

Département Océanographie, Dynamique des Ecosystèmes
UL- Laboratoire Environnement - Ressource du Languedoc Roussillon
Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Ifremer, Plouzané.
Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade

Fabrice Pernet
Jean Barret
Patrik Le Gall
Franck Lagarde
Annie Fiandrino
Arnaud Huvet

Charlotte Corporeau
Pierre Boudry
Claudie Quéré
Lionel Dégremont
Jean-François Pépin
Denis Saulnier

Hélène Boulet
Nicolas Keck

Juillet 2011 – RST/LER/LR 11-013

Mortalités massives de l’Huître creuse: causes et perspectives

Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau



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

Mortalités massives de l’Huître creuse: causes et perspectives

Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique :		date de publication : juil.-11 nombre de pages : 77 bibliographie : oui illustration(s) : 24 figures langue du rapport : française
Titre de l'article : Mortalités massives de l'Huître creuse: causes et perspectives		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal (aux) : Pernet F.	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Océanographie Dynamique des Ecosystèmes / Unité Littorale / Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon	
Contributeur(s) : Barret J, Le Gall P, Lagarde F, Fiandrino A. Huvet A, Corporeau C, Boudry P, Quéré C. Dégremont L, Pépin JF, Saulnier D. Boulet H, Keck N.	Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon, Ifremer, Sète. Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Ifremer, Plouzané. Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade. Laboratoire Départemental Vétérinaire, Conseil Général de l'Hérault, 306 Rue Croix de Las Cazes, Montpellier.	
Cadre de la recherche : Action ADECOM		
Destinataires : CRC Méditerranée, Ifremer, Affaires Maritimes, Région LR, Département 34, Cevalmar		

Résumé

Cette étude a pour objectifs d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau et d'examiner plus particulièrement l'effet des conditions d'élevage. Les mortalités d'huîtres en 2009 et 2010 coïncident toujours avec des infections simples ou multiples par le virus Herpes OsHV-I et ou la bactérie *Vibrio splendidus*, lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. Dans l'étang de Thau, les mortalités démarrent avril mai et s'arrêtent en automne, avec une période d'interruption lorsque la température de l'eau est supérieure à 24°C, en juillet août. Les mortalités d'huîtres varient principalement en fonction du parcours zootechnique, de l'hydrodynamique et des pratiques culturales. La mortalité est fonction de l'exposition ou non dans le passé à des événements de mortalité. Les huîtres maintenues indemnes de mortalité transférées dans un milieu infecté meurent massivement quels que soient l'âge ou la taille des individus, alors que les huîtres survivantes à un événement de mortalité sont résistantes. Aussi, il semble intéressant d'exposer les huîtres aux mortalités dès leur plus jeune âge afin de sélectionner les individus résistants à moindre coût. La mortalité et l'infection par le virus Herpes se propagent dans l'étang de Thau en fonction de l'hydrodynamique. Le virus Herpes parcourrait des distances plus ou moins grandes en fonction de la vitesse des courants tout en conservant sa virulence en dehors de son hôte. Enfin, les mortalités varient en fonction des pratiques culturales qui influencent l'infection par *V. splendidus* dans les huîtres et leur condition physiologique. Compte tenu que les mortalités d'huîtres présentent un caractère infectieux et qu'elles varient en fonction du parcours zootechnique et de l'hydrodynamique, il faut systématiquement connaître les caractéristiques des lots et du site d'accueil. Il apparaît indispensable de mettre en place un dispositif de traçabilité et de certification sanitaire des huîtres. Au delà de ces trois facteurs, les naissains sont touchés de la même façon par les mortalités quelles que soient leur origine et leur ploïdie, de sorte qu'il n'est pas possible de favoriser une voie d'approvisionnement en naissain plus qu'une autre pour limiter le risque de mortalité dans l'étang de Thau. L'élevage d'huître sans mortalité est possible en mer Méditerranée sur site profond, à condition de pouvoir y réaliser un cycle d'élevage complet et de ne pas propager l'infection dans ce milieu sain.

Abstract

The objectives of this study are to increase our understanding of the mass mortality phenomena in Pacific oysters *Crassostrea gigas* in the Thau lagoon and to examine the effect of cultivation practises. Mortality events in 2009 and 2010 always coincide with simple or dual infections involving primarily the Herpes virus OsHV-I and secondarily the bacteria *Vibrio splendidus*, when seawater temperature is between 17°C and 24°C. In the Thau lagoon, mortality starts early May and last until fall with an interruption period when seawater temperature is higher than 24°C in July and August. Mortality of oysters varies as a function of zootechnical life-history, hydrodynamics and cultivation practises. First, mortality depends on whether or not oysters have been exposed to a mortality event in the past. Mortality-free oysters transferred into an infected area die massively irrespective of their size and age, whereas oysters which survive to a mass mortality event in the past are resistant thereafter. Therefore, it seems interesting to expose the oysters to the mortality as soon as possible to select resistant individuals at low cost. Second, mortality and Herpes virus infection spread within the lagoon by means of currents. It is likely that the Herpes virus move over long distances as a function of hydrodynamics and remained infectious outside of its host. Third, mortality varies a function of cultivation practises, which influence the infection by *V. splendidus* and the physiological conditions of oysters. Given that oyster mortality reflects the effect of infectious disease and varies with zootechnical life-history and hydrodynamics, one needs to know precisely oyster's life history and characteristics of the farming area. It is pressing to display a traceability setup and a certification test for oysters. Young oysters suffered heavy losses irrespective of their origins and ploidy so that it is not possible to act on these factors to reduce the mortality in the Thau lagoon. Rearing of oysters free of mortality is possible in deep open-sea.

Mots-clés

Huître creuse, Mortalité, Virus Herpes OsHV-I, *Vibrio splendidus*, Zootechnie, Hydrodynamique, Environnement.

Words keys

Pacific oyster, Mortality, Herpes virus OsHV-I, *Vibrio splendidus*, Farming practises, Hydrodynamics, Environment.

Sommaire

Fiche documentaire	3
1. Synthèse	10
2. Introduction	12
2.1. Contexte général.....	12
2.2. Contexte Méditerranéen.....	13
2.3. Objectifs généraux	14
3. Matériel et Méthode.....	16
3.1. Sites d'étude	16
3.2. Caractérisation environnementale	16
3.3. Plan d'expérience.....	17
3.3.1. Caractérisation des mortalités printanières d'huîtres creuses.....	17
3.3.2. Effet des conditions d'élevage	18
3.4. Variables mesurées	21
3.4.1. Mortalité	21
3.4.2. Croissance	22
3.4.3. Indice de condition	22
3.4.4. Reproduction.....	22
3.4.5. Energétique.....	23
3.4.6. Agents infectieux	24
4. Résultats	26
4.1. Caractérisation des mortalités printanières d'huîtres creuses	26
4.1.1. Caractérisation environnementale	26
4.1.2. Cinétiques des mortalités	28
4.1.3. Croissance	32
4.1.4. Indice de condition	35
4.1.5. Reproduction.....	36
4.1.6. Energétique.....	38
4.1.7. Pathologie	41
4.1.8. Conclusion	43
4.2. Effet des conditions d'élevage	45
4.2.1. La période de mise en élevage et l'âge des huîtres	45
4.2.2. La période de mise en élevage et la ploïdie	50
4.2.3. Les pratiques d'élevage	54
4.2.4. L'exposition aux mortalités	62
4.2.5. Conclusion	63
5. Conclusions, perspectives et recommandations	65
5.1. Caractère infectieux des mortalités.....	65
5.2. Facteurs favorisant les mortalités	66
5.2.1. Le parcours zootechnique	66
5.2.2. L'hydrodynamique	66
5.2.3. Les pratiques culturelles	67
5.3. Autres facteurs à prendre en compte.....	68
5.4. Perspectives.....	68
5.4.1. Les pratiques culturelles et l'hydrodynamique à grande échelle.....	68
5.4.2. Les huîtres sélectionnées	69
5.5. Recommandations	69
6. Bibliographie	72

Avertissement

Le programme de recherche sur les mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau a été proposé aux instances professionnelles fin 2008 et couvre la période 2009-2010. Le Comité Régional Conchylicole de Méditerranée en est le maître d'oeuvre. Le Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon en assure la réalisation. Les autres financeurs sont l'Etat, la Région Languedoc-Roussillon, le Conseil Général de l'Hérault. Le Cepralmar assure la communication.

Ce document fait suite à un rapport intermédiaire en diffusion libre à l'adresse web suivante <http://archimer.ifremer.fr/doc/00002/11354/>. (Pernet F, Barret J, Gall PL, Malet N, Pastoureaud A, Munaron D, Lorgeril JD, Bachère E, Vaquer A, Huvet A, Corporeau C, Normand J, Boudry P, Moal J, Quéré C, Quillien V, Daniel JY, Pépin J-F, Saulnier D, Gonzalez JL, Bouchoucha M (2010) Mortalité du naissain d'Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau en 2009. Rapport No. 10-008, Ifremer).

