pas d'effet significatif de la présence des tables sur la quantité (MOP et Chl *a*) et la qualité ($\delta^{13}\text{C}$) de la ressource trophique. Cela ne signifie pas que la culture des huîtres n'a pas d'effet sur la ressource trophique de l'étang de Thau, mais plutôt que la ressource trophique dans les tables est similaire (sur la base des variables examinées) à ce qui est observé hors des tables.

Globalement, la ressource trophique peut-être qualifiée de typiquement lagunaire (peu d'apport marin), c'est à dire produite localement, essentiellement détritique, ponctuée d'efflorescences phytoplanctoniques constituées principalement de diatomées. Malgré des changements drastiques dans la qualité de l'environnement nutritionnel de l'étang de Thau au cours du temps et particulièrement pendant la

période printanière, il ne semble pas y avoir de lien évident avec les mortalités d'huîtres qui se produisent à partir du 11 mai.

La similarité des signatures lipidiques et isotopiques entre naissain et adultes suggère que ces animaux utilisent la même ressource trophique malgré une sensibilité à la mortalité très différente.

Enfin, la présence de contaminants chimiques hydrophiles (herbicides et pesticides), notamment pendant la période printanière, ne semble pas en mesure d'entraîner à elle seule les mortalités de naissain d'huître. Toutefois, il n'est pas exclu que l'ensemble des contaminants constitue un facteur affaiblissant le naissain d'huîtres.



4.2. Effet de l'origine, de la ploïdie et de l'âge des huîtres dans l'étang de Thau

4.2.1. Mortalité

4.2.1.1. Analyse de la mortalité 2009

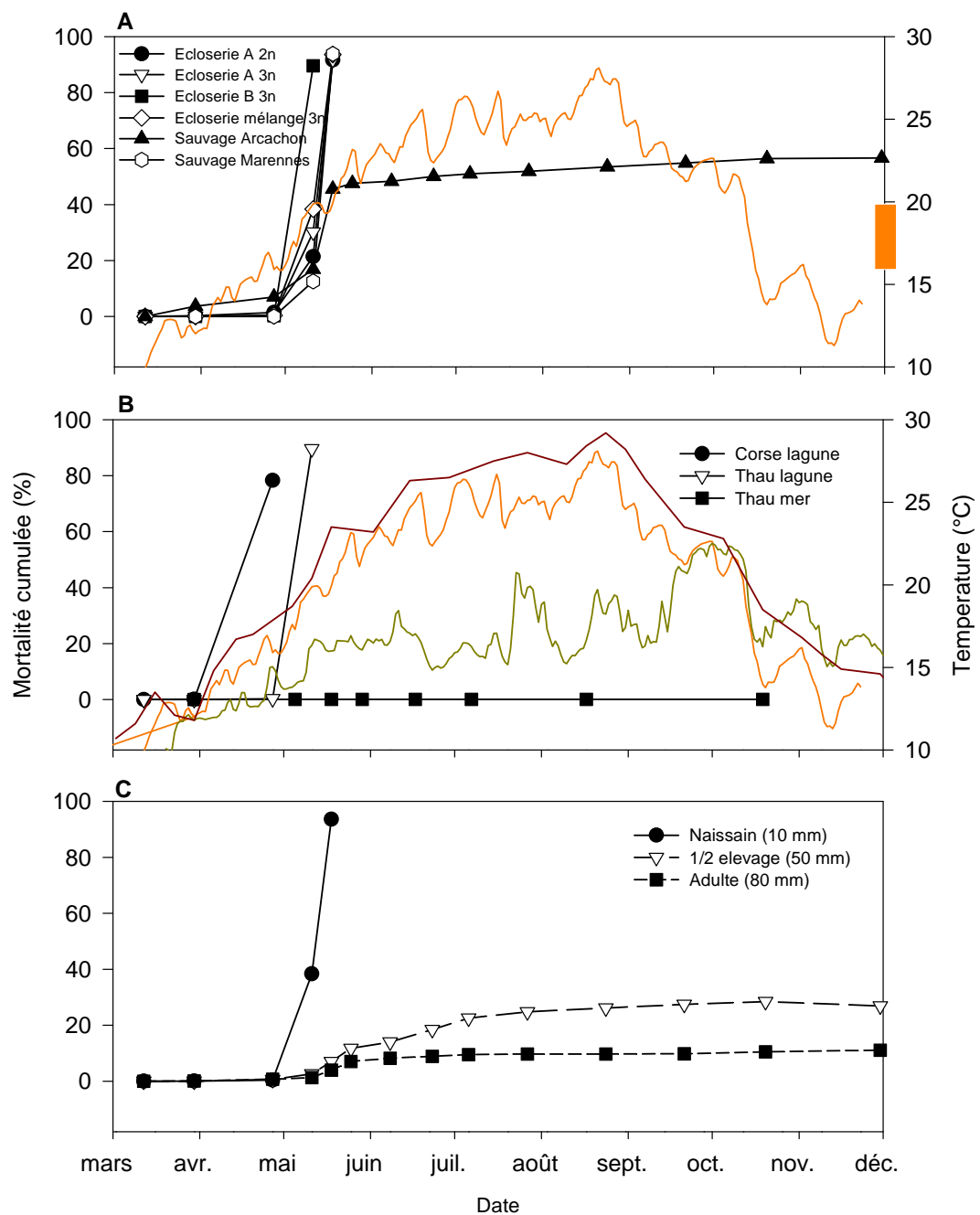


Figure 10. Mortalités cumulées d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployé sur Thau (A), des sites de culture pour un lot d'huître provenant de l'écloserie B, 3n (B) et des stades d'élevage pour des lots d'huîtres 3n constitués d'individus provenant de 4-5 écloseries françaises (C). Les températures mesurées ponctuellement dans le cadre du RePHY en Corse et en haute fréquence sur Thau (lagune et mer ouverte) sont indiquées en rouge, orange et vert respectivement. Le rectangle orange sur l'axe y des températures de la figure A indique la gamme de température dans laquelle les mortalités de naissain se déclarent sur Thau.

Dans l'étang de Thau, les mortalités sur le naissain sont constatées pour la première fois le 11 mai et touchaient en moyenne 24% des individus quel que soit le lot de naissain (jusqu'à 90% des individus du lot écloserie B 3n, Fig. 10A). Ces mortalités, qui ont eu lieu entre le 27 avril et le 11 mai, coïncident avec une augmentation de la température de l'eau de 15.9°C à 19.9°C, soit une température moyenne pendant cette période de 17.6°C. La mortalité est totale le 18 mai pour tous les lots de naissain, quelles que soient leur origine et ploïdie (Fig. 10A), sauf le lot d'huître sauvage provenant de Arcachon qui n'est touché qu'à 57% de ses effectifs en date du 31 novembre 2009. Ce lot de naissain possédait des caractéristiques particulières (taille, masse corporelle, parcours zootechnique) qui peuvent expliquer, au delà de son origine, sa survie relativement exceptionnelle.

Le lot écloserie B 3n a été déployé en Corse, sur Thau et en mer ouverte au large de Sète afin de comparer les cinétiques de mortalité entre ces différents sites (Fig. 1). La mortalité en Corse est constatée le 27 avril soit 14 jours avant l'étang de Thau (Fig. 10B). La mortalité est quasi-totale. La température de l'eau était comprise entre 17.0°C et 18.7°C. L'absence de sonde de température haute fréquence et l'intervalle de temps passé depuis la visite précédente (30 mars) ne permettent pas de réaliser une analyse plus fine de la relation entre température et mortalité. En mer ouverte, le même lot d'huître ne subit aucune mortalité en date du 4 décembre 2009 (Fig. 10B).

Enfin, nos résultats montrent que la mortalité touche le naissain alors que les lots d'huîtres en demi élevage et en élevage demeurent indemnes de mortalité anormale (Fig. 10C).

4.2.1.2. Analyse de la mortalité 2009 vs 2007 et 2008

La figure 11 présente l'évolution de la cinétique des mortalités moyennes en 2007, 2008 et 2009. Cette figure illustre l'intensification du phénomène de mortalité et l'abaissement du seuil thermique lors du démarrage des mortalités. Alors que les mortalités enregistrées en 2007 et en 2008 coïncidaient avec l'atteinte d'un seuil thermique à ~19-20°C tel qu'observé dans le cadre du défi Morest (Samain & McCombie 2008), les mortalités en 2009 coïncident avec une augmentation de la température de l'eau de 15.9°C à 19.9°C, soit une température moyenne pendant cette période de 17.6°C comparativement à 20.1°C en 2008 (Fig. 11).

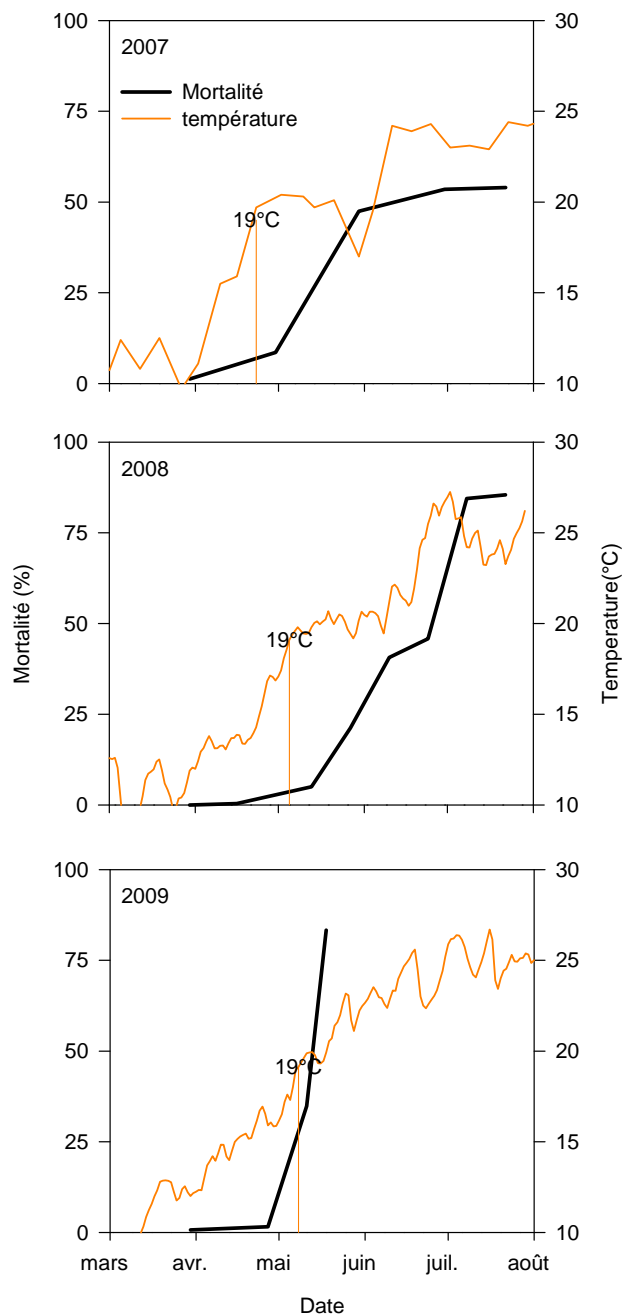


Figure 11. Mortalités cumulées moyennes du naissain d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en fonction du temps pour les années 2007, 2008 et 2009. Les données de mortalité acquises en 2007 proviennent de fiches de déclarations de mortalité de lots professionnels alors que le suivi des températures provient du Rephy. Les données acquises en 2008 sont extraites du suivi des mortalités initié dans le cadre d’un partenariat Ifremer, Cevalmar et OP et SRCM.

4.2.2. Croissance

4.2.2.1. Longueur de coquille

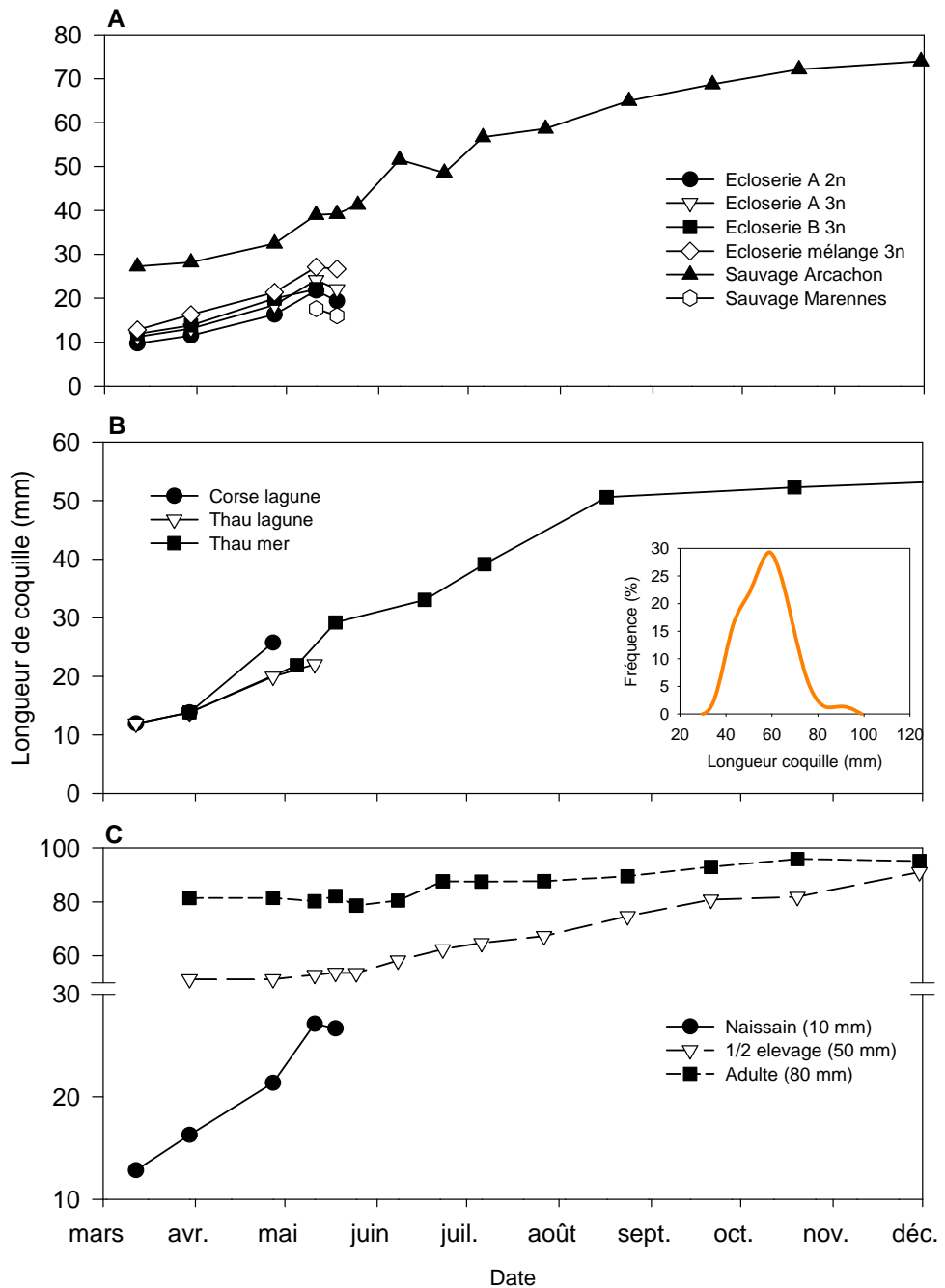


Figure 12. Evolution de la longueur de coquille d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployé sur Thau (A), des sites de culture pour un lot d'huître triploïde provenant de l'écloserie B (B) et des stades d'élevage pour des lots d'huîtres 3n constitués d'individus provenant de 4-5 écloseries françaises (C). L'encadré dans la figure B représente la distribution de fréquence de taille des huîtres maintenues en mer et récoltées le 4 décembre 2009.

Les lots de naissains déployés dans l'étang de Thau mesuraient initialement 13.7 ± 2.0 mm sauf le lot d'huître sauvage provenant d'Arcachon pour lequel la longueur de coquille était de 28.2 mm le 30 mars. La longueur de coquille de tous les lots de naissain incluant les huîtres sauvages d'Arcachon augmente entre le 30 mars et le 27 avril à un taux moyen de 0.190 mm par jour (Fig. 11A). Entre le 27 avril et le 11 mai, période pendant laquelle les mortalités démarrent, le taux de croissance double pour atteindre en moyenne 0.365 mm par jour. Pendant la période de constat des mortalités entre le 11 mai et le 25 mai, la longueur de coquille des huîtres demeure constante. La croissance reprend par la suite à un taux moyen de 0.176 mm par jour, telle qu'observé en période de pré mortalité. Le suivi de la croissance montre donc une accélération précédant l'épisode de mortalité.