Plusieurs éléments du rapport intermédiaire n'ont pas été repris dans ce rapport final. Les suivis de l'environnement nutritionnel et des contaminants organiques hydrophiles et des métaux traces sur Thau, initiés en 2009, ont été terminés, mais pas reconduits en 2010 vue l'absence de lien fort avec les mortalités de naissain. Aussi, bien que des données nouvelles ont été générées, elles ne seront pas présentées dans le cadre du présent rapport. Pour les mêmes raisons, nous avons volontairement omis le travail effectué sur la caractérisation des acides gras membranaires des huîtres, qui apporte finalement peu d'éclairage quant au phénomène de mortalité.

1. Synthèse

Ce rapport fait état d'une étude conduite pendant deux épisodes de mortalité massive du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* en France en 2009-2010. Ce projet a pour objectif d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain en documentant, à moyen terme, la cinétique des mortalités d'huîtres en relation avec les paramètres environnementaux, les agents infectieux et la physiologie de l'huître. Par ailleurs, ce projet vise à examiner l'effet des conditions d'élevage sur la mortalité, les agents infectieux et l'état énergétique des huîtres.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons suivi deux événements de mortalité printanière en 2009 et 2010 sur plusieurs lots d'huîtres en relation avec les paramètres environnementaux de l'étang de Thau, la croissance, la reproduction et la condition physiologique des huîtres, et la dynamique des agents infectieux. Par ailleurs, nous avons réalisé quatre expériences basées sur des transferts d'huîtres d'un milieu sain exempt de mortalité (mer ouverte) vers l'étang de Thau où des mortalités massives ont été enregistrées.

Les mortalités massives d'huîtres creuses coïncident toujours avec des infections simples par le virus Herpes OsHV-I ou des infections multiples (virus Herpes et bactérie *Vibrio splendidus*), lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. Dans l'étang de Thau, les mortalités démarrent début mai et s'arrêtent en octobre, avec une période d'interruption en juillet août lorsque la température de l'eau est supérieure à 24°C. Par rapport aux années 2007 et 2008, la mortalité s'intensifie et le seuil thermique de déclenchement est abaissé de ~2°C.

Les mortalités d'huîtres varient principalement en fonction du parcours zootechnique des animaux, de l'hydrodynamique et des pratiques culturales. Hormis dans quelques cas particuliers, la mortalité des huîtres est indépendante de l'état reproducteur et des réserves énergétiques.

La survie d'un lot d'huître est fonction de l'exposition ou non à la mortalité dans le passé. Les transferts de lots d'huîtres maintenus indemnes de mortalité en sans mortalité (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau) conduit inexorablement à des pertes importantes lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. En contrepartie, les huîtres qui survivent à une exposition aux mortalités durant l'année n sont résistantes l'année $n+1$. Il semble préférable d'exposer les huîtres aux mortalités dès leur plus jeune âge afin de sélectionner les populations cultivées et limiter la mortalité aux jeunes stades d'élevage, moins coûteux pour l'entreprise. Le maintien et le transfert d'huîtres naïves et sensibles aux mortalités vers des bassins à risque de mortalité contribuent à entretenir ou générer des foyers potentiels d'infection. Ces résultats confortent l'intérêt récent porté au développement des activités de captage de naissain d'huître sur Thau, captage qui est précoce et donc exposé aux mortalités pendant sa première année.

L'infection par le virus Herpes et la mortalité des huîtres placées au large des zones d'élevage fait suite à des courants forts provenant des zones d'élevage contaminées, suggérant que la mortalité et l'infection par le virus Herpes se propagent par l'eau de mer dans l'étang de Thau en fonction de l'hydrodynamique. Il est fort probable que le virus Herpes parcourt des distances plus ou moins grandes en fonction de la vitesse des courants tout en conservant sa virulence en dehors de son hôte. La connaissance de la durée pendant laquelle le virus Herpes est virulent en dehors de son hôte est cruciale pour envisager une adaptation des pratiques d'élevage face à cette maladie.

Les mortalités varient en fonction des pratiques culturelles. Les huîtres maintenues protégées du risque de mortalité en mer ouverte transférées dans l'étang de Thau meurent à 80% en paniers australiens alors que les mêmes individus collés sur cordes à faible densité présentent des mortalités moindres (10%). Les analyses pathologiques montrent que le virus Herpes est présent dans les deux cas. Les facteurs discriminants sont la prévalence et la concentration en *V. splendidus* qui sont plus élevées dans les huîtres maintenues en panier par rapport aux huîtres collées et les réserves énergétiques des animaux qui sont supérieures sur cordes. Ces résultats suggèrent que les pratiques culturelles peuvent moduler la mortalité.

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 dans l'étang de Thau. Toutefois, on peut quand même favoriser un ensemencement avec du naissain d'élevage naturel local et/ou résistant, et éviter les mélanges de lots infectés et naïfs qui amplifient le système d'infection.

Compte tenu que les mortalités d'huîtres présentent un caractère infectieux et qu'elles varient en fonction du parcours zootechnique et de l'isolement/connectivité hydrodynamique du site d'élevage, il faut systématiquement connaître les caractéristiques des lots mis en élevage (mortalité subie pendant la première année, statut sanitaire et origine des huîtres) et les caractéristiques du site d'accueil. Il apparaît indispensable de mettre en place un dispositif de traçabilité et de certification sanitaire des huîtres.

Le caractère infectieux des mortalités nous encourage à favoriser les pratiques d'élevage qui permettent de réduire la transmission des maladies à l'échelle des zones d'élevages. Cela revient à envisager des densités d'élevage plus faibles, à éviter la proximité entre individus et structures d'élevage et à suivre les cheptels afin de régulièrement retirer les huîtres moribondes ou mortes qui constituent de nouveaux foyers d'infection. Ces mesures, prises collectivement à grande échelle, pourraient influencer la propagation de l'infection et des mortalités.

Finalement, la production d'huître en mer Méditerranée sur site profond est intéressante, à condition de pouvoir y réaliser un cycle d'élevage complet et de ne pas propager l'infection dans ce milieu sain.

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 en 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 importante 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 en 2010 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 Ifremer, Cépralmar 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 $> 19^{\circ}\text{C}$, 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) et l'Ifremer 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 l'étang de Thau. Ce projet a pour objectifs :

(1) d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain en documentant, à moyen terme, la cinétique des mortalités d'huîtres en relation avec les paramètres environnementaux, les agents infectieux et la physiologie de l'huître,

(2) d'examiner l'effet des conditions d'élevage telles que la période de mise en élevage, l'âge des huîtres, la ploïdie et les pratiques culturales (structure d'élevage et localisation) sur la mortalité, les agents infectieux et l'état énergétique des huîtres.

Ce projet a permis de mettre à disposition les données de mortalité via des « bulletins mortalités » (10 n° + un spécial en 2009, 7 n° en 2010), en temps réel, sur le site du Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon de l'Ifremer toujours disponibles aux adresses suivantes :
<http://www.ifremer.fr/delst/actualites/suivimortalite2009.htm>
<http://www.ifremer.fr/delst/actualites/suivimort2010.htm>.

Un rapport intermédiaire (Pernet et al. 2010) a été édité en avril 2010 pour être distribué à l'ensemble du comité de pilotage du projet et mis en ligne sur le site du laboratoire environnement ressource du Languedoc Roussillon ainsi que sur le site Archimer de l'Ifremer. Entre autre, ce rapport intermédiaire contient une synthèse technique courte de 2 pages à destination des professionnels et des gestionnaires. Deux communiqués faisant état de recommandations suite aux programmes de recherche 2009-11 ont été émis par le CRCM à destination des professionnels via le périodique « le Méditerranéen ». Enfin, une restitution publique réunissant

professionnels, gestionnaires, élus, agents de l'état et médias a eu lieu le 14 décembre 2010 afin d'exposer les résultats marquants du programme de recherche 2009-11 et les principales recommandations qui en découlent.