La même observation est faite en Corse où la mortalité a lieu alors que la croissance coquillière des huîtres était de 0.441 mm par jour entre le 30 mars et le 27 avril contre seulement 0.144 mm par jour entre le 12 mars et le 30 mars, période sans mortalité (Fig. 12B). Toutefois, les huîtres maintenues en mer présentent également une accélération marquée de la croissance entre le 5 mai et le 18 mai pour atteindre 0.562 mm par jour contre seulement 0.230 mm par jour pendant la période précédente (30 mars – 5 mai) et 0.122 mm par jour pendant la période restante (18 mai – 4 décembre). Par conséquent, l'augmentation du taux de croissance de l'huître pourrait être un caractère nécessaire au déclenchement de la mortalité, mais pas suffisant.

Enfin, il est intéressant de constater que le taux de croissance des huîtres placées en $\frac{1}{2}$ élevages et en élevage pendant la période de démarrage des mortalités est similaire à celui observé hors période de mortalité (Fig. 12C). Globalement, le taux de croissance de ces huîtres est faible voire nul jusqu'au 18 mai, puis augmente sensiblement à 0.190 mm par jour pour le $\frac{1}{2}$ élevage et 0.070 mm par jour pour les adultes. Enfin, nos résultats illustrent l'idée répandue dans la littérature selon laquelle la croissance des animaux diminue avec l'âge, un phénomène déjà rapporté chez l'huître (Royer et al. 2008).

A la fin du suivi, les huîtres en $\frac{1}{2}$ élevage et en élevage font la même taille, soit ~ 93 mm (Fig. 12C). Le naissain placé en mer atteint un plateau à 51 mm le 17 août reflétant probablement un effet densité dû à l'augmentation de la biomasse dans les lanternes (Fig. 12B). Malgré tout, 10% de la population est de taille > 75 mm, ce qui, en l'absence de travail régulier sur ces lanternes, représente un bon

rendement (Fig. 12B encadré). Finalement, le naissain sauvage d’Arcachon atteint la taille de 73 mm, soit une pousse de 46 mm entre le 30 mars et le 30 novembre (Fig. 12A).

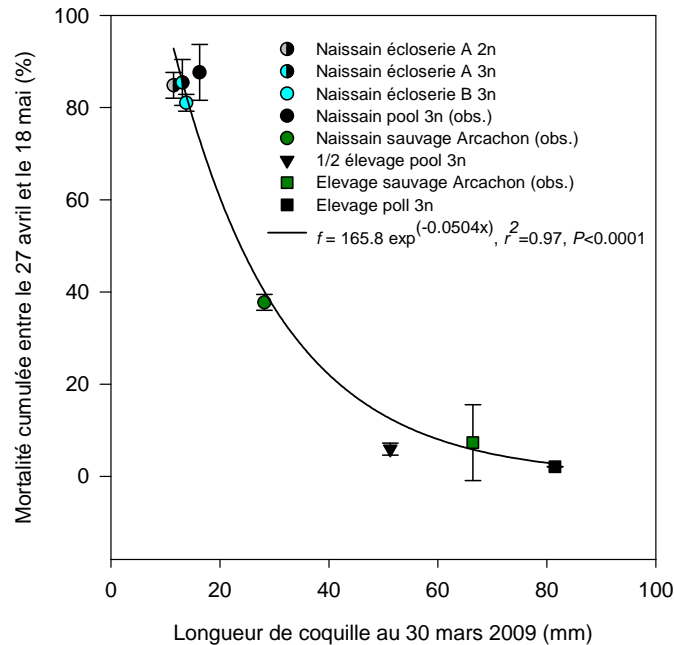


Figure 13. Mortalité cumulée moyenne (n=3 cordes, ± EC) entre le 27 avril et le 18 mai 2009 d’huître creuse *Crassostrea gigas* sur l’étang de Thau en fonction de la taille des lots lors du déploiement.

A ce jour, ces résultats suggèrent que la mortalité en 2009 est d’autant plus élevée que les animaux sont petits (Fig. 13). Cette observation peut refléter une relation causale de la taille sur la mortalité ou un effet plus général du parcours zootechnique qui est confondu avec la taille. En faveur de la première hypothèse, nous verrons que les animaux de plus petite taille disposent de moins d’énergie disponible que les animaux de grande taille, ce qui peut les fragiliser au point de les rendre sensibles à la mortalité. En revanche, une hypothèse alternative consiste à dire que les animaux de plus grandes tailles sont résistants aux mortalités simplement parce qu’ils y ont été exposés en 2008. Toutefois, le lot d’huître 3n placé en 1/2 élevage a été produit en été 2008 et transféré sur table méditerranéenne fin août 2009, de sorte qu’il est peu probable que ces animaux aient été exposés à la mortalité en 2008. Quoiqu’il en soit, une pratique culturale pour limiter la mortalité consisterait à éviter de déployer des animaux de taille < 30 mm fin mars dans l’étang, c’est à dire éviter les opérations de pré grossissement au printemps en faveur du pré grossissement automnal.

Afin de vérifier si les huîtres les plus grosses sont effectivement favorisées pour la survie par rapport aux plus petites en s’affranchissant de l’effet potentiel du parcours zootechnique différent entre les lots, nous avons examiné la structure de taille d’un lot avant, pendant et après la mortalité (Fig. 14). Le lot sur lequel porte cette analyse est le lot de naissain d’huîtres sauvages provenant de Arcachon pour lequel la série temporelle est complète. De manière générale, les distributions de fréquence sont au départ symétriques et unimodales et deviennent progressivement, au cours du temps, dissymétriques, bi-modales et aplaties (Fig. 14). Cette évolution des courbes de

distribution de fréquence de taille traduit simplement l'augmentation de la variance du lot au cours du temps. Cette tendance est exacerbée en période de démarrage des mortalités le 11 mai où l'aplatissement de la courbe de distribution de fréquence est plus marqué. Le 18 mai et le 25 mai, les mesures d'aplatissement des courbes diminuent pour devenir normales le 8 juin. Cette tendance est représentée statistiquement sur la figure 15.

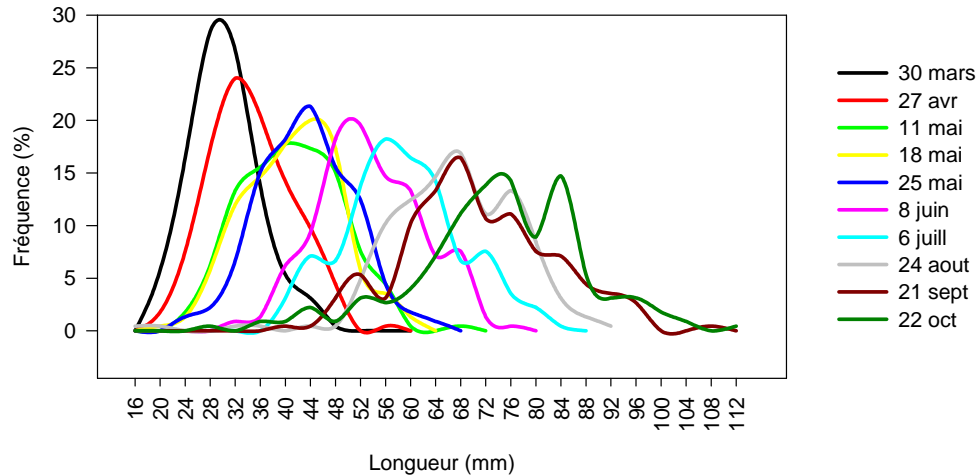


Figure 14. Distribution de fréquence de taille (longueur de coquille) d'un lot de naissain d'huître sauvage provenant de Arcachon à chaque campagne de prélèvement.

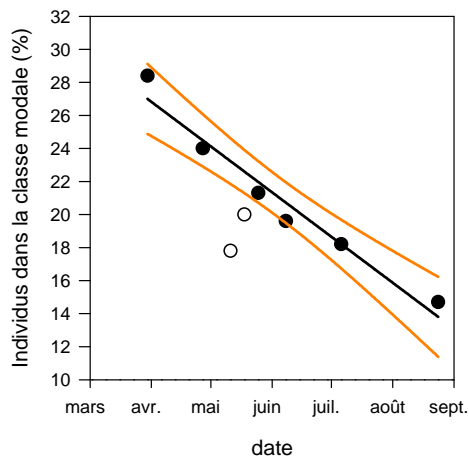
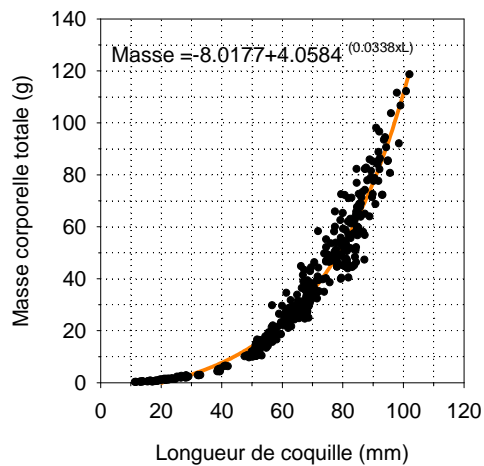


Figure 15. Proportion relative de naissain d'un lot d'huître sauvage provenant d'Arcachon compris dans la classe modale en fonction du temps : en période de mortalité (cercles blanc) et hors mortalité (cercles noirs). La ligne noire présente la régression significative en tenant compte des points hors mortalité uniquement ($r^2=0.958$, $P<0.001$). Les lignes oranges représentent l'intervalle de confiance à 95%.

En résumé, l'analyse des distribution de fréquence de taille de naissain du lot d'huîtres sauvages provenant d'Arcachon montre un changement de la structure de taille du lot qui se résume à un aplatissement de la courbe exacerbé par rapport à la tendance naturelle. Les plus gros animaux semblent favorisés au même titre que les plus petits. Par conséquent, l'analyse inter lot qui suggérait une relation négative taille / mortalité ne concorde pas avec l'analyse en intra lot. Il est possible que la variance observée en intra lot ne soit pas suffisante pour mettre en évidence l'effet taille observé en inter lot.

4.2.2.2. Masse corporelle totale



La masse corporelle totale des huîtres (tissu + coquille, frais) est corrélée positivement avec la longueur de coquille (Fig. 16). Par conséquent, les données de masse corporelle totale des huîtres ne seront pas présentées dans ce rapport afin d'éviter la redondance. A titre d'information, la relation entre la masse individuelle totale et la longueur de coquille des huîtres est présentée ci-contre (Fig. 16).

Figure 16. Relation entre la masse corporelle et la longueur de coquille de l'huître creuse *C. gigas* en culture sur l'étang de Thau en 2009.

4.2.2.3. Masse de chair sèche

La masse de chair sèche est un indicateur de la croissance des huîtres mais également des épisodes de ponte. La diminution de la masse de chair pendant la période estivale reflète généralement l'émission de gamètes. La perte de masse lors de l'émission des gamètes est un indicateur de l'effort reproducteur (Royer et al. 2008, Enriquez-Diaz et al. 2009).

La masse sèche de chair des naissains déployés dans l'étang de Thau était initialement de 13.3 ± 6.0 mg sauf le lot d'huîtres sauvages provenant d'Arcachon pour lequel la masse sèche de chair était de 53.9 mg le 30 mars. La masse de chair de tous les lots de naissain incluant les huîtres sauvages d'Arcachon augmente entre le 30 mars et le 27 avril à un taux moyen de 0.4 mg par jour (Fig. 18A). Entre le 27 avril et le 11 mai, période pendant laquelle les mortalités démarrent, le taux d'augmentation de la masse de chair triple pour atteindre en moyenne 1.1 mg par jour, de sorte que la masse de chair a augmenté d'un facteur 2.2 entre le 30 mars et le 11 mai. L'analyse particulière du lot d'huîtres sauvages provenant d'Arcachon montre que la masse de chair augmente en période de pré mortalité à un taux de 0.7 mg par jour contre 3.3 mg par jour en période de démarrage des mortalités. Pendant la période de constat des mortalités entre le 11 mai et le 25 mai, la masse de chair de ces huîtres continue d'augmenter à un taux de 9.0 mg par jour pour se stabiliser à 7.5 mg par jour entre le 25 mai et le 6 juillet. Une baisse significative de la masse sèche est observée entre le 6 juillet et le 27 juillet correspondant à une perte de 16% de la masse de chair sèche totale, soit 4.4 mg par jour. La masse de tissu augmente à partir du 24 août jusqu'à la fin de la période d'observation à un taux de 7.9 mg par jour. Le suivi de la masse de chair sèche montre donc une augmentation accrue avant et pendant l'épisode de mortalité et un épisode de ponte qui se situerait entre le 6 et le 27 juillet au cours duquel le naissain perd 16% de sa masse corporelle initiale.

La masse de chair dans les huîtres âgées de plus d'un an augmente d'un facteur de seulement 1.6 comparativement à 2.2 pour le naissain entre le 30 mars et le 11 mai lors du constat des mortalités (Fig. 18B). La masse de chair des huîtres sauvages provenant de Arcachon diminue entre le 25 mai et le 8 juin et entre le 6 juillet et le 27 juillet,

reflétant probablement deux épisodes de ponte. Les pertes de masse enregistrées correspondent respectivement à 13.6% et 52.8% de la masse sèche initiale. Le premier événement correspondrait à une ponte partielle et précoce, alors que le second événement serait la ponte principale. L'événement de ponte principale est synchronisé entre les adultes et les naissains (Fig. 18A et B) tel qu'observé en Normandie (Royer et al. 2008).

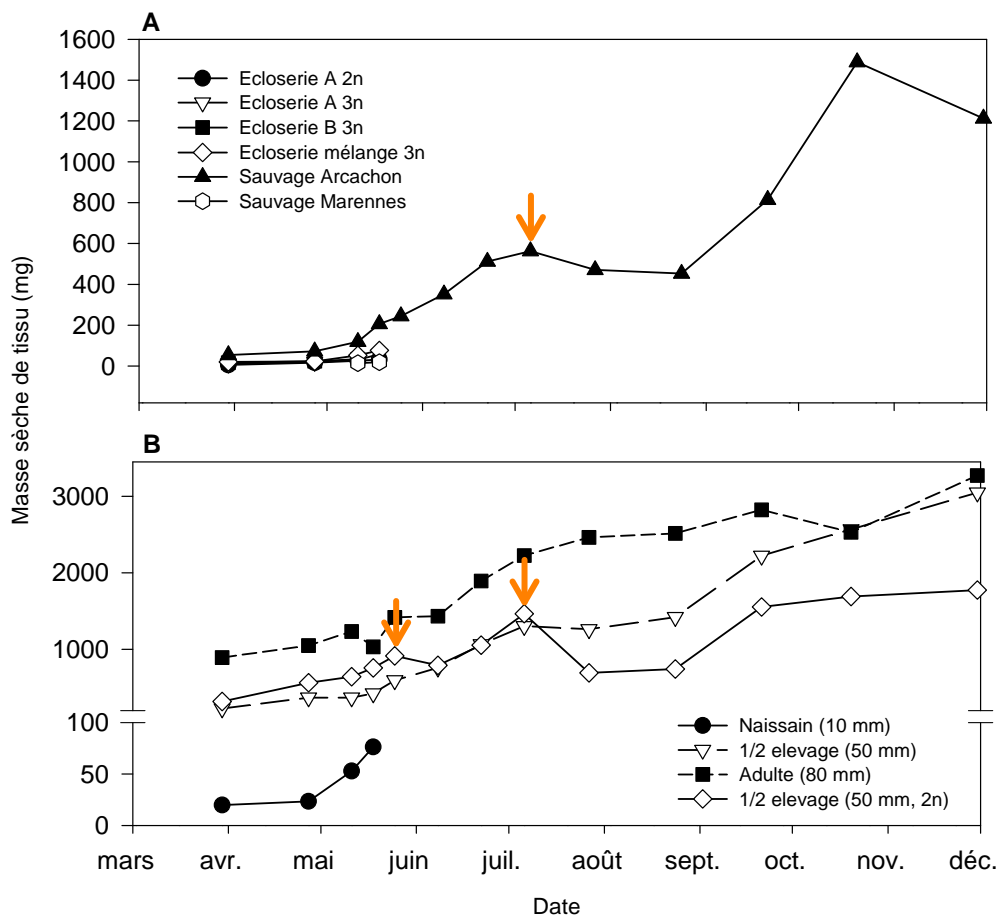


Figure 17. Evolution de la masse de chair sèche d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployés sur Thau (A), et des stades d'élevage pour des lots d'huîtres 3n constitués d'individus provenant de 4-5 écloseries françaises et des huîtres 2n sauvages provenant de Arcachon (B). Les flèches indiquent le début d'épisodes de ponte

4.2.3. Reproduction

Sur une période annuelle, l'analyse histologique des gonades permet l'identification de six étapes typiques du cycle gamétogénique. L'analyse qualitative histologique suggère que l'activité gamétogénique du lot d'huîtres adultes est plus précoce que celle du lot de naissains (Fig. 18). Alors que les huîtres ont une activité gamétogénique faible en avril (stades 0 et 1), les huîtres

du lot adulte atteignent le stade 3 (maturité) dès le 11 mai alors que les naissains sont aux stades 0, 1 et 2. Le lot d'huîtres adulte régresse aux stades 0, 1 et 2 le 18 mai, suggérant une émission partielle de gamètes alors que le lot de naissains poursuit sa maturation. Entre le 8 juin et le 6 juillet, la majorité des huîtres adultes et naissains sont au stade 4 (mature, prêt à pondre). Le 27 juillet, la majorité des huîtres adultes et naissains sont au stade 5, indiquant que la ponte principale a eu lieu. La résorption des gamètes a lieu à partir de septembre.