3. Matériel et Méthode

3.1. Sites d'étude

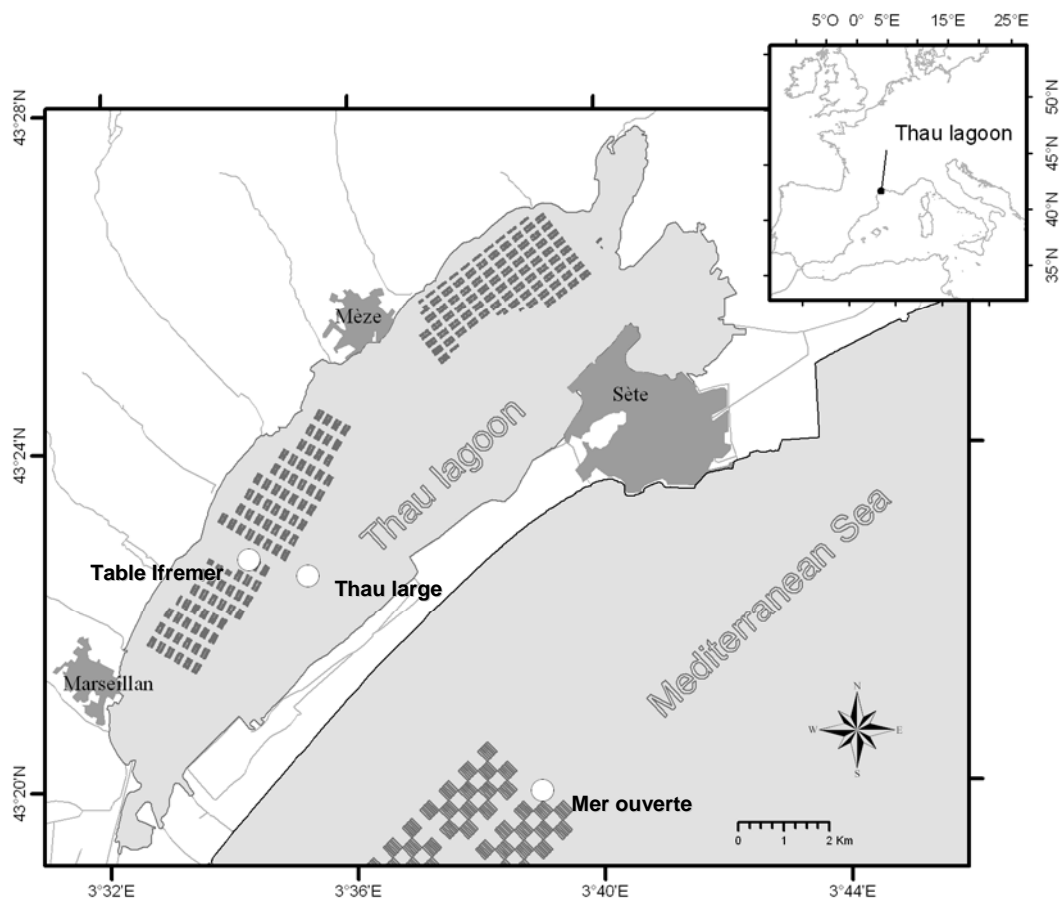


Figure 1. Présentation des trois sites principaux d'étude des mortalités d'huîtres creuses (cercles blancs).

Plusieurs lots d'huîtres ont été déployés sur l'étang de Thau ainsi qu'en mer ouverte au large de Marseillan sur des filières de moules (Fig. 1) et sur l'étang de Diana en Corse (en 2009 uniquement). Le choix de ces 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 la mer ouverte et l'étang de Diana sont restés exempts de mortalité. Les huîtres déployées sur l'étang de Thau ont été maintenues sur la table Ifremer localisée sur la zone de Marseillan et, selon le type d'expérience, dans l'étang de Thau au large des secteurs conchylicoles (Fig. 1).

3.2. Caractérisation environnementale

Les sites expérimentaux localisés dans la lagune de Thau (table Ifremer) 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 (Thau, mer ouverte et Diana) font l'objet d'un suivi des températures ($^{\circ}\text{C}$), 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 (Fig. 1).

3.3. Plan d'expérience

3.3.1. Caractérisation des mortalités printanières d'huîtres creuses

3.3.1.1. En fonction du stade d'élevage, de l'origine des huîtres, de la ploïdie et du site d'élevage en 2009

L'objectif est de documenter la cinétique des mortalités en 2009 en relation avec plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la mortalité tels que le stade de développement, l'origine, la ploïdie et le site d'élevage des huîtres.

Nous avons suivi sur l'étang de Thau:

- ▶ Deux lots d'huîtres adultes (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 triploïde issu de 4 écloséries (pool) de taille initiale 50 mm.
- ▶ Six lots de naissain d'huître 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 d'Arcachon.
- ▶ Deux lots de naissain de moule issus de captage naturel dans les étangs de Thau et de Berre afin de mettre en évidence le caractère spécifique des mortalités.

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 reparti dans 9 pearl nets répartis sur 3 cordes indépendantes. Les animaux en $\frac{1}{2}$ élevage (50 mm) et élevage (80 mm) sont maintenus en paniers australiens (9 paniers 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 (Fig. 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. Les variables mesurées sont la mortalité et la croissance de chaque lot. Par ailleurs, l'état reproducteur (indice de condition et histologie quantitative), les

réserves énergétiques, et la présence d'agents infectieux ont été suivis sur certains lots à plusieurs dates clés.

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 (Fig. 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). Les variables suivies sont la mortalité et la croissance des huîtres sur chaque site.

3.3.1.2. En fonction de la lignée en 2010

L'objectif est de comparer la mortalité de lots d'huîtres sélectionnées « résistantes » R et « sensibles » S aux mortalités des témoins diploïdes (2n) et triploïdes (3n). Les huîtres R et S sont issues d'une 6^e génération de sélection divergente pour la survie estivale (programme Morest). La mortalité de ces animaux est comparée avec celle de témoins 2n et 3n non sélectionnés. Par ailleurs, nous avons comparé la mortalité de lots 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).

Ces lots ont été produits au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade de l'Ifremer en août 2009, puis maintenus en nurserie à Bouin à partir d'octobre. Aucune mortalité anormale n'a été observée sur ces animaux pendant ces périodes d'élevages. Les huîtres ont été déployées sur Thau (table Ifremer, zone de Marseillan) le 12 mars 2010 et en mer ouverte le 18 mars 2010. Chaque lot sur chaque site est réparti dans 4 pearl nets contenant chacun 250 naissains (longueur initiale = 15 mm ± 1) et répartis sur 4 cordes. Chaque lot occupe une position différente sur chaque corde permettant d'évaluer l'effet de la profondeur sur la mortalité (dispositif expérimental en carré latin). Les surplus de chaque lot ont été maintenus en mer ouverte en lanterne afin de réaliser les expériences de transfert de la mer ouverte vers l'étang de Thau (voir section 3.3.2.2.).

Les variables suivies sont la mortalité et la présence d'agents infectieux en fonction de la date. Les analyses en pathologie portent sur un pool de 6 huîtres prélevées dans chaque panier.

3.3.2. Effet des conditions d'élevage

3.3.2.1. La période de mise en élevage et l'âge des huîtres

L'objectif de cette expérience consiste à définir les périodes à risque de mortalité en relation avec la présence d'agents infectieux et la température de l'eau. Cette expérience permet également de savoir si les huîtres deviennent naturellement résistantes avec l'âge lorsqu'elles ne sont pas exposées à la mortalité.

L'expérience porte sur le lot d'huîtres creuses triploïdes produit par l'écloserie B en août 2008 et déployé le 18 mars 2009 en mer ouverte au large de Marseillan (longueur de coquille moyenne [LC]=13mm, âge=8 mois). Ces huîtres ont été maintenues exemptes de mortalité depuis leur réception à Sète au LER/LR en mars 2009. Sept transferts ont été réalisés à partir d'une fraction des huîtres maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau : le 29 mai 2009 (LC=31 mm, âge=10 mois), le 19 octobre 2009 (LC=52 mm, âge=14 mois), le 08 avril 2010 (LC=69 mm, âge=20 mois), le 27 mai 2010 (LC=80 mm, âge=22 mois), le 23 juin 2010 (LC=80 mm, âge=23 mois) et le 17 septembre 2010 (LC=80 mm, âge=26 mois) et le 10 janvier 2011 (LC=80 mm, âge=30 mois).

Selon l'âge et la taille des huîtres, 300 à 750 individus prélevés aléatoirement dans les deux lanternes maintenues en mer ont été repartis dans trois paniers australiens indépendants sur la table Ifremer localisée dans la zone de Marseillan (100 à 250 individus par panier selon la taille).

Les variables suivies sont la mortalité et la présence d'agents infectieux en fonction de la date de transfert et du temps post-transfert dans l'étang de Thau. Pour les transferts 0 et I, la détection d'agent infectieux porte sur 4 huîtres provenant d'un même panier et groupées ensembles (n=3 et n=2 paniers ou analyse, portant sur 12 ou 8 individus respectivement). Pour les transferts II à VI, la détection d'agent infectieux est effectuée au niveau individuel. Pour les transferts II et III, nous avons prélevé seulement 1 huître par panier (n=3 paniers, soit 3 individus ou analyses). Pour les transferts IV, V et VI, nous avons prélevé 3 huîtres dans chaque panier (n=3 paniers, soit 9 individus ou analyses).

3.3.2.2. La période de mise en élevage et la ploïdie

L'objectif de cette expérience consiste à confirmer les résultats obtenus au cours de l'expérience précédente ainsi qu'à examiner l'interaction possible entre la ploïdie et la date de transfert dans l'étang de Thau sur la mortalité en relation avec la présence d'agents infectieux et l'énergétique.

L'expérience porte sur les lots d'huîtres creuses 2n et 3n décrit dans la section précédente 3.3.1.2..1 et déployés le 18 mars 2010 en mer ouverte au large de Marseillan. Ces huîtres ont été maintenues exemptes de mortalité depuis leur réception à Sète au LER/LR. Trois transferts ont été réalisés à partir d'une fraction des huîtres maintenues en mer ouverte dans l'étang de Thau : le 27 mai 2010 (LC=32-37 mm, âge=10 mois), le 23 juin 2010 (LC=37-46 mm, âge=11 mois) et le 17 septembre 2010 (LC=37-46 mm, âge=14 mois).