L'analyse qualitative histologique montre que le démarrage des mortalités de naissain qui a lieu entre le 27 avril et le 11 mai précède l'atteinte de la maturité sexuelle et précède de loin la ponte qui se produit entre le 6 juillet et le 27 juillet.

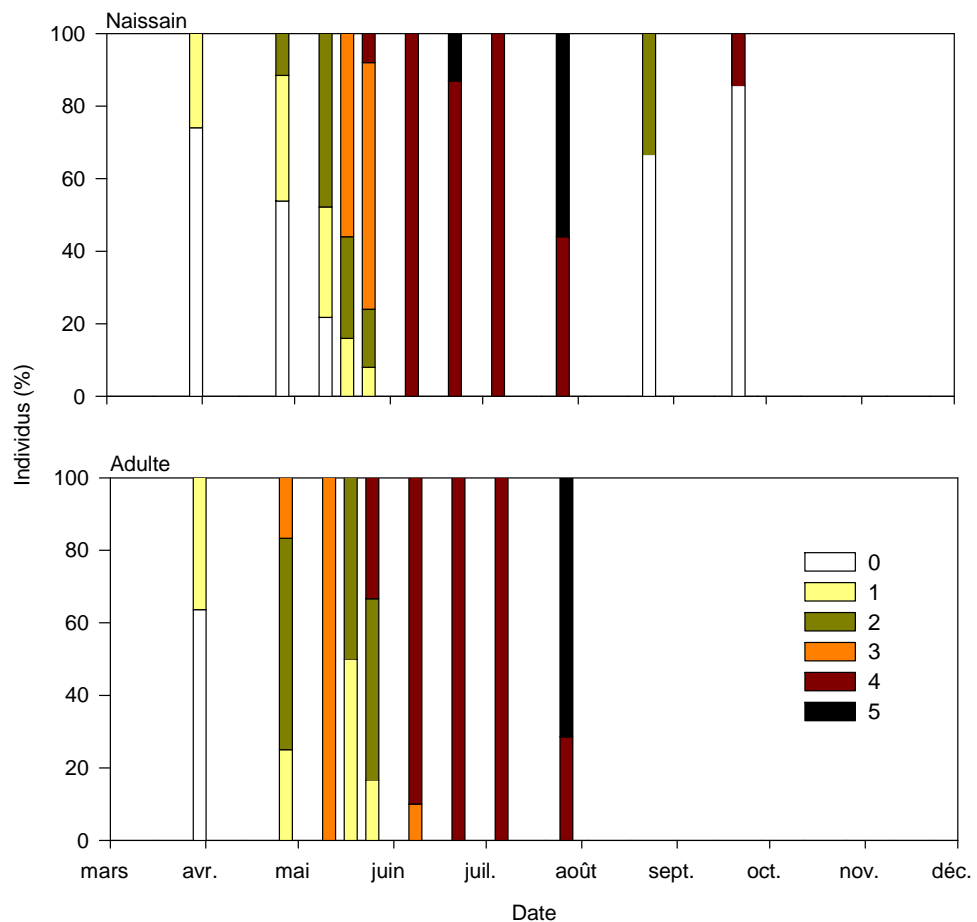


Figure 18. Evolution du stade de maturation des huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Les lots d'huîtres examinés sont constitués de naissains (haut) et adultes (bas) sauvages provenant de Arcachon. Les stades de développement gonadiques sont : 0 (pas de gamète, repos sexuel), 1 (follicule petits et dispersés), 2 (follicules en développement actif), 3 (follicules matures), 4 (follicules matures, prêt à pondre) et 5 (pondu, follicules de grandes tailles dispersés).

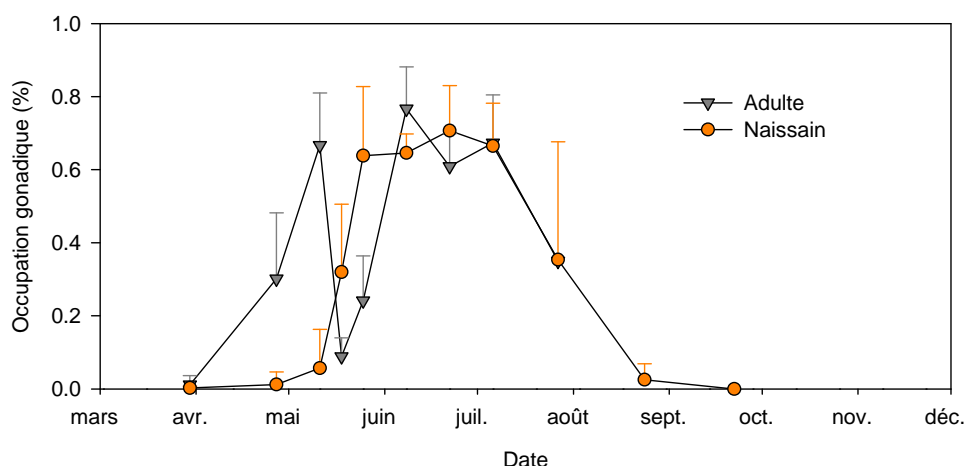


Figure 19. Evolution du pourcentage d'occupation gonadique évalué en histologie quantitative des huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Les lots d'huîtres examinés sont constitués de naissains (haut) et adultes (bas) diploïdes sauvages provenant de Arcachon.

Le pourcentage d'occupation gonadique dans la masse viscérale du lot d'huîtres adultes augmente rapidement entre le 30 mars et le 11 mai pour atteindre 66% (Fig. 19). Il chute le 18 mai à 9%, témoignant d'un premier événement de ponte qui n'a pas lieu chez le naissain. Cet événement de ponte partiel était également visible (à une semaine près) grâce à l'analyse du poids sec (voir section précédente).

Le pourcentage d'occupation gonadique des huîtres adultes augmente à nouveau pour atteindre la valeur maximale annuelle de 77% le 8 juin. Par la suite, il diminue légèrement de 15%, reflétant vraisemblablement une émission partielle de gamètes. Le 6 juillet, le déclin rapide du pourcentage d'occupation gonadique à 35% le 27 juillet traduit l'événement de ponte principale. Cette dynamique de ponte en deux temps avait déjà été observé dans la baie de Marennes Oléron (Enriquez-Diaz et al. 2009).

Le pourcentage d'occupation gonadique du lot de naissains suit une dynamique sensiblement différente de celle observée sur le lot d'huîtres adultes (Fig. 19). Tout d'abord, le premier événement de ponte observé chez les adultes le 11 mai n'a pas lieu chez le naissain pour lequel le pourcentage d'occupation gonadique est de seulement 32% à cette date. D'autre part, le pourcentage d'occupation gonadique du naissain atteint une valeur maximale de 71% le 22 juin alors que les adultes ont déjà commencé à émettre des gamètes. En revanche, comme pour les adultes, le pourcentage d'occupation gonadique du naissain décline rapidement à 35% le 27 juillet (3% le 24 août) traduisant l'évènement de ponte principal de l'année.

Le démarrage des mortalités de naissain qui a lieu entre le 27 avril et le 11 mai coïncide avec l'amorce de la reproduction, puisque, dans cet intervalle de temps, le pourcentage d'occupation gonadique augmente sensiblement de 1% à 6% (Fig. 19).

Les différents descripteurs de reproduction utilisés dans le cadre de cette étude, c'est à dire le suivi de la masse sèche et les analyses qualitatives et quantitatives en histologie, concordent et permettent de dire que la mortalité du naissain se produit à l'initiation de l'activité gamétogénique, avant la période de maturité sexuelle et bien avant la ponte. Par ailleurs, ces descripteurs indiquent que l'activité reproductrice des adultes et du naissain diffèrent : les adultes effectuent une ponte partielle mi mai alors que les naissains sont en phase de maturation et de mortalité.

4.2.4. Energétique

4.2.4.1. Modélisation DEB

L'évolution temporelle des variables forçantes du modèle DEB est illustrée figure 20 pour la teneur en chlorophylle *a* et la température de l'eau. Ces variables sont décrites dans les sections 4.1.1 et 4.1.2.

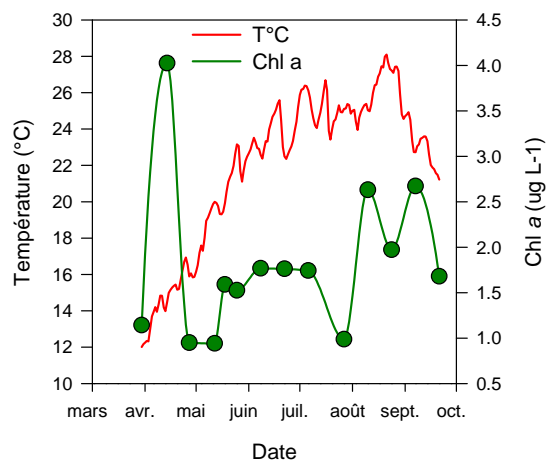


Figure 20. Température (°C) et chlorophylle *a* (µg L⁻¹) sur le site de Marseillan dans l'étang de Thau en 2009 en fonction du temps. Les données de température sont acquises en haute fréquence toutes les 10 min alors que la chlorophylle est analysée toutes les deux semaines environ.

Tel que décrit dans la section 4.2.2.3, le suivi de la masse de chair des huîtres adultes sauvages présente deux périodes de diminution témoignant d'épisodes de ponte mi mai et début juillet. A l'inverse, le naissain présente seulement une baisse significative de la masse de chair sèche, témoignant d'un épisode de ponte synchrone avec les adultes début juillet.

La croissance de la masse de chair sèche a été simulée avec une version actualisée du modèle DEB-huître, incluant l'effet de la température sur les processus physiologique (Bourlès et al. 2009). Le forçage trophique utilisée est la chlorophylle *a* dont on sait qu'il permet généralement une bonne simulation de la croissance des huîtres sur Thau (Pouvreau et al. 2006). Les simulations effectuées sur les huîtres adultes et naissains sont proches des valeurs observées entre le 30 mars et le 27 juillet (Fig. 21). Au delà de cette période, les simulations surestiment largement la masse de chair observée dans les huîtres. Cette surestimation provient probablement du fait que la chlorophylle *a* n'est pas un bon descripteur de la ressource trophique disponible aux huîtres après le 27 juillet. D'autres estimateurs de la ressource trophique (flore totale, compte cellulaire) seront testés ultérieurement afin d'obtenir de meilleures simulations de la croissance en période automnale (Bourlès et al. 2009).

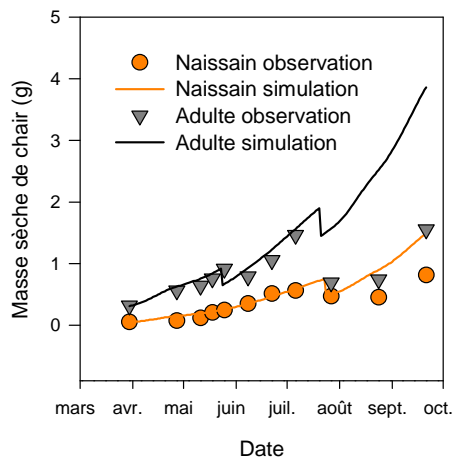


Figure 21. Comparaison entre la masse de chair sèche observée (symboles) et simulée (lignes) des huîtres naissains et adultes en utilisant la chlorophylle *a* comme estimateur de la ressource trophique.

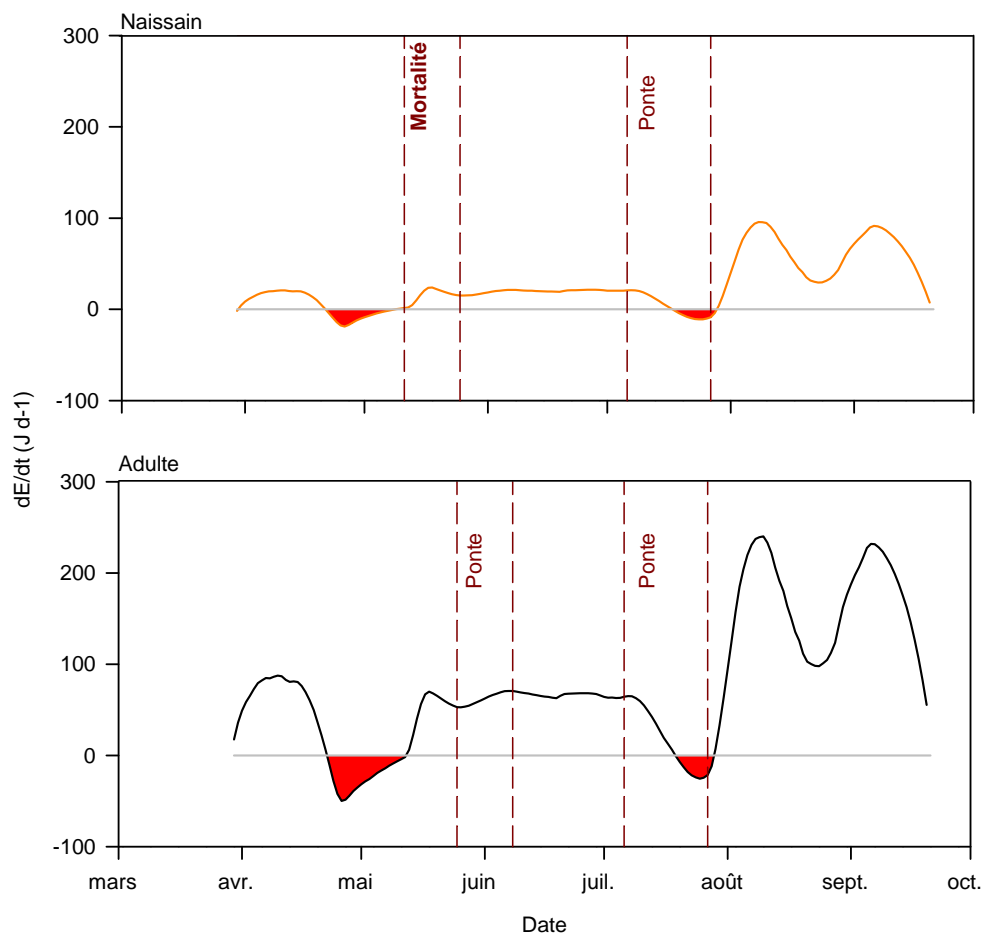


Figure 22. Dynamique de l'énergie de réserve dans les naissains (haut) et les adultes (bas) d'huître creuse *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau en 2009 en relation avec les événements de mortalité et de pontes (pointillés). La ligne de référence = 0 indique le point d'égalité entre les taux d'assimilation et d'utilisation de l'énergie. Lorsque $dE/dt > 0$, le taux d'assimilation est supérieur au taux d'utilisation de l'énergie et réciproquement. Les surfaces rouges indiquent les périodes pendant lesquelles le taux d'utilisation de l'énergie est supérieur au taux d'assimilation. Ces données sont issues de modélisation DEB.

Néanmoins, les croissances observées et simulées sont en adéquation pendant la période couvrant l'épisode de mortalité du naissain. Entre autre, les périodes de ponte simulées par le modèle coïncident avec les périodes de ponte déterminées par le suivi de la masse sèche de chair et l'histologie qualitative et quantitative.

L'adéquation entre la croissance observée et simulée pendant la période couvrant la mortalité du naissain permet d'extraire et examiner les variables d'état du modèle, parmi lesquelles la dynamique de l'énergie de réserve. Cette variable traduit la différence entre le taux d'assimilation et d'utilisation de l'énergie par l'huître. Cette variable peut prendre des valeurs négatives (l'animal dépense plus d'énergie qu'il n'en reçoit), égale à 0 (c'est le point d'équilibre énergétique où les entrées d'énergie sont égales aux dépenses) ou positive, c'est à dire que l'animal reçoit plus d'énergie qu'il n'en utilise. En terme mathématique, cette variable se traduit de la façon suivante :

$$\frac{dE}{dt} = \dot{p}_a - \dot{p}_c \quad (J d^{-1})$$

Où \dot{p}_a est le taux d'assimilation et \dot{p}_c est le taux d'utilisation de l'énergie de réserve (voir Pouvreau et al. 2006, Bourlès et al. 2009 pour la description du modèle).

Il est intéressant de constater que le taux d'utilisation de l'énergie est supérieur au taux d'assimilation pendant la période précédant le constat des mortalités, entre le 22 avril et le 9 mai (Fig. 22). Par conséquent, l'apparition des mortalités de naissains coïnciderait avec un affaiblissement énergétique. En revanche, les huîtres adultes semblent exposés à la même contrainte énergétique que les naissains et ne subissent pas de mortalité.

Notre hypothèse est que le niveau de réserve des huîtres adultes est supérieur à celui des naissains, de sorte que les effets d'un déficit énergétique sur les adultes seront différents de ceux observés sur les naissains (voir section suivante).

Accessoirement, cette configuration énergétique selon laquelle le taux d'utilisation est supérieur à l'assimilation se reproduit plus tard en fin de période de ponte entre le 18 juillet et le 28 juillet. Cela n'a pas engendré de mortalité supplémentaire à cette période, reflétant peut-être un phénomène de sélection d'animaux plus résistants suite à la mortalité printanière ou une configuration environnement, hôte et agents infectieux différente de celle du printemps.

4.2.4.2. Sucres totaux

Les sucres totaux sont généralement utilisés comme un indicateur du niveau de réserve énergétique des mollusques bivalves. Chez *C. gigas*, les sucres suivent généralement des cycles saisonniers d'accumulation et utilisation en relation avec le cycle reproducteur (Berthelin et al. 2000, Delaporte et al. 2006, Soletchnik et al. 2006). Plus précisément, les sucres accumulés pendant l'hiver sont utilisés pendant la gamétogénèse au profit de la synthèse des lipides et des protéines. L'accumulation des sucres reprend après la ponte, moment où les niveaux sont généralement faibles. Dans le cadre de notre étude, nous avons observé un cycle d'utilisation et de mise en réserve des sucres tel qu'observé dans la littérature scientifique (Fig. 23, $P_{date} < 0.001$). Sur un cycle annuel, le naissain d'huître sauvage provenant de Arcachon présente des teneurs en sucres de 23% inférieures à celles observées chez les adultes (Fig. 23, $P_{stade} = 0.031$).

Nous avons analysé la concentration en sucre des cinq lots de naissain et des trois lots d'huîtres âgées de plus d'un an prélevés en date du 27 avril, date la plus proche du constat des mortalités le 11 mai. Il y a des différences significatives dans la concentration en sucres des différents lots (ANOVA, $P=0.012$). Plus précisément, la concentration moyenne en sucre du naissain est deux fois plus faible (67.4 mg g^{-1} de

masse sèche) que celle des adultes qui contiennent en moyenne 132.6 mg de sucre g⁻¹ de masse sèche (Table 1). La différence de concentration en sucre entre les deux groupes (naissain [A 2n, A 3n, B 3n, Pool 3n, Sauvage] vs adulte [pool 3n, sauvage, pool 3n]) est hautement significative (contraste : $P=0.003$) et coïncide avec des différences marquées de survie.

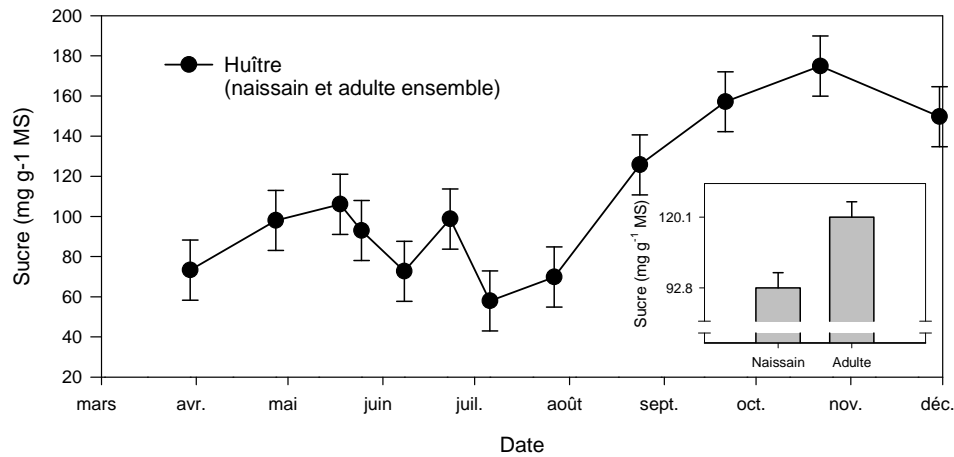


Figure 23. Concentration en sucres totaux en mg g⁻¹ de matière sèche d'huître creuse *Crassostrea gigas* sauvages provenant de Arcachon en fonction du temps (moyenne \pm erreur type, $n=3$ cordes \times 2 lots). Sur la figure principale, les lots de naissain et d'adulte ont été regroupés puisqu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'interaction stade \times date ($P=0.076$). L'encadré illustre l'effet simple du stade (naissain vs adulte) sur la teneur en sucre.

Table 1. Concentration en sucres et activité de l'enzyme citrate synthase (CS) des différents lots d'huître creuse *Crassostrea gigas* mis en élevage sur l'étang de Thau en 2009. Ces variables ont été mesurées le 27 avril 2009 avant le constat des mortalités le 11 mai (moyenne \pm écart-type, $n=3$ cordes).

Lot d'huître	Stade d'élevage	Sucres (mg g ⁻¹ tissu sec)	Activité CS (U mg ⁻¹ prot)
A 2n	Naissain	50 \pm 34	127 \pm 32
A 3n	Naissain	85 \pm 12	101 \pm 11
B 3n	Naissain	72 \pm 13	96 \pm 12
Pool 3n	Naissain	59 \pm 15	85 \pm 32
Sauvage Arcachon	Naissain	71 \pm 10	140 \pm 8
Pool 3n	½ élevages	163 \pm 58	103 \pm 39
Sauvage Arcachon	½ élevages	120 \pm 47	79 \pm 23
Pool 3n	Elevage	114 \pm 39	95 \pm 32

L'activité de la citrate synthase (CS), une enzyme clé du métabolisme énergétique aérobie, voie d'entrée du cycle de Krebs, varie généralement en fonction du statut énergétique des mollusques. Dans notre étude, l'activité CS est similaire entre les lots d'huître ($P=0.150$, Table 1). Or, l'activité de la CS, qui est généralement corrélée avec le taux de respiration et la production d'énergie chez les bivalves, devrait être supérieure chez les naissains par rapport aux adultes, reflétant plus ou moins la relation allométrique qui existe entre la masse corporelle et le métabolisme aérobie. L'absence de différence entre les deux groupes d'huître pourrait refléter un effet limitant de la

quantité d'énergie disponible aux huîtres associée ou non à une régulation par le niveau de sucres. Les adultes, en absence de nourriture, pourraient maintenir une activité CS plus ou moins normale grâce à leurs réserves en sucres, alors que le naissain diminue l'activité de cette enzyme par manque de substrat (réserve et alimentation). Malgré l'absence de différence significative entre les lots, on remarque cependant que les activités CS les plus élevées sont obtenues pour le naissain d'huître sauvage provenant d'Arcachon, le seul à avoir survécu à l'épisode de mortalité.

4.2.4.3. Conclusion

Les résultats de modélisation DEB suggèrent que les huîtres adultes et naissains sont entrés dans une phase de déficit énergétique entre le 22 avril et le 9 mai, précédant le constat des mortalités le 11 mai. Cela avait déjà été mentionné dans le cadre du défi Morest (Samain & McCombie 2008 p94). Les auteurs montrent que le déficit énergétique reflète l'effet de températures croissantes combiné à une baisse de la quantité de nourriture dans le milieu et de l'assimilation par l'huître en période de reproduction. En parallèle, nous avons vu que les naissains sont caractérisés par des teneurs en sucres deux fois inférieures aux huîtres adultes, de sorte que les naissains sont probablement moins résistants à un déficit énergétique que les adultes. Finalement, les lots de naissain présentent des capacités de production d'énergie similaires à celles des adultes alors que nous attendions à ce qu'elles soient supérieures, compte tenu de la relation allométrique qui existe entre la masse corporelle et le métabolisme aérobie. Par conséquent, un déficit énergétique pourrait avoir fragilisé le naissain en particulier, et ainsi, contribué au phénomène de mortalité. Il faut dorénavant vérifier si ce résultat est une coïncidence fortuite ou si cette configuration se reproduit sur d'autres sites de l'Observatoire National Conchylicole, pour lesquelles nous disposons des données de température en haute fréquence, d'abondance trophique (chlorophylle *a*, flore) et de croissance des huîtres adultes et naissain de la même origine que celles que nous avons suivies dans cette étude afin d'évaluer, avec le modèle DEB huître, les flux d'énergie.

4.2.5. Pathologie

L'objectif des analyses menées en pathologie sur les échantillons prélevés lors du suivi de l'huître creuse était de rechercher si des agents infectieux connus pouvaient être associés ou pas à des phénomènes de surmortalité. La recherche de ces agents a été réalisée soit après isolement par culture sur milieu synthétique, soit au moyen d'outils moléculaires spécifiques (PCR en temps réel ou PCR classique), ceci pour l'herpès virus OsHV-1 et des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus*).

Les résultats des analyses des tissus d'huître prélevés le 27 avril, juste avant le constat des mortalités le 11 mai, montrent que les charges virales OsHV-1 étaient inférieures à 10^4 copies mg^{-1} de tissu frais, seuil au-delà duquel on considère qu'il y a répllication active du virus dans l'hôte témoignant de son action dans le processus morbide.

En revanche, en date du 11 mai, tous les lots de naissain d'huître présentent des charges élevées de OsHV-1 supérieures à 10^6 cp mg^{-1} de tissu, signe d'infection suggérant que le virus herpes OsHV-1 est impliqué dans le phénomène de mortalité (Table 3). Les lots de moule maintenus sur la même table au voisinage des huîtres infectées analysés en parallèle présentent des charges inférieures à 100 cp mg^{-1} de tissu, niveau de portage non associé à des mortalités liées à OsHV-1.

Table 3. Charges en herpes virus OsHV-I (exprimée en nombre de copies d'ADN viral par mg de tissu) et *Vibrio splendidus* (en nombre de colonies formant des unités ou cfu par g de tissu) détectées dans les différents lots d'huître creuse *Crassostrea gigas* mis en élevage sur l'étang de Thau en 2009. Ces charges ont été mesurées le 11 mai 2009 pendant le constat des mortalités sur les lots pour lesquelles il restait des animaux « présumés sains » (moyenne \pm écart-type, n=3 échantillons).

Lot d'huître	Stade d'élevage	OsHV-I (10^6 cp mg^{-1} tissu)	<i>V. splendidus</i> (10^6 cfu g^{-1})
B 3n	Naissain	15541.0 \pm 12714.4	23.6 \pm 13.2
Pool 3n	Naissain	1613.4 \pm 1104.4	10.4 \pm 9.2
Sauvage Arcachon	Naissain	43.4 \pm 51.4	2.2 \pm 5.9

De façon similaire à OsHV-I, les huîtres prélevées le 27 avril avant mortalité présentent des valeurs faibles inférieures à 10^4 cfu g^{-1} de tissu de *Vibrio splendidus* alors que pendant le constat des mortalités, la concentration de *V. splendidus* augmente jusqu'à atteindre 10^6 - 10^7 cfu g^{-1} .

En conclusion, ces résultats suggèrent que le virus herpes OsHV-I et *V. splendidus* sont impliqués dans le processus morbide du naissain d'huître creuse, la coinfection pouvant contribuer à amplifier le phénomène.

4.2.6. Métabolisme oxydatif et acides gras membranaires

Dans le cadre de cette étude, nous avons examiné l'activité de l'enzyme SOD et l'indice de peroxydation des acides gras membranaires dans les différents lots d'huître creuse mis en élevage sur l'étang de Thau en 2009 en date du 27 avril, juste avant le constat des mortalités le 11 mai, afin de tester l'hypothèse selon laquelle il y a une relation entre le métabolisme oxydatif et la mortalité future (Table 4).

Table 4. Activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), indice de peroxydation des acides gras membranaires et acide arachidonique (20:4n-6) des différents lots d'huître creuse *Crassostrea gigas* mis en élevage sur l'étang de Thau en 2009. Ces variables ont été mesurées le 27 avril 2009 avant le constat des mortalités le 11 mai (moyenne \pm écart-type, n=3 cordes).

Lot d'huître	Stade d'élevage	Activité SOD (U mg^{-1} prot)	Indice de péroxydation	20:4n-6 (mole %)
A 2n	Naissain	151 \pm 26	326 \pm 5	2.6 \pm 0.0
A 3n	Naissain	195 \pm 17	327 \pm 4	2.5 \pm 0.1
B 3n	Naissain	181 \pm 8	311 \pm 1	2.4 \pm 0.0
Pool 3n	Naissain	160 \pm 33	327 \pm 4	2.5 \pm 0.1
Sauvage Arcachon	Naissain	136 \pm 21	327 \pm 1	2.8 \pm 0.1
Pool 3n	½ élevages	144 \pm 11	320 \pm 9	2.6 \pm 0.2
Sauvage Arcachon	½ élevages	220 \pm 10	333 \pm 7	3.2 \pm 0.2
Pool 3n	Elevage	203 \pm 18	336 \pm 6	3.7 \pm 0.8

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les activités SOD enregistrées entre les différents lots d'huîtres, de sorte qu'il n'y a pas de relation entre les activités SOD et les différentiels de mortalité entre les lots. L'indice de peroxydation lipidique varie en fonction des lots mais ne présente pas de pattern cohérent avec la mortalité ou les activités SOD.

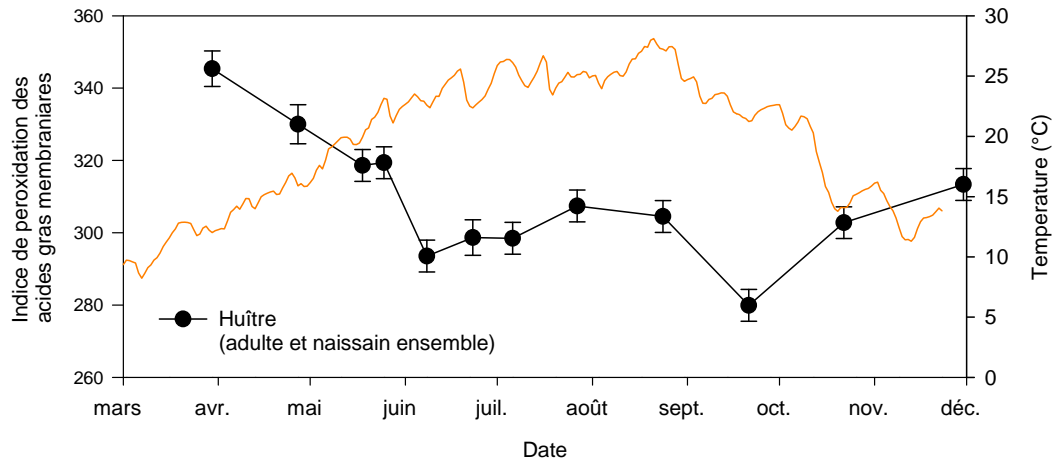


Figure 24. Indice de peroxydation des acides gras membranaires d'huître creuse *Crassostrea gigas* sauvages provenant de Arcachon en fonction du temps (moyenne \pm erreur type, $n=3$ cordes \times 2 lots), en relation avec la température du milieu. Les lots de naissain et d'adulte ont été regroupés puisqu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'interaction stade \times date ($P=0.475$).