Trois cents individus ont été prélevés aléatoirement dans les deux lanternes contenant le surplus de chaque lot en mer ouverte. Lorsque le surplus était épuisé, les animaux ont été prélevés de façon homogène dans les pearl nets dédiés au suivi de la mortalité en mer, permettant ainsi de réduire les densités dans ces pearl nets à mesure que les huîtres poussent. Ces huîtres ont été placées dans trois paniers australiens indépendants sur la table Ifremer localisée dans la zone de Marseillan (100 individus par panier).

Les variables suivies sont la mortalité et la présence d'agents infectieux en fonction de la date de transfert et du temps post-transfert dans l'étang de Thau. Lorsque des différences de survie ont été observées entre ces lots, des analyses de réserves énergétiques ont été effectuées. Les analyses en pathologie et énergétique portent sur 6 huîtres prélevées groupées dans chaque panier pour le transfert du 23 juin, et sur 3 huîtres prélevées individuellement dans chaque panier (soit 9 individus ou analyses par traitement) pour le transfert du 17 septembre.

3.3.2.3. Les pratiques d'élevage

L'objectif de cette expérience est d'examiner l'effet des pratiques culturelles (panier australien vs. sur corde) et de la proximité des zones d'élevage sur la mortalité, la présence d'agents infectieux et l'état énergétique des huîtres.

Les huîtres triploïdes provenant de l'écloserie privée B, maintenues en mer ouverte et transférées le 27 mai 2010 (LC=80 mm, âge=22 mois) dans l'étang de Thau, ont été placés sur la table Ifremer dans la zone de Marseillan dans trois paniers australiens (voir section 3.3.2.1) ou collées sur six cordes de 2.5 m de long à raison de 3 huîtres par bouquets à 20 bouquets par corde (60 individus par corde). Ces huîtres ont également été placées dans trois paniers australiens (100 individus par panier) à environ 250m au large du secteur conchylicole de Marseillan (Fig. 1) afin d'examiner l'effet de la proximité des zones d'élevage sur les mortalités.

Compte tenu des mortalités qui ont lieu dans les paniers sur table entre le 27 mai et le 11 juin (voir section résultats), un autre transfert d'huîtres 3n (écloserie B) de la mer ouverte vers l'étang de Thau a été effectué le 23 juin. Ces huîtres ont été maintenues en paniers australiens dans les tables pour être comparées avec les survivantes du transfert précédent maintenues sur cordes et en paniers au large.

Les huîtres 3n (écloserie B) ont été transférées une dernière fois le 17 septembre en paniers australiens sur table et au large.

Les variables suivies sont la mortalité et la présence d'agents infectieux en fonction de la date de transfert, des pratiques culturelles et du temps post-transfert dans l'étang de Thau. Lorsque des différences de survie ont été observées entre ces lots, des analyses de réserves énergétiques ont été effectuées. Les analyses en pathologie et énergétique portent sur 3 huîtres prélevées individuellement dans chaque panier (ou corde), soit 9 individus ou analyses par traitement.

En plus, la vitesse et la direction des courants sont mesurées sous la table Ifremer à l'aide d'un courantomètre tridimensionnel acoustique à effet Doppler (3D-ADCP, RDI-Teledyne) qui enregistre la vitesse et la direction des courants à différentes profondeurs dans la colonne d'eau. Ces mesures permettent d'examiner la relation possible entre le régime hydrodynamique la propagation de l'infection et de la mortalité au large des zones d'élevage.

3.3.2.4. L'exposition aux mortalités

L'objectif de cette expérience est de savoir si les huîtres survivantes suite à une exposition aux mortalités sont résistantes l'année suivante. L'hypothèse est que le naissain survivant en année n résiste en année $n+1$.

Nous avons suivi la mortalité du lot de naissain huîtres provenant du captage d'Arcachon déployé dans l'étang de Thau en mars 2009 (voir section 3.3.1.1.) pendant 18 mois.

Par ailleurs, nous avons comparé la mortalité constatée au printemps 2011 des huîtres maintenues exemptes de mortalité en mer ouverte avec celle des huîtres survivantes à une exposition aux mortalités dans l'étang de Thau en 2010. L'expérience porte sur les lots 2n et 3n produits en août 2009 (Ifremer), déployés le 18 mars 2010 en mer ouverte au large de Marseillan et maintenus exempt de mortalité. Ces huîtres ont été transférées dans l'étang de Thau le 23 juin 2010 (groupe exposé aux mortalités en 2010) ou le 10 janvier 2011 (groupe non exposé en 2010).

Depuis le 10 janvier 2011, ces huîtres sont maintenues en paniers australiens à faible densité (60 individus par panier). Les effectifs faibles en huîtres survivantes à la mortalité en 2010 (27% et 57% de mortalité pour les 2n et les 3n respectivement) n'ont pas permis de répliquer ce traitement dans plusieurs paniers. Par conséquent, la mortalité des huîtres préalablement exposées aux mortalités est mesurée sur un panier contenant les animaux 2n et un autre panier contenant les 3n, alors que la mortalité des huîtres non exposées est suivie dans deux paniers par niveau de ploïdie.

3.4. Variables mesurées

3.4.1. Mortalité

Les individus morts et les individus vivants sont dénombrés dans chaque panier afin de déterminer le pourcentage de mortalité par rapport à l'échantillonnage précédent. Les individus morts sont retirés. La mortalité cumulée est calculée de la façon suivante :

$$P_{cum(t)} = (1 - P_{inst(t)}) \times P_{cum(t-1)} + P_{inst(t)}^1$$

$P_{cum(t)}$ = probabilité de mortalité cumulée au temps t ,

$P_{inst(t)}$ = probabilité de mortalité instantanée au temps t , soit :

$$P_{inst(t)} = \frac{nbmort_{(t)}}{nbmort_{(t)} + nbvivant_{(t)}}$$

$P_{cum(t-1)}$ = probabilité de mortalité cumulée au temps $t-1$ (échantillonnage précédent).

¹ Peut également se lire : $1 - (1 - P_{cum(t-1)}) \times (1 - P_{inst(t)})$

Cette formule permet de s'affranchir des individus prélevés.

Appliquée lors du premier échantillonnage (t_1), cette formule donne :

$$P_{cum(t_1)} = (1 - P_{inst(t_1)}) \times P_{cum(t_0)} + P_{inst(t_1)}$$

$$P_{cum(t_1)} = (1 - P_{inst(t_1)}) \times 0 + P_{inst(t_1)}$$

$$P_{cum(t_1)} = P_{inst(t_1)}$$

3.4.2. Croissance

La croissance est évaluée dans chaque panier à partir de mesures effectuées sur vingt-cinq individus par panier. La longueur de coquille est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse (Mitutoyo, Paris, France) relié à un ordinateur (liaison USB). La masse de l'individu entier est mesurée à l'aide d'une balance de précision (Mettler-Toledo, Viroflay, France) après avoir enlevé les organismes fixés sur les coquilles. La balance de précision est également connectée à un ordinateur (liaison RS232) et les données sont transférées sous Excel via un logiciel polyvalent (<http://www.billproduction.com/billscalebalance>).

3.4.3. Indice de condition

Les masses sèches de tissus et de coquilles ont été mesurées sur les huîtres aux stades naissain, élevage et adulte. L'évolution de la masse sèche de tissu en fonction du temps permet de rendre compte de la croissance des huîtres, mais également des événements de ponte. Par ailleurs, le rapport de la masse sèche de tissu et de coquille est un indicateur de la condition physiologique des huîtres. Au stade naissain, les masses sèches de tissu et coquille sont mesurées sur des groupes de neuf individus par corde (généralement 3 individus par paniers). Sur le 1/2 élevage et les adultes, les mesures de masses sèches sont individuelles. Les tissus ont été pesés frais et après séchage à 60°C pendant 48h. Les coquilles ont été pesées après séchage à 60°C pendant 48h après avoir enlevé les organismes fixés.

3.4.4. Reproduction

L'état reproducteur des huîtres sauvages provenant d'Arcachon aux stades naissain et adulte a été suivi en 2009 afin d'examiner la relation possible entre ce caractère et les mortalités printanières. Au stade naissain, les tissus des huîtres ont été prélevés sur 9 individus par corde (3 huîtres par panier) soit 27 individus au total. Au stade adulte, les tissus ont été prélevés sur 4 individus par panier, collectés dans 3 paniers différents (12 individus au total). Les tissus prélevés ont été inclus dans le mélange Davidson et les coupes histologiques ont été préparées tel que décrit par Pernet et al. (2010).

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). Une sélection automatique de l'ensemble de la surface de la masse viscérale puis des tissus gonadiques est réalisée par contour manuel. Les surfaces de la masse viscérale, et de la surface occupée par les tissus gonadiques en pixels sont alors exportées vers Excel.

3.4.5. Energétique

Les tissus des huîtres prélevées ont été conservés à -80°C avant d'être réduit en poudre à l'aide du vibro-broyeur à bille MM200 (Retsch, Eragny sur Oise, France) sous azote liquide à -196°C . Selon la taille des huîtres et le type d'expérience, les poudres sont un homogénat de tissus provenant d'un pool 6 ou 9 individus ou d'un individu unique (voir section 3.3).