L'indice de peroxydation des acides gras membranaires diminue de $\sim 15\%$ pendant toute la période printanière jusqu'au 8 juin (Fig. 24) coïncidant avec une augmentation de la température du milieu de 10.6°C . Par conséquent, la baisse observée de l'indice de peroxydation peut refléter le remodelage des lipides membranaires qui se produit normalement lorsque les bivalves sont exposés à des changements de température, tel que prédit par la théorie de l'adaptation homéovisqueuse (Hazel 1995) et constaté à plusieurs reprises chez les bivalves marins (Pernet et al. 2006, Pernet et al. 2007, Pernet et al. 2008). Au contraire, en 2008, l'indice d'insaturation des acides gras membranaires des huîtres en 2008 diminuait pendant la mortalité alors que la température du milieu était stable, suggérant que le remodelage des lipides membranaire était mineur, privilégiant ainsi l'hypothèse du stress oxydatif sur les lipides. Les résultats obtenus dans cette étude ne permettent pas de conclure à un éventuel stress oxydatif précédant les mortalités d'huîtres creuses.

Le niveau d'acide arachidonique (20:4n-6), un acide gras généralement associé aux fonctions immunitaires et inflammatoires, varie en fonction des lots d'huître creuse (Table 4), mais n'est pas corrélé avec les mortalités à venir. En revanche, le suivi à plus long terme de l'évolution de cet acide gras dans les lipides polaires des huîtres sauvages provenant de Arcachon (adulte et naissain) montre que la mortalité se produit suite à un enrichissement en 20:4n-6 des lipides polaires des naissains jusqu'à atteindre 3% des acides gras totaux (Fig. 25). En 2008, nous avons également observé que les mortalités démarraient alors que 20:4n-6 augmentait jusqu'à atteindre 3% dans les lipides polaires, suggérant que cet acide gras pourrait être un indicateur du risque de mortalité (Pernet et al. 2010).

Les acides gras poly insaturés à longues chaînes (20:4n-6, 20:5n-3 et 22:6n-3) suivent des variations saisonnières marquées reflétant à la fois les changements d'apports nutritionnels (voir section 4.1.2) et d'état physiologique associés à la reproduction (Fig. 25).

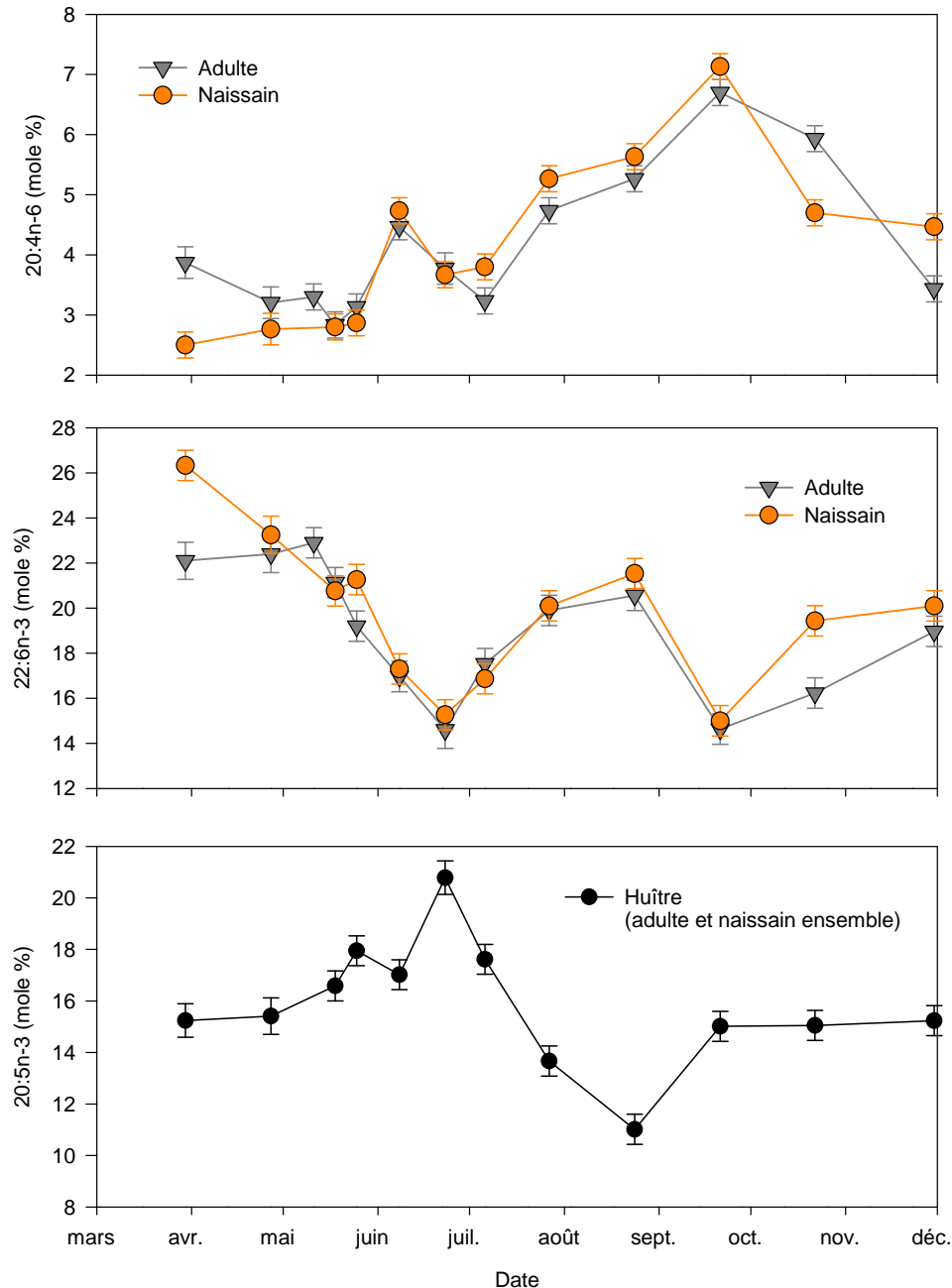


Figure 25. Concentrations relatives de 20:4n-6, 22:6n-3 et 20:5n-3 dans les lipides polaires d'huître creuse *Crassostrea gigas* sauvages provenant de Arcachon en fonction du lot (naissain vs adulte) et du temps (moyenne \pm erreur type, n=3 cordes). Les lots de naissain et d'adulte ont été regroupés lorsqu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'interaction stade \times date (20:5n-3, $P=0.712$, n=3 cordes \times 2 lots).

Le temps et le stade de développement (adulte vs. naissain) interagissent dans leurs effets sur 20:4n-6 et 22:6n-3 : l'effet du stade de développement se manifeste essentiellement au début du suivi, avant la mortalité du naissain (Fig. 25). Suite à la

mortalité, ces deux acides gras évoluent de la même façon quel que soit le stade développement (Fig. 25). Par conséquent, un élément discriminant ces deux lots d'huîtres qui présentent des potentiels de survie différents, est la teneur en acides gras essentiels au départ, qui est probablement associé au parcours zootechnique des lots.

4.2.7. Conclusion

Les mortalités d'huîtres creuses en 2009 touchent spécifiquement le naissain quelles que soient l'origine et la ploïdie, lorsque la température de l'eau atteint 17.5°C. Par rapport aux années 2007 et 2008, la mortalité s'intensifie et le seuil thermique d'apparition des mortalités est abaissé de ~2°C, de sorte que les mortalités habituellement « estivales » sont plutôt « printanières ». Alors que les mortalités touchent les huîtres cultivées dans les étangs de Thau et de Diana, les huîtres maintenues en mer à -22m au large de Marseillan demeurent indemnes.

Le démarrage des mortalités de naissain constaté le 11 mai coïncide avec un emballement du taux de croissance de l'huître qui double ou triple selon le descripteur utilisé (longueur de coquille ou masse sèche de chair), alors que les animaux âgés de plus d'un an qui ne subissent pas de surmortalité maintiennent des taux de croissance stable pendant cette période.

D'autre part, le démarrage des mortalités de naissain coïncide avec l'initiation de l'activité gamétogénique, avant l'atteinte de la maturité sexuelle et bien avant la ponte. Ce décalage entre la maturité sexuelle et l'apparition des mortalités est plutôt atypique. Les observations faites en 2008 sur Thau ou plus généralement dans le cadre du défi Morest montraient que l'apparition des mortalités succédait à l'atteinte de la maturité sexuelle et se situait proche de la période de ponte.

L'analyse de la dynamique de l'énergie de réserve obtenue par modélisation DEB suggère que les huîtres sont entrées dans une période de déficit énergétique 21 jours avant le constat des mortalités. Compte tenu que les réserves énergétiques (sucres totaux) des naissains sont inférieures à celles des adultes, les naissains sont probablement plus sensibles à un déficit énergétique que les adultes. Enfin, les lots de naissain présentent des capacités de production d'énergie similaires à celles des adultes alors que nous attendions à ce quelles soient supérieures. Par conséquent, les résultats obtenus par voie de modélisation bioénergétique, analyse des sucres totaux ou enzymologie vont tous dans le sens d'un déficit énergétique avant le déclenchement des mortalités qui fragiliserait particulièrement le naissain caractérisé par des réserves énergétiques inférieures aux adultes.

Enfin, l'apparition des mortalités coïncide avec des charges élevées de virus herpes OsHV-I dans le naissain d'huître suggérant que ce dernier est impliqué dans le phénomène de mortalité. En revanche, 14 jours avant le constat des mortalités, les charges virales OsHV-I étaient remarquablement faibles, bien en deçà du seuil de répllication active du virus, quelles que soient l'origine des huîtres et leur sensibilité à la mortalité. Il ne peut être exclu que les huîtres utilisées dans cette étude étaient porteurs d'agents pathogènes à des niveaux très faibles possiblement inférieurs aux seuils de détection. Il demeure que le déclenchement

de l'infection par le virus herpès est soudain, d'évolution rapide et relativement « imprévisible ».

D'un point de vue plus appliqué, nous avons constaté que le risque de mortalité en 2009 est d'autant plus élevé que les animaux sont petits. Nos résultats suggèrent qu'une pratique culturale pour limiter la mortalité consisterait à éviter de déployer des animaux de taille < 30 mm fin mars, c'est à dire éviter les opérations de pré grossissement au printemps en faveur du pré grossissement automnal.

D'autre part, nous avons constaté que les naissains sont touchés de la même façon par les surmortalités quelles que soient leur origine (naturel vs. éclosion) et leur ploïdie (2n vs 3n). Par conséquent, il n'est pas possible, sur la base des données acquises dans le cadre de ce projet, de favoriser une voie d'approvisionnement en naissain plus qu'une autre pour limiter le risque de mortalité.

D'autre part, nous avons constaté que les naissains déployés en mer ouverte à 22m de profondeur n'ont pas souffert de surmortalité. Malgré l'absence de données scientifiques antérieures à 2009, il semble que cela ait été également le cas en 2007 et 2008, de sorte que l'ostréiculture en mer ouverte peut être une voie intéressante, au moins pour sécuriser le pré grossissement. Cet aspect sera discuté dans la section suivante.



4.3. Effet du transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau

Les huîtres triploïdes provenant de l'écloserie B maintenues en filière en mer au large de Sète à 22m de profondeur depuis fin mars 2009 ont été transférées sur l'étang de Thau le 29 mai dans trois paniers sur la Table Ifremer située dans la zone de Marseillan.

L'objectif de ce transfert consiste à suivre à un pas de temps serré la cinétique des éventuelles mortalités. Ces huîtres étaient qualifiées de naïves mais sensibles à la mortalité : ces huîtres maintenues en mer n'avaient subi aucune mortalité, alors que le même lot transféré dans l'étang de Thau fin mars présentait 80-100% de mortalité entre le 11 et le 18 mai (voir section 4.2.1).

4.3.1. Mortalité

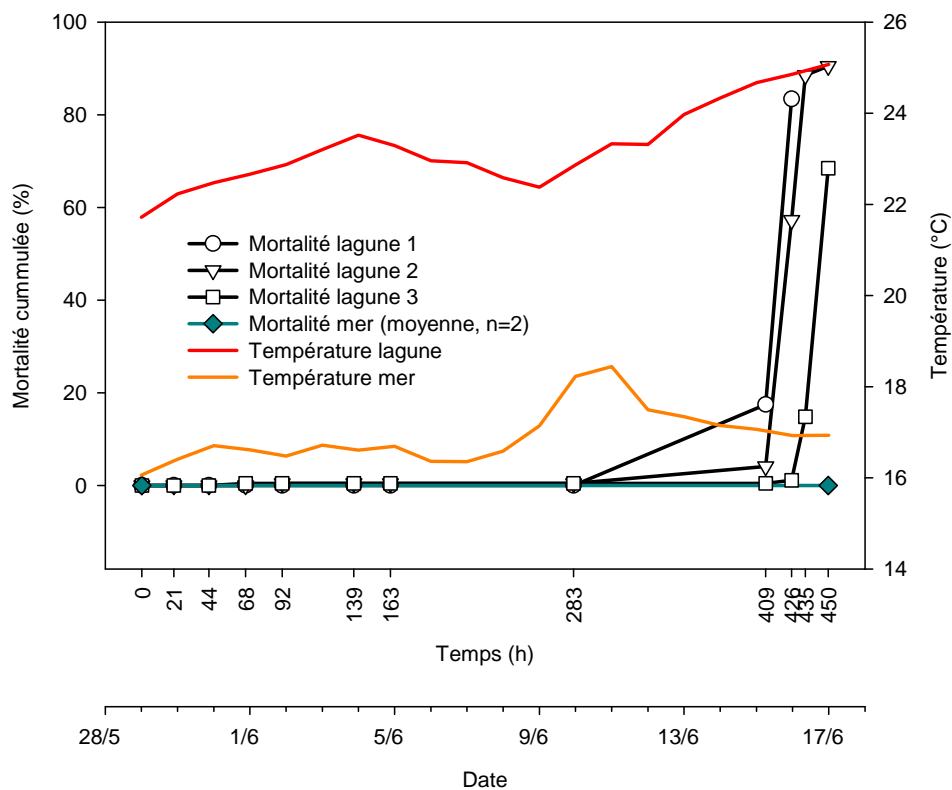


Figure 26. Mortalités cumulées d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Les huîtres ont été transférées de la mer ouverte vers l'étang de Thau le 29 mai (lignes noires) ou maintenues en mer ouverte (ligne bleue). Les températures mesurées en haute fréquence dans la lagune de Thau et en mer ouverte sont indiquées en rouge et orange respectivement.

La cinétique des mortalités d'huîtres creuses dans l'étang de Thau faisant suite à un transfert d'animaux triploïde naïf et sensible de la mer ouverte est présentée figure 25.

Le 15 juin, soit seize jours suivant le transfert des huîtres de la mer ouverte vers l'étang de Thau, les premières mortalités apparaissent dans un panier. Le jour suivant, la mortalité touche les trois paniers en proportions variables entre 2% et 82%. Enfin, le 17 juin, soit 41 h après le constat des premières mortalités, la mortalité est généralisée, variant entre 70% et 86%. En parallèle, les huîtres témoins maintenues en mer (Fig. 26) ainsi que les naissains sauvages suivis dans le cadre de l'observatoire (Fig. 10) ne présentaient pas de surmortalité pendant cette période. L'expérience est arrêtée le 17 juin puisqu'il ne restait plus d'huître à cause de la mortalité et des prélèvements.

4.3.2. Pathologie

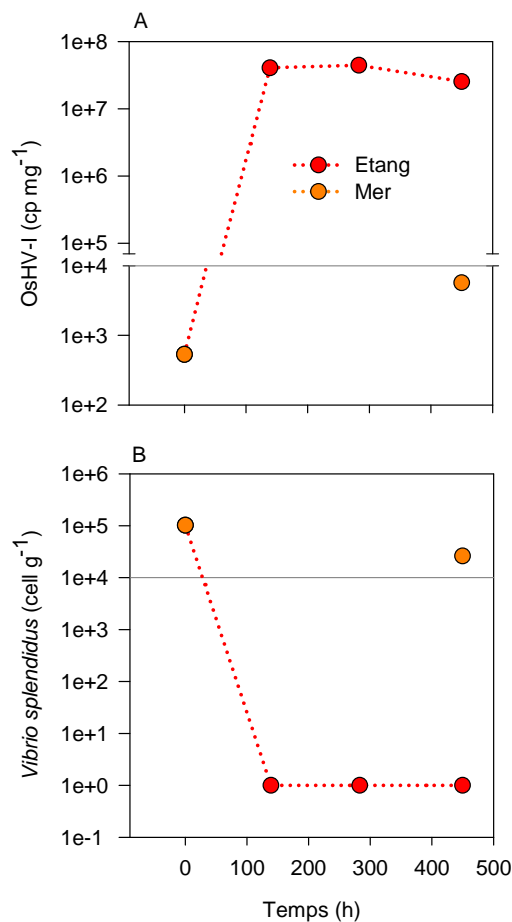


Figure 27. Détection du virus herpes OsHV-I et *Vibrio splendidus* dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées dans l'étang de Thau (rouge) ou maintenues en mer (orange). La ligne de référence = 10⁴ indique la charge virale seuil au delà de laquelle le virus herpès est considéré comme impliqué dans le processus morbide.

Le transfert de la mer ouverte vers l'étang de Thau conduit à une infection massive des huîtres par le virus herpès, visible dès le 1^{er} prélèvement après seulement 6 jours (139 h, Fig. 27A). Tous les individus échantillonnés sont positifs pour la détection d'OsHV-1. Les charges virales observées témoignent d'une répllication intense du virus. Les charges virales se maintiennent à des niveaux élevés supérieures à 10^7 cp mg^{-1} de tissu jusqu'à la fin de l'expérience où la mortalité moyenne constatée des huîtres est de 84%.

A l'inverse, le transfert de la mer vers l'étang conduit à un abaissement de la concentration en *Vibrio splendidus* dans les huîtres au point d'être indétectable après 6 jours (Fig. 27B). Par conséquent, on peut supposer que le transfert en étang conduit à une infection par le virus herpès concomitante avec un changement de la microflore bactérienne de l'huître. Ces données confirment le pouvoir infectieux du virus au cours d'un suivi sur le terrain.

4.3.3. Energétique

La concentration en sucres totaux des naissains triploïdes provenant de l'écloserie B maintenus en mer ouverte est de 84 mg g^{-1} de tissu sec avant le transfert en étang le 29 mai (Fig. 28A). Cette concentration est similaire à l'observation faite sur le même lot d'huître maintenu en étang en date du 27 avril (Table 1). En revanche, l'activité de la citrate synthase (CS) des huîtres maintenues en mer avant le transfert est de seulement 53 U mg^{-1} protéine (Fig. 28B), ce qui est faible comparativement aux valeurs enregistrées le 27 avril sur le naissain déployé dans l'étang de Thau (Table 1).

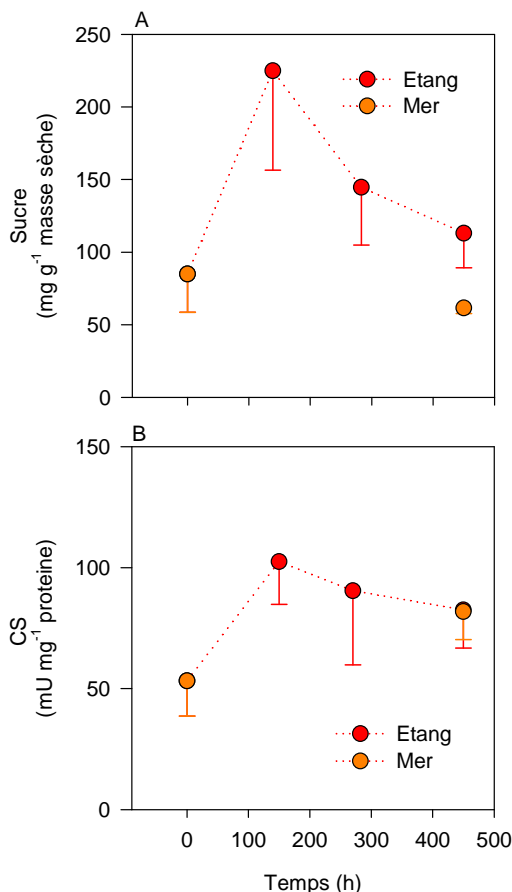


Figure 28. Concentration en sucres et activité de l'enzyme citrate synthase (CS) dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées dans l'étang de Thau (rouge) ou maintenues en mer (orange).

Suite au transfert des huîtres de la mer ouverte dans l'étang de Thau, la concentration en sucre dans les naissains augmente d'un facteur 3 jusqu'à atteindre 225 mg g^{-1} de tissu sec après seulement 6 jours, puis diminue rapidement à 113 mg g^{-1} de tissu sec à la fin de l'expérience (Fig. 28A). Comparativement, les huîtres témoins maintenues en mer ouverte présentent à la fin de l'expérience des concentrations en sucres totaux de seulement 61.5 mg g^{-1} de tissu sec, soit deux fois moins que les animaux maintenus en étang. Par conséquent, malgré l'absence de prélèvement intermédiaire en mer ouverte, il semble que l'accumulation et la consommation rapide et marquée des sucres sont caractéristiques des huîtres transférées dans l'étang de Thau. En parallèle, l'activité CS, enzyme associée à la production d'énergie, augmente dans les huîtres suite au transfert en étang et se stabilise en moyenne à 91 U mg^{-1} protéine, valeur similaire à ce qui était observée sur le naissain dans l'étang de Thau le 27 avril et dans les huîtres témoins maintenues en mer ouverte à la fin de l'expérience.

Le transfert des huîtres de la mer ouverte dans l'étang de Thau qui a conduit à la mortalité totale du lot après 18 jours et à une infection massive par le virus herpès OsHV-1 engendre par ailleurs une accumulation et une utilisation rapide et marquée des sucres qu'il est difficile d'interpréter à l'heure actuelle. Ce « désordre énergétique » peut être un effet secondaire de l'infection par le virus herpès, un effet chronique du changement de température ($+5.6^\circ\text{C}$ lors du transfert) ou un effet du changement de la qualité nutritionnelle du milieu (voir section suivante).

4.3.4. Environnement nutritionnel

Le rapport de 16:1n-7 et 16:0 (un indicateur de la présence de diatomées dans le régime alimentaire de l'huître) dans les huîtres maintenues en mer présentent des valeurs proches de 1 (Fig. 29A), soit près de $2\times$ supérieures à celui des huîtres diploïdes provenant de Arcachon maintenues sur l'étang de Thau au même moment (Fig. 8A). Ce résultat suggère que les diatomées contribuent relativement moins au régime alimentaire de l'huître en étang par rapport à en mer. D'ailleurs, les valeurs de 16:1n-7/16:0 diminuent d'un facteur $2\times$ suite au transfert dans l'étang de Thau des huîtres initialement maintenues en mer (Fig. 29A).

En contrepartie, les valeurs de 18:2n-6 + 18:3n-3, deux acides gras typiques de plantes vasculaires terrestres (Budge & Parrish 1998), représentent seulement 1.1% des acides gras totaux des huîtres maintenues en mer (Fig. 29C) contre 5.4-3.4% dans huîtres diploïdes maintenues sur l'étang de Thau au même moment (Fig. 8C), suggérant que la matière organique d'origine terrestre (ou plantes vasculaires) contribuent relativement moins au régime alimentaire de l'huître en mer par rapport à en étang. D'ailleurs, les valeurs de 18:2n-6 + 18:3n-3 augmentent sensiblement suite au transfert dans l'étang de Thau des huîtres initialement maintenues en mer (Fig. 29C).

Enfin, les acides gras d'origine bactérienne représentent $\sim 2.2\%$ du total dans les huîtres triploïdes maintenues en mer avant le transfert (Fig. 29D) et dans les

huîtres diploïdes maintenues sur l'étang de Thau au même moment (Fig. 8D). Curieusement, la contribution des acides gras bactériens augmente jusqu'à atteindre 3.0% suite au transfert dans l'étang de Thau des huîtres initialement maintenues en mer, alors que les huîtres diploïdes et triploïdes maintenues respectivement dans l'étang et en mer ouverte et qui n'ont pas subi de transfert voient leur concentration stable à ~2.1% (Fig. 8D et 29D). Cette contribution accrue des acides gras bactériens dans les huîtres transférées dans l'étang pourrait être associée à l'infection en cours, une perturbation de la microflore, ou encore, un effet secondaire de l'augmentation de température au moment du transfert.

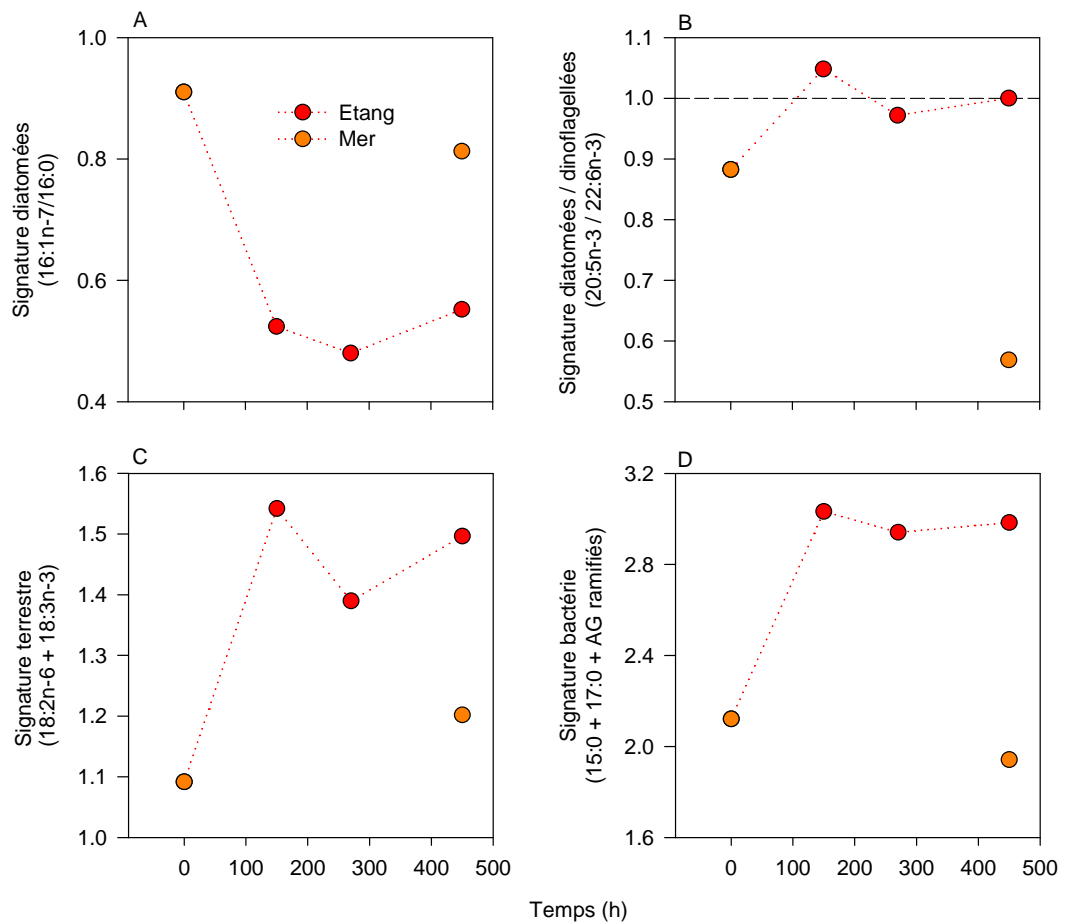


Figure 29. Evolution temporelle des principales signatures en acides gras dans les lipides de réserve des huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées dans l'étang de Thau (rouge) ou maintenues en mer (orange).

Ces résultats suggèrent que la contribution relative des diatomées au régime alimentaire de l'huître est supérieure en milieu marin par rapport au milieu lagunaire, au détriment de la matière organique d'origine terrestre. Par conséquent, le transfert des huîtres du milieu marin au milieu lagunaire conduit à un changement de la qualité nutritionnelle du milieu qui marque la signature lipidique des huîtres et qui pourrait être associé aux perturbations du métabolisme des sucres (voir section précédente).

4.3.5. Métabolisme oxydatif et acides gras membranaires

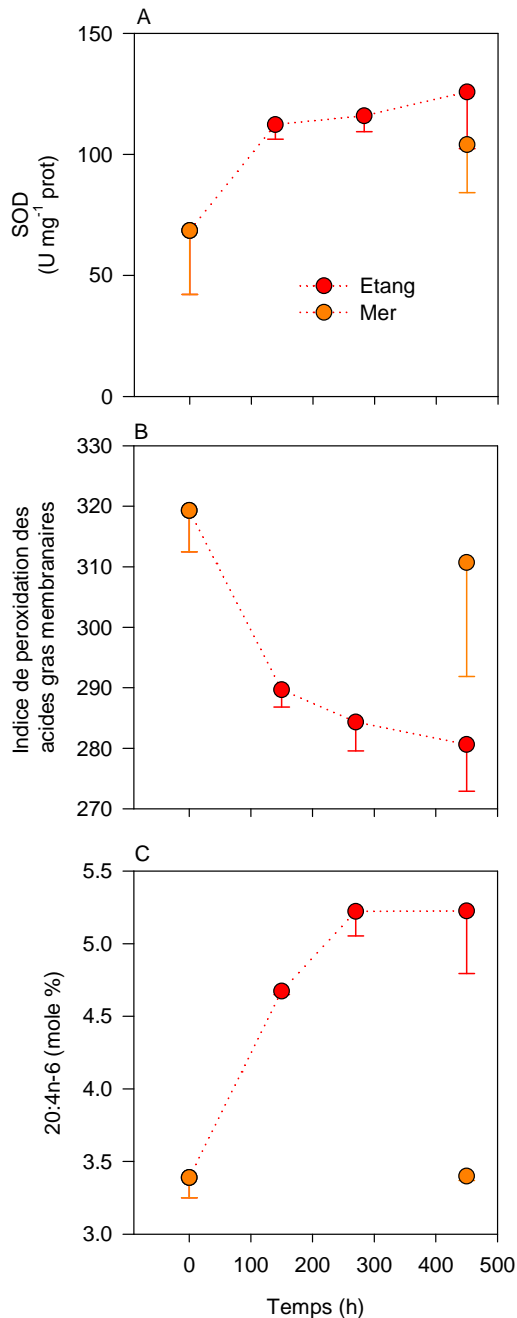


Figure 30. Activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), indice de peroxydation des acides gras membranaires et acide arachidonique (20:4n-6) dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées dans l'étang de Thau (rouge) ou maintenues en mer (orange).

L'activité SOD initiale des naissains d'huîtres triploïdes provenant de l'écloserie B maintenus en mer ouverte est de seulement 69 U mg⁻¹ protéine (Fig. 30A), ce qui est faible comparativement aux valeurs enregistrées le 27 avril sur le naissain déployé dans l'étang de Thau (Table 4). En revanche, six jours seulement après le transfert dans l'étang de Thau, l'activité SOD des huîtres initialement maintenues en mer augmente d'un facteur 2×. Par conséquent, il y a eu une augmentation de l'activité SOD suite au transfert des huîtres de la mer vers l'étang témoignant d'une recrudescence du métabolisme oxydatif qui coïncide avec une infection par le virus herpes OsHV-I. En revanche, l'activité SOD des huîtres contrôles

maintenues en mer pendant toute l'expérience semble également avoir augmenté (Fig. 30A). Bien que moindre et variable, l'augmentation de l'activité SOD dans les huîtres contrôles suggère que l'accroissement du métabolisme oxydatif n'est pas uniquement lié à l'infection et à la mortalité qui touche les huîtres transférées dans l'étang de Thau. En fait, l'augmentation du métabolisme énergétique aérobie (activité CS, Fig. 28B) pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'activité SOD.

L'indice de peroxydation des acides gras des lipides polaires des huîtres maintenues en mer avant le transfert est de 319, valeur similaire à celle observée le 27 avril dans le naissain déployé dans l'étang de Thau (Table 4). En revanche, six jours seulement après le transfert dans l'étang de Thau, l'indice de peroxydation lipidique des huîtres initialement maintenues en mer diminue de 9.4% pour atteindre 281 à la fin de l'expérience le 18 juin (Fig. 30B). Cette valeur semble inférieure à celle enregistrée sur les huîtres diploïdes maintenues sur l'étang de Thau pour lesquelles l'indice est de 299 le 23 juin (Fig. 24). Par conséquent, il y a eu une diminution marquée de l'indice de peroxydation des lipides suite au transfert des huîtres de la mer vers l'étang qui coïncide avec une infection par le virus herpès OsHV-I et la recrudescence du métabolisme oxydatif. Au contraire de l'activité SOD, l'indice de peroxydation lipidique des huîtres contrôles maintenues en mer pendant toute la durée de l'expérience demeure stable. Ce changement d'indice peut aussi s'expliquer par le changement de température entre mer et étang.