3.4.5.1. 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).

3.4.5.1.1 Sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés selon la méthode de Dubois (1956). Un échantillon de poudre (100-200 mg) est dilué dans 2-3 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.

3.4.5.1.2 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).

3.4.5.2. Activités enzymatiques

Nous avons suivi l'activité de l'enzyme citrate synthase (CS), une enzyme clé du métabolisme énergétique impliquée dans la production d'énergie. 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 (Genard et al. sous presse).

Nous avons également suivi les activités de l'hexokinase (HK) et de la pyruvate-kinase (PK), deux enzymes clés irréversibles de la glycolyse ainsi que celle de la phospho-énolpyruvate-carboxykinase (PEPCK), une enzyme clé irréversible de la néoglucogenèse. La glycolyse a pour but de transférer et de libérer une partie de l'énergie du glucose alors que la néoglucogenèse produit du glucose à partir de substrats non glucidiques, comme certains acides aminés, le lactate et le glycérol. Chez l'huître creuse, la HK et la PK sont très active au printemps et reflète l'utilisation de la nourriture pour produire de l'énergie et fabriquer les gamètes via la glycolyse (Le Moullac et al. 2007). En revanche, l'activité de la PEPCK, une enzyme qui produit de l'énergie par une voie plus indirecte de recyclage, n'est pas associée à la période printanière. Par ailleurs, l'activité de la PK de l'huître creuse varie en fonction des réserves énergétiques et des conditions d'élevage (Le Moullac et al. 2007).

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. Les protocoles détaillés des mesures d'activités enzymatiques ont été décrits par Pernet et al. (2010, pour la CS), et Le Moullac et al. (2007, pour la PK et la PEPCK).

3.4.6. Agents infectieux

Nous nous sommes principalement intéressé à la relation possible entre les épisodes de mortalité et la détection de l'Herpes virus OsHV-1 et des bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus*. Ces agents infectieux sont détectés par méthode qPCR appliquée sur des extraits d'ADN issus des poudres préparées selon la description en 3.4.5. Selon la taille des huîtres et le type d'expérience, la détection d'agents infectieux porte sur un pool de 6 ou 9 individus ou sur un individu (voir section 3.3). En 2009, les analyses en pathologie ont été effectuées au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade de l'Ifremer, alors qu'en 2010, ces analyses ont été sous-traitées au Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Hérault à Montpellier (LDV34).

3.4.6.1. Recherche de l'Herpes virus OsHV-1

La méthode analytique utilisée pour la quantification de l'Herpes virus OsHV-1 est basée sur une technique de PCR en temps réel (Pepin et al. 2008). Cette méthode consiste en une amplification et une quantification du nombre de copies d'ADN viral. La quantité d'ADN viral détectée renseigne sur l'implication ou non de l'agent infectieux en cas de mortalité. Les charges virales supérieures à 10^4 copies mg^{-1} de tissu frais sont le signe d'une répllication active du virus dans l'hôte et témoigne de son action dans le processus morbide.

3.4.6.2. Recherche de *Vibrio splendidus* et *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 (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. Les PCR ont été effectuées directement à partir d'extraits de poudres d'huîtres.

4. Résultats

4.1. Caractérisation des mortalités printanières d'huîtres creuses

4.1.1. Caractérisation environnementale

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. 2A). L'augmentation printanière de la température a lieu de façon quasi linéaire par rapport à 2008 où la température augmentait par paliers (Fig. 2A, 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. 2A).

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 (Fig. 2B). 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 (Fig. 2C).

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* (Fig. 2D).

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* (Fig. 2E).

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 global de l'étang de Thau est la biomasse phytoplanctonique remarquablement constante et faible par rapport aux moyennes décennales.

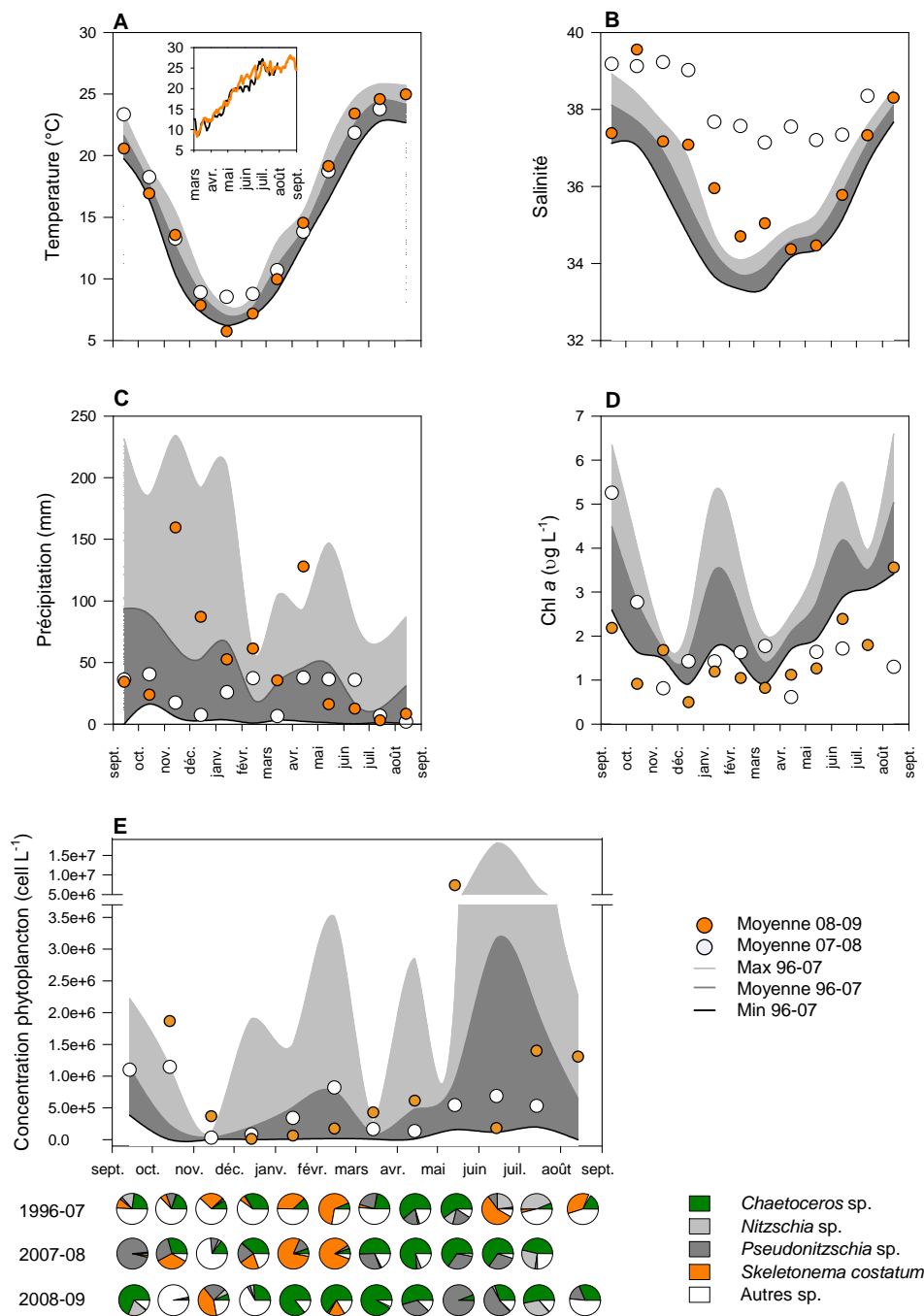


Figure 2. Paramètres environnementaux enregistrés sur l'étang de Thau à Bouzigues: (A) température de l'eau, (B) salinité, (C) précipitation (source Météo France), (D) concentration en chlorophylle *a* et (E) en phytoplancton. Les données sont des moyennes mensuelles en 2007-08 et 2008-09 (cercles blancs 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. Cinétiques des mortalités

Dans l'étang de Thau, les mortalités sur le naissain sont constatées pour la première fois le 11 mai et touchent en moyenne 24% des individus quel que soit le lot de naissain (jusqu'à 90% des individus du lot éclosion B 3n, Fig. 3A). 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, quelle que soit leur origine et ploïdie (Fig. 3A), sauf le lot d'huître sauvage provenant d'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 éclosion 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. 3B). La mortalité est quasi-totale. La température de l'eau était comprise entre 17.0°C et 18.7°C. En mer ouverte, le même lot d'huître ne subit aucune mortalité, malgré des températures pouvant atteindre plus de 23°C en été (Fig. 3B). 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. 3C).

En 2010, la mortalité démarre le 26 avril dans l'étang de Thau suite à une augmentation de la température de 15.0°C à 19.2°C en seulement 11 jours (Fig. 4). La mortalité moyenne est de 14% ± 10 pour le lot 2n, 10% ± 12 pour le lot 3n, 9% ± 17 pour le lot R et 4% ± 3 pour le lot S. Bien que les mortalités moyennes soient encore relativement faibles, la variance est élevée : la mortalité enregistrée dans le lot d'huîtres R varie entre 0% et 34% selon les paniers (Fig. 4A). Au même moment, les lots SER +- et RER +- n'enregistrent aucune mortalité anormale (Fig. 4B). Toutefois, la mortalité augmente rapidement entre le 26 avril et le 6 mai, touchant en moyenne 88% des individus quels que soient les lots (Fig. 4C). Comme en 2009, les huîtres de 18 mois suivies dans le cadre de l'observatoire conchylicole en 2010 (taille moyenne le 6 avril = 62 mm) n'ont pas subi de mortalité significative pendant l'année (5% au total).