Enfin, le niveau d'acide arachidonique (20:4n-6), un acide gras généralement associé aux fonctions immunitaires et inflammatoires, augmente de 3.4% jusqu'à 5.2% dans les 12 premiers jours suite au transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau (Fig. 30C). Par conséquent, l'infection par le virus herpès et la mortalité des huîtres coïncide avec une augmentation en 20:4n-6 dans les lipides polaires tel qu'observé précédemment. Toutefois, à l'inverse des observations faites en 2008 et 2009 (voir section 4.2.6), la mortalité démarre bien après l'atteinte du seuil de 3% qui était déjà franchi au point initial. Cela s'explique par le fait que cette mortalité est tardive et que le cycle d'accumulation et d'utilisation de 20:4n-6 (Fig. 25), qui semble être associé à la reproduction, était trop avancé au moment de l'expérience.

4.3.6. Effet du transfert mer - étang en automne

L'expérience de transfert des huîtres de la mer ouverte vers l'étang de Thau a été renouvelée le 19 octobre 2009, de manière identique, afin d'examiner le caractère saisonnier des mortalités.

Le 19 octobre, les huîtres maintenues en mer mesuraient en moyenne 52.3 mm contre seulement 30.8 mm lors du premier transfert le 29 mai. En date du 21 décembre, ces huîtres n'ont subi aucune mortalité. En revanche, la pousse est faible (ce qui est normal en cette saison) et les premiers résultats indiquent que

concentrations en sucre sont faibles. Les échantillons prélevés au cours de cette expérience récente sont en cours d'analyse.

Cette expérience illustre le caractère saisonnier des mortalités et montre qu'il est possible de maintenir du naissain indemne de mortalité et de le transférer en étang en période automnale lorsque la température de l'eau descend sous 17°C. La question est dorénavant de savoir si ce naissain, qui n'a pas subi les mortalités en 2009 mais qui est sensible va résister au printemps 2010 dans l'étang de Thau.

4.3.7. Conclusion

Le transfert d'huîtres triploïdes saines maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau a conduit à une infection massive par le virus herpès, visible dès le 1^{er} prélèvement après seulement 6 jours. Les charges virales sont maintenues à des niveaux élevés jusqu'à la fin de l'expérience après 18 jours, où la mortalité moyenne constatée des huîtres est de 84%.

Le transfert des huîtres de la mer vers l'étang de Thau engendre par ailleurs une accumulation et une utilisation rapide et marquée des sucres qui peut être un effet secondaire de l'infection par le virus herpès, un effet de l'augmentation de la température du milieu lors du transfert ou un effet du changement de la qualité nutritionnelle du milieu qui a nettement marqué la signature lipidique des huîtres.

Enfin, le transfert des huîtres de la mer vers l'étang conduit à une recrudescence du métabolisme oxydatif (activité SOD et indice de peroxydation des acides gras) et une augmentation marquée en acides gras d'origine bactérienne dans les réserves et 20:4n-6 dans les lipides membranaires.

D'un point de vue appliqué, l'expérience de transfert des huîtres de la mer ouverte vers l'étang de Thau montre qu'il est possible de maintenir du naissain indemne de mortalité et de le transférer en étang en période automnale lorsque la température de l'eau descend sous 17°C en profitant du caractère saisonnier des mortalités.



5. Conclusions générales et perspectives

5.1. Les mortalités 2009 sur Thau: un phénomène différent du modèle connu

Le programme de recherche Morest (Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 2001-2006) a décrit un modèle général d'interactions entre l'huître creuse, des organismes infectieux et leur dépendance à des facteurs environnementaux sur les côtes de la Manche et de l'Atlantique. Les mortalités de naissains d'huître creuse constatés en 2009 dans l'étang de Thau diverge du modèle de mortalité estivale établi dans le cadre du défi Morest.

Le seuil thermique de déclenchement des mortalités évalué à 19-20°C dans le cadre de Morest est abaissé de ~2°C. Il avait été démontré que la variation des paramètres température et précipitations pouvait expliquer, dans certains secteurs conchylicoles, les variations interannuelles du taux de mortalités (Samain & McCombie 2008). Or, ces paramètres ont été très contrastés sur l'étang de Thau entre 2008 et 2009 (voir mêmes opposés), et les mortalités ont été de la même ampleur. Par conséquent, ces paramètres environnementaux ne semblent pas expliquer les mortalités récentes.

Contrairement à ce qui était observé dans le cadre de Morest, le démarrage des mortalités de naissain ne semble pas lié à l'investissement reproducteur : les huîtres triploïdes réputées « stériles » sont touchées au même titre que les animaux diploïdes, qui étaient par ailleurs immatures.

Enfin, du point de vue de l'environnement trophique, les mortalités se produisent alors que la biomasse phytoplanctonique est remarquablement constante et faible, favorisant ainsi un déficit énergétique. Bien que les mortalités estivales pouvaient occasionnellement coïncider avec une absence inhabituelle de phytoplancton pendant la période de reproduction des huîtres (Maurer et al. 1986, Soletchnik et al. 2006), il était généralement accepté que les mortalités étaient plus souvent associées à des apports excessifs en sels nutritifs du bassin versant favorisant ainsi la production primaire et l'investissement reproducteur au dépend du système de défense de l'huître (Samain & McCombie 2008).

Enfin, les mortalités estivales étaient souvent, mais pas systématiquement, associées à la présence d'agents infectieux, dont le virus herpes OsHV-1. En 2008 et 2009, l'apparition des mortalités dans l'étang de Thau, et plus généralement en France, coïncide systématiquement avec des charges élevées en virus herpes OsHV-1 dans le naissain d'huître, suggérant que ce dernier est impliqué dans le phénomène de mortalité et que son effet sur le processus de morbidité s'est accru. Ce constat de surmortalités associées à OsHV-1 doit prendre en compte l'émergence d'un génotype variant de l'herpès virus (μ Var), nouvellement décrit en France en 2008 et 2009 et dont la virulence a pu être démontrée expérimentalement.

5.2. Retombées du projet

D'un point de vue plus appliqué, nous avons constaté que le risque de mortalité en 2009 est d'autant plus élevé que les animaux sont petits, coïncidant notamment avec des différences marquées en énergie de réserve entre naissains et adultes. Nos résultats suggèrent qu'une pratique culturale pour limiter la mortalité consisterait à éviter de déployer des animaux de taille < 30 mm fin mars, c'est à dire éviter les opérations de pré grossissement au printemps en faveur du pré grossissement automnal.

D'autre part, nous avons constaté que les naissains sont touchés de la même façon par les surmortalités quelles que soient leur origine (naturel vs. éclosion) et leur ploïdie ($2n$ vs $3n$). Par conséquent, il n'est pas possible, à l'heure actuelle, sur la base des données acquises dans le cadre de ce projet, de favoriser une voie d'approvisionnement en naissain plus qu'une autre pour limiter le risque de mortalité.

Nous avons constaté que les naissains déployés en mer ouverte à 22m de profondeur n'ont pas souffert de surmortalité. Malgré l'absence de données scientifiques antérieures à 2009 sur ce site, il semble que cela ait été également le cas en 2007 et 2008, de sorte que l'ostréiculture en mer profonde peut être une voie intéressante, au moins pour sécuriser le pré grossissement.

Cependant, le transfert d'huîtres triploïdes « saines » maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau début juin conduit à une infection massive par le virus herpès après seulement 6 jours, et une mortalité quasi totale du lot après 18 jours. En revanche, le transfert d'huîtres appartenant au même lot en période automnale lorsque la température de l'eau descend sous 17°C est un succès. Aussi, le potentiel du pré grossissement en mer doit être étudiée de façon plus approfondie afin de vérifier notamment si le naissain protégé du risque de mortalité par isolement et/ou conditions non favorables à l'expression des agents pathogènes (seuil thermique et présence d'herpès virus) en période à risque est résistant quelques mois ou une année plus tard dans un milieu plus agressif en période à risque.

A ce sujet, une étude récente montre que les huîtres sensibles déployées à Rivière d'Auray en Bretagne sud, maintenues exemptes de mortalité la première année, présentent des mortalités largement inférieures le second été comparativement au premier été, au point que le différentiel de survie observé entre les huîtres résistantes (R) et sensibles (S) aux mortalités estivales la première année est estompé la seconde année (Dégremont et al. 2010). Cette observation suggère qu'il existe une capacité de réponse aux infections (défenses immunitaires) fortement associée à l'âge des animaux, avec une différence marquée quand les huîtres dépassent leur première année (Pépin, com. pers.). Toutefois, ces conclusions ne sont pas aussi claires en Baie des Veys où la différence de survie entre les huîtres R et S, protégées du risque de mortalité en première année, est maintenue en seconde année (Dégremont et al. 2010). Par conséquent, l'intérêt de la sécurisation des naissains en période à risque doit être évaluée en terme



biologique et économique sur chaque site et pour des évènements de mortalité caractéristiques de 2009, sensiblement différents du modèle connu établi dans le cadre de Morest. Si le naissain protégé du risque de mortalité en première année meurent en quantité importante la seconde année, cette pratique peut finalement n'être pas rentable compte tenu des coûts de maintenance du naissain pendant une année complète.

5.3. Ailleurs en France

Les premières surmortalités ont été déclarées fin avril en Corse et en Méditerranée. Le phénomène a évolué de site en site, du sud de la France vers le Nord (début mai à Arcachon, mi-mai en Charente Maritime, juillet et août pour la Bretagne Nord et la Normandie). Le seuil thermique d'apparition des mortalités observé en 2009 est de 16-17°C pour l'ensemble des sites de production (voir le site de l'Observatoire Conchylicole National qui réunit les huit Laboratoires Environnement Ressource de l'Ifremer pour acquérir des données d'observation de la mortalité sur du naissain issu de captage naturel et d'écloserie http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole). Les mortalités ont été massives et foudroyantes. En quelques jours, les mortalités ont pu toucher plus de 80 % des individus d'un lot.

En ce qui concerne les deux façades Manche et Atlantique, les lots situés dans des parcs plus haut semblent être moins touchés. Par ailleurs, selon les professionnels, les pièces d'eau endiguées (marais, claires...) ont été la plupart du temps épargnées sauf si elles ont été mises en contact avec des masses d'eau extérieures hébergeant sur l'estran des animaux moribonds ou morts favorisant l'hypothèse de contamination ou d'un phénomène contagieux vectorisé par les flux d'eau de mer.

Le virus OsHV-1 a été détecté sur tous les sites d'élevage d'huîtres en France et dans la quasi-totalité des prélèvements (57 sur 6155 lots, 93% positif) effectués dans le cadre du Réseau national Pathologie Mollusques (REPAMO). La bactérie *Vibrio splendidus* a été détectée dans la moitié des échantillons (25/53) et la bactérie *Vibrio aestuarianus* dans 10 % des échantillons. Ce virus et ces bactéries caractérisés depuis de nombreuses années (1992 pour le virus) sont connus pour être associés à des phénomènes de mortalité dans le milieu. De plus, leur capacité à induire des mortalités d'huîtres a été montrée en conditions expérimentales.

Les bactéries *Vibrio tapetis* et *Vibrio harveyi* n'ont été détectées que dans un petit nombre d'échantillons, la bactérie *Vibrio tubiashii*, qui aux USA est associée à des mortalités de jeunes huîtres, n'a pas été détectée. Aucun nouvel organisme infectieux n'a été détecté. Un génotype particulier du virus OsHV-1 (dénommé OsHV-1 μ Var) a été retrouvé en 2009 dans la totalité des échantillons ayant fait l'objet d'une analyse complémentaire par séquençage. Ce même génotype avait été détecté dans 47 % des échantillons en 2008.

En 2008, les travaux réalisés en laboratoire par l'Ifremer ont permis de démontrer la capacité d'individus infectés par le virus OsHV-1 et/ou des bactéries

appartenant au genre *Vibrio* à transmettre ces agents infectieux à des individus sains placés à proximité. En 2009, le caractère infectieux et contagieux du phénomène s'est aussi affirmé au travers des observations de terrain. La propagation des organismes infectieux doit être facilitée à la fois naturellement par les courants, et par l'impact des pratiques culturelles des professionnels (transferts d'huîtres intra et inter bassins).

La présence du virus OsHV-1 dans la quasi totalité des lots ainsi que la détection de la bactérie *V. splendidus* dans environ 50 % des lots présentant des taux anormaux de mortalité portent à croire que ces deux agents infectieux seuls ou en synergie jouent un rôle prépondérant dans les épisodes de mortalités de 2009. Cependant, les éléments de connaissance disponibles aujourd'hui mettent en évidence que le parcours zootechnique, le statut physiologique, immunologique et génétique de l'animal sont des variables importantes à prendre en compte dans le déclenchement des mortalités.

Enfin, la 6^e génération d'huîtres sélectionnées résistantes (R) et sensibles (S) aux mortalités estivales présente toujours des différentiels de survie importants en 2009, largement en faveur des huîtres R. Les huîtres R présentent des taux de mortalité variant entre 19%-60% en fonction de l'âge lors de la mise sur estran, contre 60%-84% pour les témoins et 88%-97% pour les huîtres S.

5.4. Perspectives

5.4.1. Analyses des mortalités 2009

Les résultats présentés dans le cadre de ce rapport ne sauraient être exhaustifs puisque certaines données sont en cours d'acquisition. Parmi les résultats en attente ou présentés de façon incomplète :

- certaines variables environnementales ainsi que les analyses pigmentaires et en cytométrie en flux de la matière organique particulaire
- la dynamique des contaminants chimiques et métaux,
- l'évolution des réserves énergétiques des huîtres stockées sous forme de triglycérides,
- la modélisation DEB avec différents forçages trophiques et éventuellement, sur d'autres secteurs conchylicoles,
- l'expression des gènes associés à l'immunité, l'énergétique et à la reproduction.

Notre travail concernant l'expression de gène vise à identifier des déterminants moléculaires de la survie chez l'huître *C. gigas*.

Ce travail fait suite aux résultats de comparaison génomique des lignées d'huîtres sélectionnées résistantes (R) et sensibles (S) à la mortalité estivale (Fleury et al. sous presse). Une dizaine de gènes sont apparus différemment exprimés dans la

gonade de l'huître au cours de la période précédant les mortalités. Ces gènes sont généralement associés à la reproduction et au métabolisme oxydatif, soulignant le coût de la reproduction et l'importance de la défense anti-oxydante dans l'apparition d'une déficience immunitaire avant les mortalités. De plus la date précédant l'apparition des mortalités permet d'observer un profil transcriptomique atypique : 60% des gènes (33) différemment exprimés entre R et S possèdent une annotation reliée à l'immunité. Ce résultat suggère une défaillance des défenses immunitaires des huîtres S par rapport aux huîtres R. Nous disposons donc de marqueurs précoces de la mortalité estivale chez l'huître creuse. Ces marqueurs vont être testés sur les échantillons prélevés en 2009 en Méditerranée.

Ce travail, qui repose sur des financements extérieurs à ce projet, devrait permettre de répondre à la question suivante : les marqueurs moléculaires identifiés peuvent-ils être utilisés en tant que « profil diagnostique prédictif » afin de caractériser et détecter la capacité de résistance potentielle de lots d'huîtres ?

L'équipe Réponse Immunitaire Aquaculture Environnement de Montpellier a caractérisé différents effecteurs antimicrobiens dont l'expression est révélatrice de la présence d'une infection bactérienne chez les huîtres. Plus récemment, des banques SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ont été construites à partir des hémocytes, cellules immunocompétentes, afin d'établir une base de données quantitative et qualitative des gènes impliqués dans la fonction immunitaire des huîtres et d'identifier des gènes dont le profil d'expression avant et/ou en cours d'une infection permet de discriminer les huîtres capables et incapables de survivre à des *Vibrio* pathogènes (Cg-Physiogene, ANR-06-GANI-009, 2007). Ainsi, nous disposons d'une combinaison de gènes dont l'expression est marqueur d'une part de la présence d'une infection, et d'autre part des capacités des huîtres à survivre ou non à cette infection.