Comme en 2009, le naissain d'huître placé en mer ouverte ne présente pas de mortalité significative pendant l'année 2010, malgré des températures estivales souvent supérieures à 17°C (Fig. 4C).

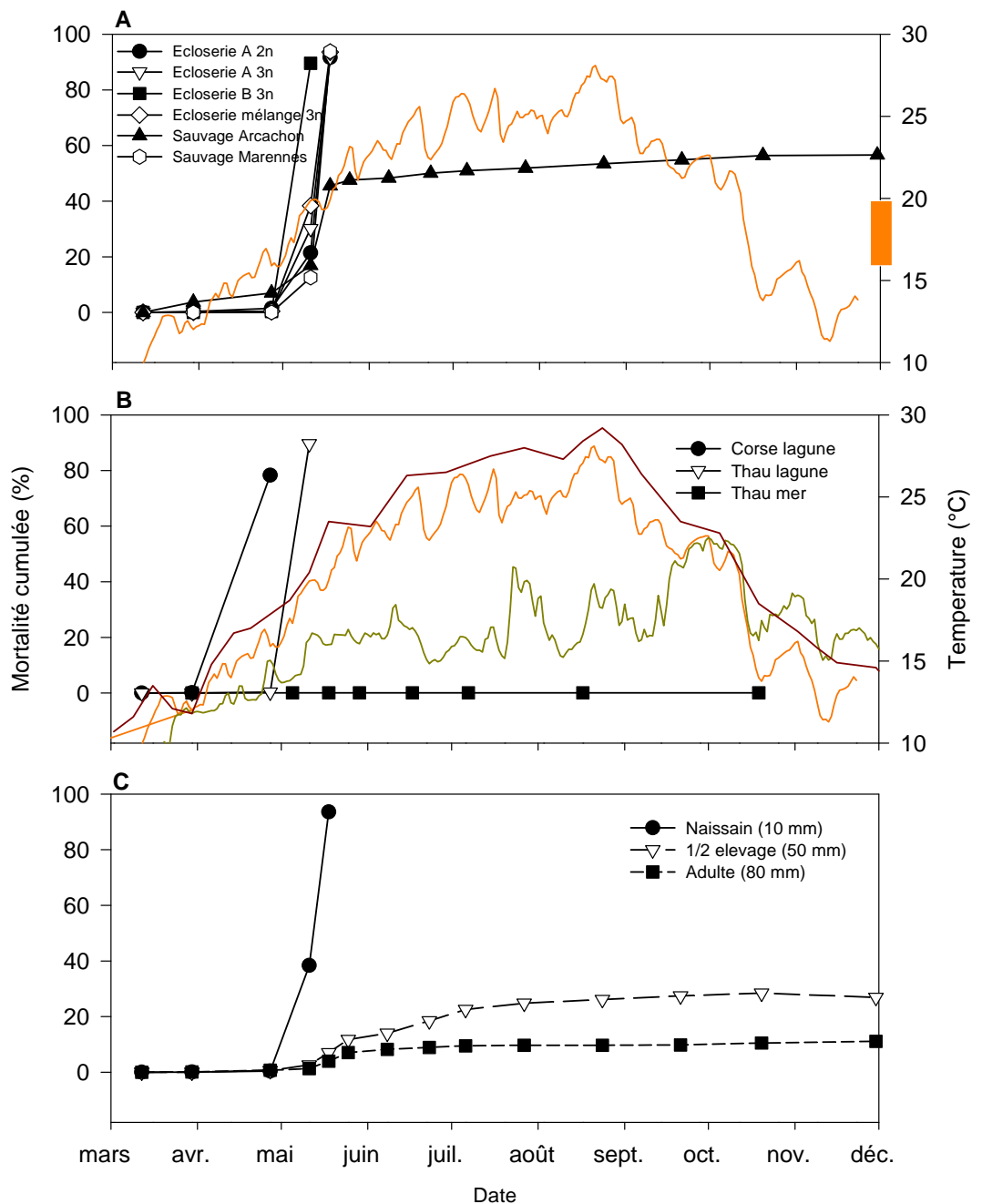


Figure 3. Mortalités cumulées d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps en 2009. Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployé sur Thau (A), des sites de culture pour un lot d’huître provenant de l’écloserie B, 3n (B) et des stades d’élevage pour des lots d’huîtres 3n constitués d’individus provenant de 4-5 éclosiers 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.

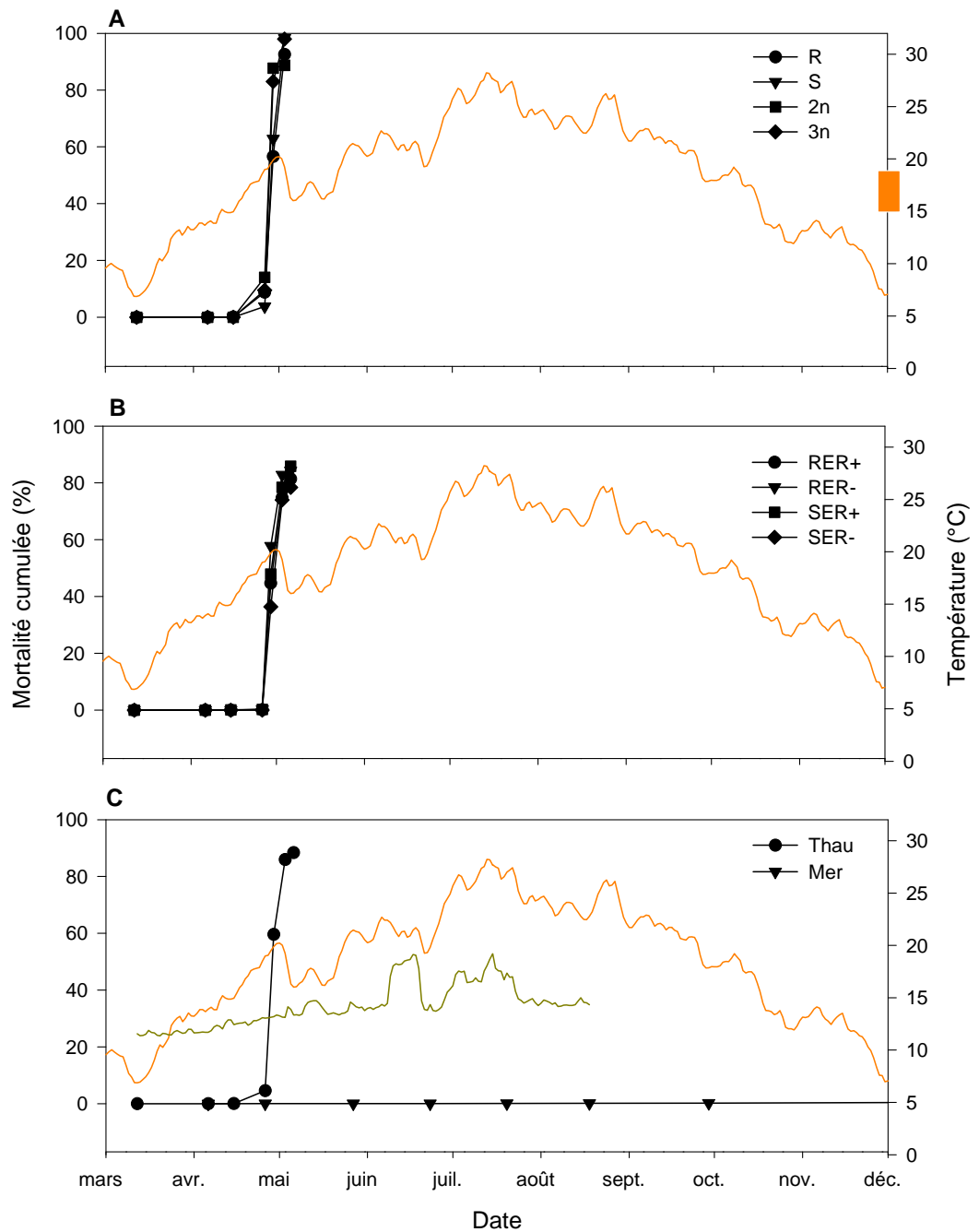


Figure 4. Mortalités cumulées d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps en 2010. Comparaison des huîtres sélectionnées « résistantes » R et « sensibles » S aux mortalités et des témoins diploïdes (2n) et triploïdes (3n) (A), des huîtres sélectionnées RER+/- et SER +/- (B) et des sites d’élevage (C). Les données de mortalité présentées sur la figure C sont des moyennes des huit lots d’huîtres suivis. Les températures mesurées en haute fréquence dans la lagune de Thau et en mer ouverte sont indiquées en 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.