L'expression de cette combinaison de gènes a été analysée dans le cadre de l'expérience de transfert d'huîtres de la mer ouverte vers l'étang de Thau, où les huîtres ont subi une mortalité massive (voir section 4.3). Les analyses d'expression montrent une induction d'une série de gènes immunitaires (groupe 1) révélatrice de la présence d'une infection ou d'une stimulation des huîtres uniquement dans l'étang (Fig. 31). En revanche, les gènes marqueurs des capacités de survie des huîtres sont soit réprimés (groupe 2) soit non modulés (groupe 3) dans l'étang, ce qui coïncide avec la mortalité des huîtres suite au transfert dans l'étang. Ainsi, le transfert d'huître dans l'étang provoque une stimulation d'une partie du système immunitaire des huîtres, alors que des gènes impliqués dans les capacités de survie ne semblent pas répondre efficacement chez ces animaux qui vont mourir dans l'étang.

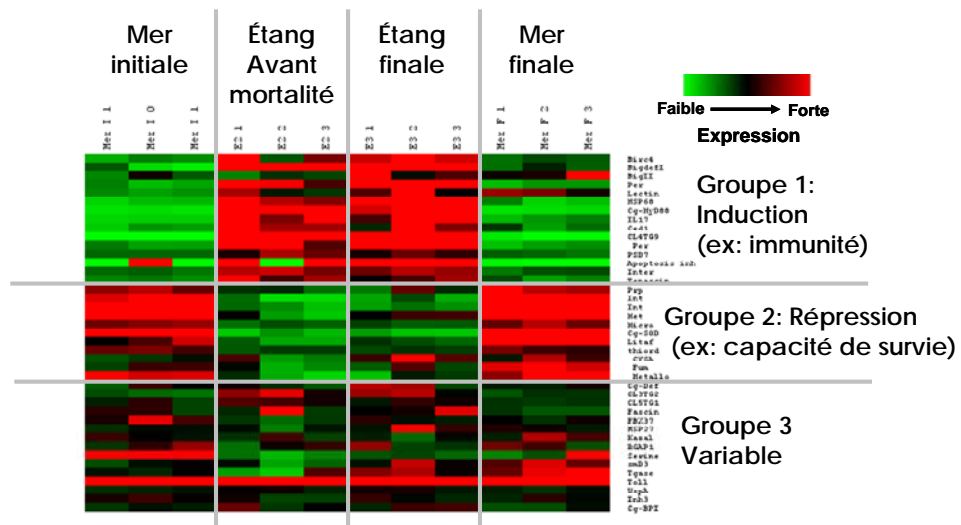


Figure 31. Expression des ARNm de gènes hémocytaires par PCR quantitative dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées dans l'étang de Thau (en relation avec la mortalité) ou maintenues en mer au début et à la fin de l'expérience. Chaque ligne représente un gène et chaque colonne représente une condition expérimentale (en triplicata). A l'intersection entre lignes et colonnes, les cases de couleur représentent les taux d'expression des gènes selon le code couleur à droite de la figure.

5.4.2. Expérience 2010

Compte tenu du différentiel de survie observé en 2009 entre les huîtres R et S et du contexte national selon lequel des huîtres R vont être produites etensemencés à grande échelle en 2010, il nous apparaît crucial de suivre rigoureusement la performance relative des huîtres R, Témoin et S dans l'étang de Thau. Ces lignées R et S d'huîtres creuses sélectionnées n'ont jamais fait l'objet d'une telle étude dans les lagunes méditerranéennes.

Aussi, nous proposons de réaliser dès mars 2010 une première expérience visant à comparer la survie et la croissance des huîtres R et S en relation avec l'énergétique, la reproduction, les agents infectieux et les paramètres environnementaux. En parallèle, nous suivrons des lignées d'huîtres sélectionnées en fonction de leur effort reproducteur en interaction avec le caractère R et S, soit des lignées dites RER+, RER-, SER+ et SER- (ER=effort reproducteur). Enfin des huîtres témoins 2n et 3n (T2n et T3n) seront également suivies. Ces animaux ont été produit au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade de l'Ifremer en 2009 et sont actuellement maintenus en nurserie à Bouin pour être déployés sur Thau courant mars (taille t6) et suivis selon le protocole adopté en 2009.

Par ailleurs, les huîtres R, S, T2n et T3n seront déployées en mer profonde afin de vérifier que ce site de production demeure exempt de mortalité en 2010, même pour des animaux très sensibles tels que les huîtres S.

Enfin, nous continuerons de suivre les huîtres 3n provenant de l'écloserie B maintenues en mer depuis mars 2009 et transférées en étang en automne, dorénavant âgées d'un an, afin de vérifier leur sensibilité à la mortalité en 2010. Ces animaux seront périodiquement transférés en étang afin d'évaluer leur sensibilité au milieu. L'objectif est de comparer la mortalité du naissain (âge 0+), et des adultes (1+) maintenus indemnes de mortalité en mer ouverte depuis 2009, en relation avec la pathologie. Notre hypothèse est que la mortalité varie en fonction de l'âge des huîtres, de sorte que l'exposition à la mortalité en début d'année 1 n'est pas « nécessaire » pour être plus résistant en fin d'année 1 ou en début d'année 2. Cette expérience permettra entre autre d'évaluer l'intérêt de la sécurisation du naissain en période à risque.



6. Bibliographie

- 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
- Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, Renault T, Lapegue S (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch Environ Contam Toxicol* 52:58-63
- Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas-Guyon H, Renault T, Miramand P, Lapegue S (2006) Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicol* 78:149-156
- Bouilly K, Leitao A, McCombie H, Lapegue S (2003) Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:219-223
- Bourlès Y, Alunno-Bruscia M, Pouvreau S, Tollu G, Leguay D, Arnaud C, Gouilletquer P, Kooijman SALM (2009) Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *J Sea Res* 62:62-71
- Budge SM, Parrish CC (1998) Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. II. Fatty acids. *Organic Geochem* 29:1547-1559
- Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19:353-359
- Dalsgaard J, St. John M, Kattner G, Muller-Navarra D, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol* 46:225-340
- Dégremont L, Boudry P, Ropert M, Samain J-F, Bédier E, Soletchnik P (2010) Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 299:44-50
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254:571-582
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain J-F (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
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Enriquez-Diaz M, Pouvreau S, Chavez-Villalba J, Le Penec M (2009) Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture Int* 17:491-506
- Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Gueguen Y, Bachere E, Tanguy A, Moraga D, Fabioux C, Lindeque P, Shaw J, Reinhardt R, Prunet P, Davey G, Lapegue S, Sauvage C, Corporeau C, Moal J, Gavory F, Wincker P, Moreews F, Klopp C, Mathieu M, Boudry P, Favrel P (2009) Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *Bmc Genomics* 10
- Fleury E, Moal J, Boulo V, Daniel J-Y, Mazurais D, Hénaut A, Corporeau C, Boudry P, Favrel P, Huvet A (sous presse) Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Marine Biotechnol*

- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509
- Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, Burge CA, Hargrove JS, Barber BJ, Elston RA, Bureson EM, Reece KS (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Org* 63:33-41
- Fry B (2007) *Stable Isotope Ecology*, Vol. Springer Science, New York
- Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T (2006) Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254:606-616
- Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Felbeck H (2002) Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp Biochem Physiol* 133:63-77
- Gonzalez J-L, Budzinski H, Tapie N, Munaron D (2009) Projet PEPS Méditerranée (pré étude: échantillonnage passif pour la surveillance de la contamination chimique). Report No. RST/DOP/DOP-DCN-BE/09-08, Ifremer
- Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus A, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR (1999) Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science* 285:1505-1510
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD (2002) Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296:2158-2162
- Hayes ML, Bonaventura J, Mitchell TP, Prospero JM, Shinn EA, Van Dolah F, Barber RT (2001) How are climate and marine biological outbreaks functionally linked? *Hydrobiologia* 460:213-220
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19-42
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol* 199:257-274
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA (2007) Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev* 87:1175-1213
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (1997) *Phytoplankton pigments in oceanography*, Vol. Unesco Publishing
- Kemp WM, Boynton WR, Adolf JE, Boesch DF, Boicourt WC, Brush G, Cornwell JC, Fisher TR, Glibert PM, Hagy JD, Harding LW, Houde ED, Kimmel DG, Miller WD, Newell RIE, Roman MR, Smith EM, Stevenson JC (2005) Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. *Mar Ecol Prog Ser* 303:1-29
- Kooijman SALM (2000) *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*, Vol. Cambridge Univ. Press, Cambridge (2000)
- Lafferty KD, Porter JW, Ford SE (2004) Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:31-54
- Lambert C, Soudant P, Jegaden M, Delaporte M, Labreuche Y, Moal J, Samain JF (2007) In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* 270:413-421
- Langdon CJ, Waldock MJ (1981) The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J Mar Biol Assoc UK* 61:431-448
- Lango-Reynoso F, Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190:1-2

- Leal JCM, Dubois S, Orvain F, Galois R, Blin JL, Ropert M, Bataille MP, Ourry A, Lefebvre S (2008) Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Mar Biol* 153:673-688
- Li Y, Qin JG, Li X, Benkendorff K (2009) Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286:64-71
- Malet N, Sauriau PG, Faury N, Soletchnik P, Guillou G (2007) Effect of seasonal variation in trophic conditions and the gametogenic cycle on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ levels of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Mar Ecol Prog Ser* 346:203-217
- Malet N, Sauriau PG, Ryckaert M, Malestroit P, Guiljou G (2008) Dynamics and sources of suspended particulate organic matter in the Marennes-Oleron oyster farming bay: Insights from stable isotopes and microalgae ecology. *Estuar Coast Shelf Sci* 78:576-586
- Malham SK, Cotter E, O'Keefe S, Lynch S, Culloty SC, King JW, Latchford JW, Beaumont AR (2009) Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture* 287:128-138
- 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 Biol Ecol* 163:221-234
- Maurer D, Comps M, His E (1986) Caractéristiques des mortalités printanières de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. *Haliotis* 15:309-317
- Metcalf LD, Schmitz AA (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 33:363-364
- Moran AL, Manahan DT (2004) Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 306:17-36
- Mori K (1979) Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 53:361-369
- Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD (2006) Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:251-288
- Normand J, Le Pennec M, Boudry P (2008) Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282:124-129
- Osada M, Nishikawa M, Nomura T (1989) Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol* 94:595-601
- Parrish CC (1999) Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, p 5-20
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269-276
- Perdue JA, Beattie JH, Chew KK (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J Shellfish Res* 1:9-16
- Pernet F, Barret J, Marty C, Moal J, Le Gall P, Boudry P (2010) Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Mar Ecol Prog Ser* 401:129-146
- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitat: energetic and remodeling of membrane lipids. *J Exp Biol* 210:2999-3014
- Pernet F, Tremblay R, Gionet C, Landry T (2006) Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *J Exp Biol* 209:4663-4675

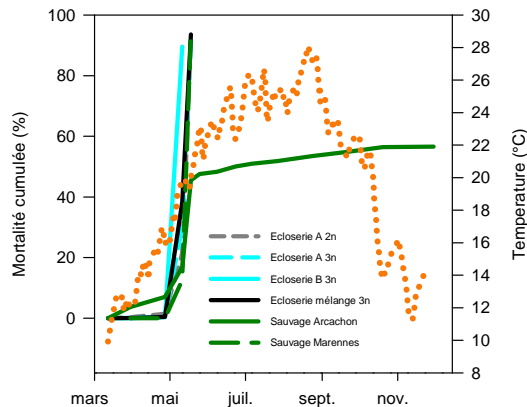


- Pernet F, Tremblay R, Redjah I, Seigny J-M, Gionet C (2008) Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J Exp Biol* 211:969-977
- Pouvreau S, Bourles Y, Lefebvre S, Gangnery A, Alunno-Bruscia M (2006) Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J Sea Res* 56:156-167
- Royer J, Seguineau C, Park KI, Pouvreau S, Choi KS, Costil K (2008) Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277:313-320
- Samain J-F, McCombie H (2008) Summer Mortality of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*, The Moresst Project Vol
- Samain JF, Degremont L, Soletchnik P, Haure J, Bedier E, Ropert M, Moal J, Huvet A, Bacca H, Van Wormhoudt A, Delaporte M, Costil K, Pouvreau S, Lambert C, Boulo V, Soudant P, Nicolas JL, Le Roux F, Renault T, Gagnaire B, Geret F, Boutet I, Burgeot T, Boudry P (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268:227-243
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Meth* 77:191-197
- Smith WL, Murphy RC (2003) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Vol 36. Elsevier Science, Amsterdam, p 341-371
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328-338
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J Shellfish Res* 24:197-207
- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P (1997) Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Res* 10:177-185
- Soletchnik P, Ropert M, Mazurie J, Fleury PG, Le Coz F (2007) Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271:384-400
- Stanley D, Hoback W, Bedick J, Tunaz H, Rana R, Aliza A, Miller J (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in larvae of the butterfly, *Colias eurytheme*. *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 123:217-223
- Viso A-C, Marty J-C (1993) Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34:1521-1533
- Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI, Garland CD (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 128:219-240
- Watermann BT, Herlyn M, Daehne B, Bergmann S, Meemken M, Kolodzey H (2008) Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J Fish Dis* 31:621-630

Annexe 1. Bulletins mortalité

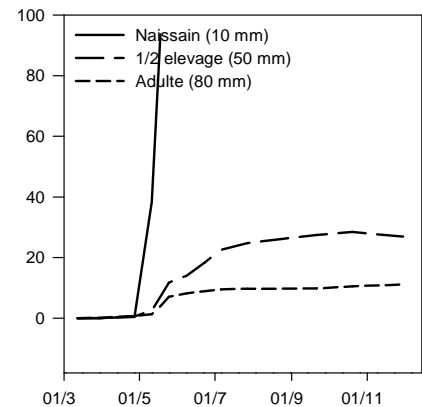
Bulletin mortalité n°10 émis le 23 octobre 2009

Dernier bulletin régulier 2009. Néanmoins, les campagnes de suivi se poursuivront une fois par mois jusqu'en décembre et un bulletin sera émis si une hausse de mortalité est observée sur un lot



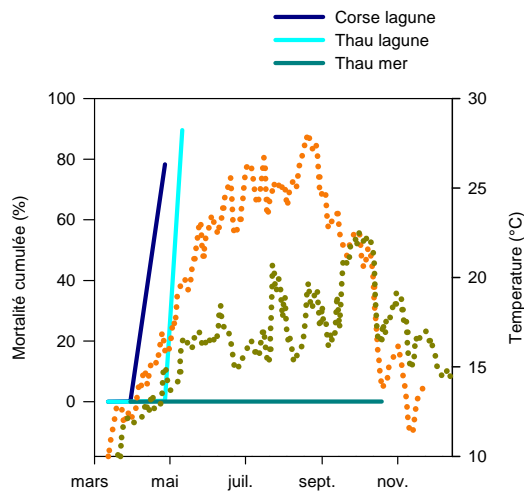
Mortalité cumulée en fonction de l'origine du naissain d'huîtres. Ces huîtres sont produites en 2008 et transférées sur l'étang de Thau en mars 2009. Le "mélange 3n" consiste en naissain provenant de 4 écloséries.

Commentaire: la mortalité sur le naissain est stabilisée.



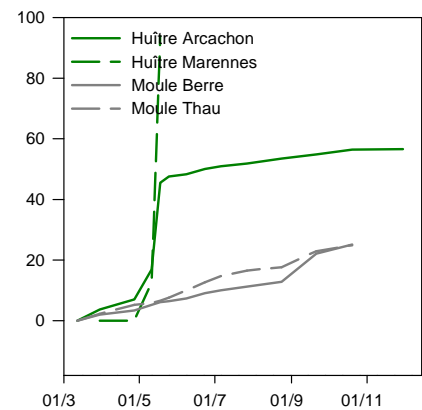
Mortalité cumulée en fonction de la classe d'âge. Les lots sont un mélange d'individus triploïdes provenant de 4-5 écloséries. Les dimensions dans la légende indiquent la longueur initiale de coquille de chaque classe considérée en date du 12 mars.

Commentaire: alors que la mortalité sur le naissain est stabilisée, le 1/2 élevage et l'élevage ne sont pas touchés.



Mortalité cumulée en fonction du site de culture. Les lots testés sont constitués de naissain triploïde provenant de l'éclosérie B produit en 2008 et transféré sur l'étang de Thau en mars 2009.

Commentaire: Pas de mortalité constatée sur le naissain placé en mer à 20m de fond depuis la dernière mise à jour le 19 octobre.



Mortalité cumulée en fonction de l'espèce cultivée. Les moules ont été captées dans les lagunes méditerranéennes alors que les huîtres ont été captées en Atlantique à Arcachon et à Marennes en 2008.

Commentaire: Malgré une légère mortalité récente de moule probablement due à la manutention des lots (bris de byssus en période de gamétogenèse), en date du 19 octobre, la mortalité touche uniquement les huîtres.