La figure 5 illustre l'intensification du phénomène de mortalité et l'abaissement du seuil thermique lors du démarrage des mortalités entre 2007 et 2010. 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 et 2010 coïncident avec une augmentation de la température de l'eau de 15.9°C à 19.9°C-19.0°C, soit une température moyenne pendant cette période de 17.6°C-17.1°C comparativement à 20.1°C en 2008.

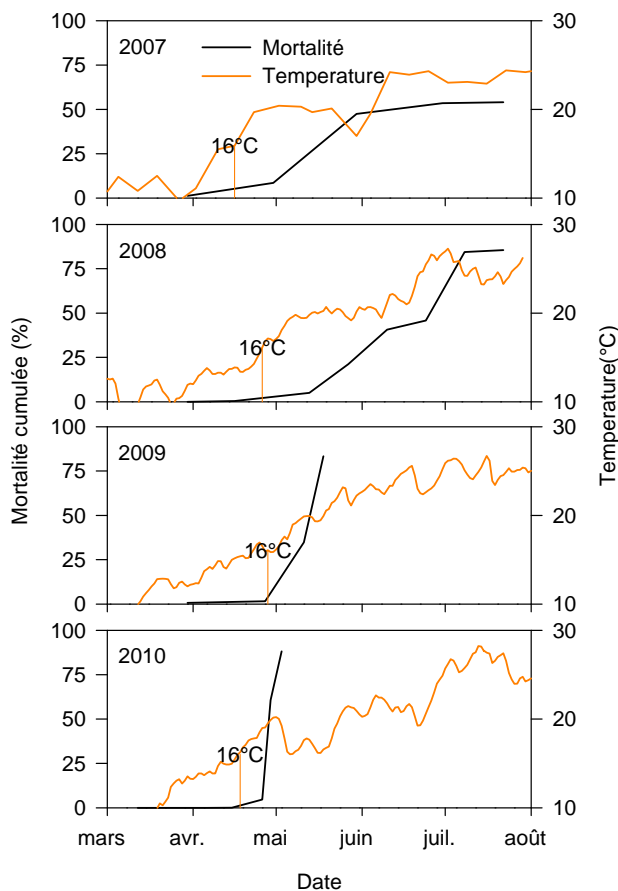


Figure 5. Mortalités cumulées moyennes du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau en fonction du temps pour les années 2007, 2008, 2009 et 2010. Les données de mortalité acquises en 2007 proviennent de fiches de déclarations de mortalité de lots professionnels alors que le suivi des températures provient du Rephy. Les données acquises en 2008 sont extraites du suivi des mortalités initié dans le cadre d'un partenariat Ifremer, Cepralmar et OP et SRCM.

4.1.3. Croissance

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. 6A). 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'observée en période de pré mortalité. En 2009, la croissance du naissain augmente avant l'épisode de mortalité. La même observation est rapportée en Corse où la mortalité a lieu alors que la croissance est 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. 6B).

En revanche, la croissance des huîtres de ½ élevages et d'élevage pendant le démarrage des mortalités est similaire hors période de mortalité (Fig. 6C). 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, les données acquises en 2009 suggèrent que l'augmentation du taux de croissance de l'huître pourrait être un caractère nécessaire au déclenchement de la mortalité, mais pas suffisant.

Le taux de croissance coquillière des huîtres suivies en 2010 passe en moyenne de 0.360 mm par jour entre le 12 mars et le 6 avril en période hors mortalité à 0.245 mm par jour entre le 6 avril et le 15 avril en période de pré mortalité à 0.287 mm par jour entre le 15 avril et le 26 avril en période de mortalité (Fig. 7).

Par conséquent, l'idée selon laquelle l'augmentation du taux de croissance de l'huître pourrait être un caractère nécessaire au déclenchement de la mortalité n'est pas avérée en 2010.

La croissance des huîtres maintenues en mer ouverte en 2009 et en 2010 est bonne. Le potentiel de croissance des huîtres en mer ouverte en profondeur comparativement à celui observé en lagune méditerranéenne sera étudié plus en détail en 2011 dans le cadre de l'observatoire national conchylicole (Ifremer).

La mortalité en 2009 est d'autant plus élevée que les animaux sont petits (Fig. 8). Cette observation reflète probablement l'effet du parcours zootechnique qui est confondu avec la taille et l'âge. Les animaux de plus grande taille et plus âgés seraient résistants aux mortalités en 2009 simplement parce qu'ils y ont été exposés en 2008.

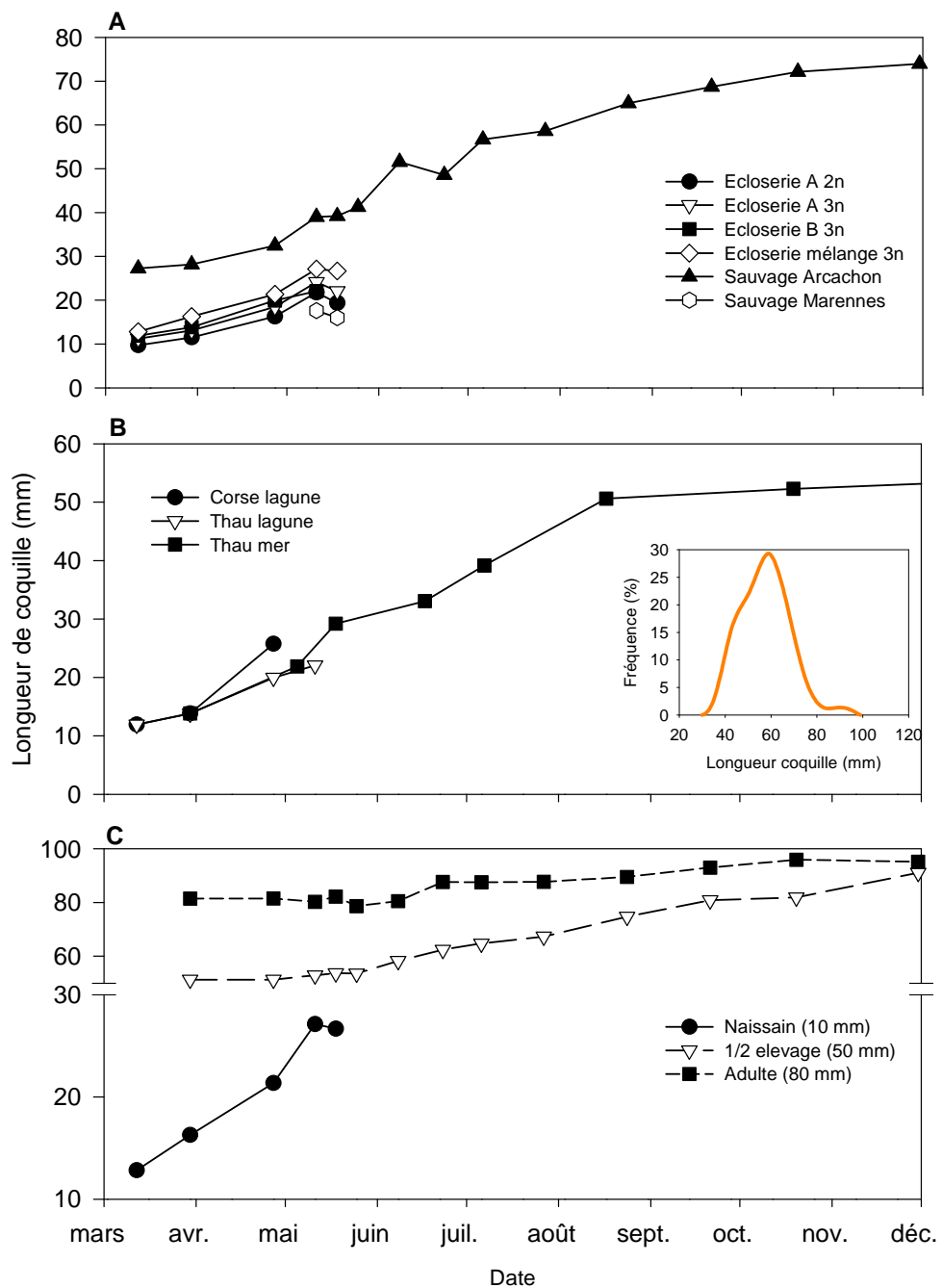


Figure 6. Evolution de la longueur de coquille d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps en 2009. Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployé sur Thau (A), des sites de culture pour un lot d’huître triploïde provenant de l’écloserie B (B) et des stades d’élevage pour des lots d’huîtres 3n constitués d’individus provenant de 4-5 écloséries 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.

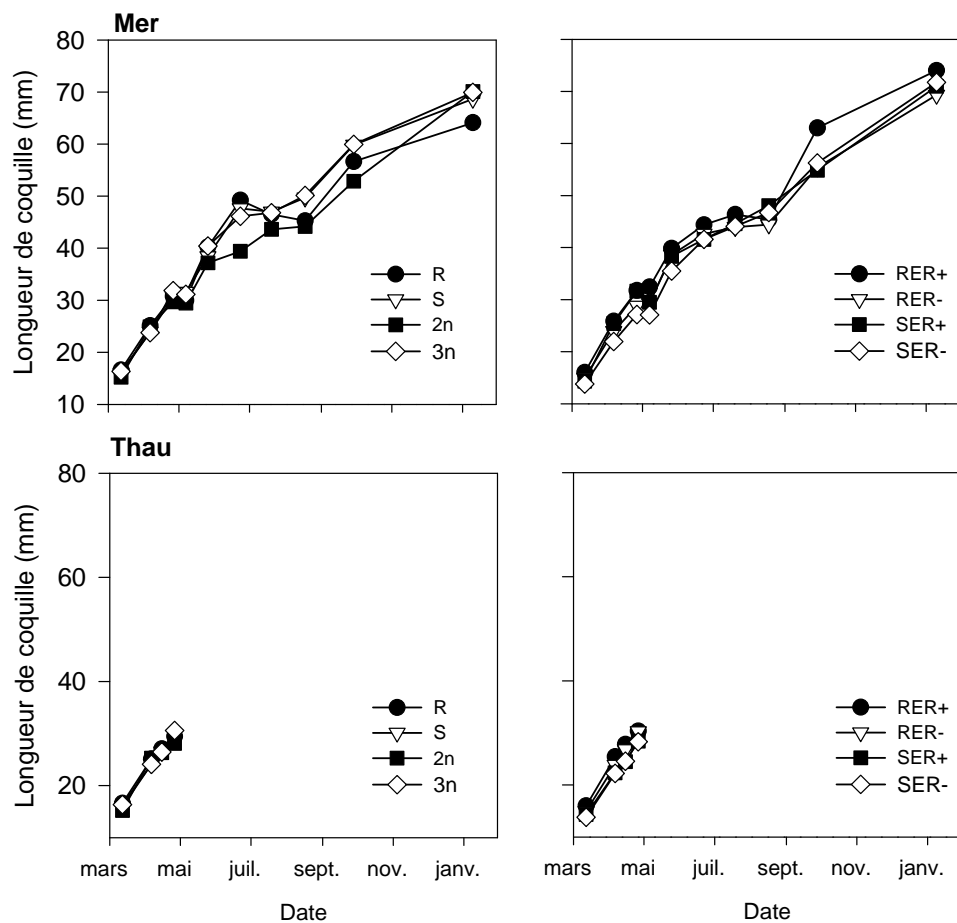


Figure 7. Evolution de la longueur de coquille d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps en 2010 en mer ouverte et dans l’étang de Thau. Comparaison des huîtres sélectionnées « résistantes » R et « sensibles » S aux mortalités et des témoins diploïdes (2n) et triploïdes (3n) (gauche) et des huîtres sélectionnées RER+/- et SER +/- (droite).

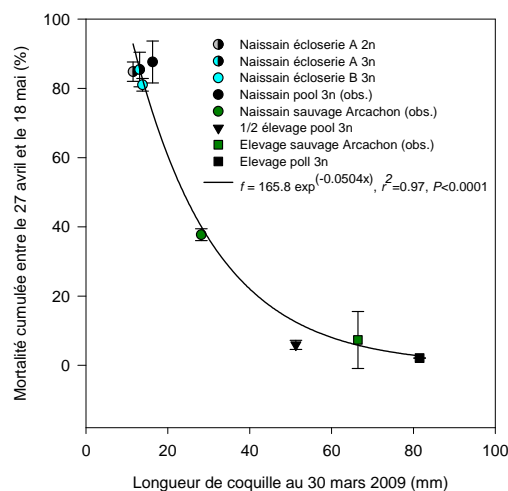


Figure 8. Mortalité cumulée moyenne (n=3 cordes, ± écart-type) entre le 27 avril et le 18 mai 2009 d’huître creuse *Crassostrea gigas* sur l’étang de Thau en fonction de la taille des lots lors du déploiement.

4.1.4. Indice de condition

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).

En 2009, la masse de chair sèche dans le naissain d'huître maintenu dans l'étang de Thau augmente de façon accrue avant et pendant l'épisode de mortalité (voir Fig. 9A et Pernet et al. 2010 pour le détail des données). En revanche, le même suivi effectué en 2010 sur le naissain d'huître provenant de huit lots différents ne corrobore pas cette observation. En effet, la masse de chair sèche dans le naissain d'huître augmente en moyenne à un taux de 0.224 mg par jour entre le 12 mars et le 6 avril contre seulement 0.15 mg par jour entre le 6 avril et le 15 avril (période de pré mortalité) et 0.09 mg par jour entre le 15 avril et le 26 avril, période à laquelle les mortalités démarrent (Fig. 9B). Plusieurs lots ne présentent pas d'augmentation nette de masse de tissu entre le 11 mars et le 26 avril et les patterns sont très variables entre les lots. Par conséquent, bien que les données acquises en 2009 suggèrent que la mortalité succède à un emballement du taux de croissance du naissain d'huître, cette conclusion n'est pas supportée par les données acquises en 2010.

Entre le 6 juillet et le 27 juillet 2009, les huîtres aux stades naissains et adultes présentent une baisse de 16% et 53% respectivement de la masse de chair sèche, correspondant à un épisode de ponte clairement décalé de la période de mortalité (Fig. 9A). En 2010, la mortalité est bien antérieure à la ponte qui a lieu entre le 16 juin et le 8 juillet (données Observatoire Conchylicole 2010). Par conséquent, les deux années de suivi de mortalités en relation avec la condition des huîtres montrent bien le découplage entre la mortalité et la ponte des huîtres.

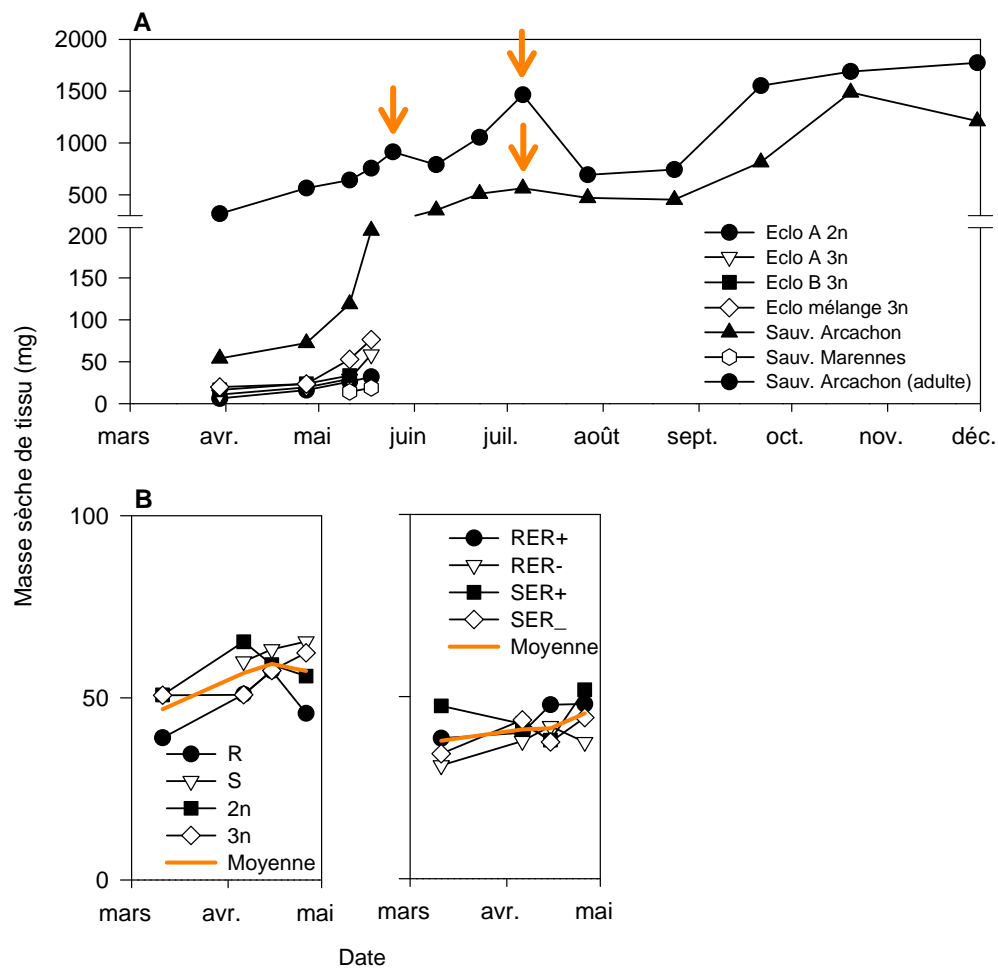


Figure 9. Evolution de la masse de chair sèche d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* maintenues dans l’étang de Thau en fonction du temps en 2009 (A) et 2010 (B). Comparaison des différentes origines et niveaux de ploïdie du naissain déployés sur Thau (A), et des huîtres sélectionnées « résistantes » R et « sensibles » S aux mortalités et des témoins diploïdes (2n) et triploïdes (3n) (gauche) et des huîtres sélectionnées RER+/- et SER +/- (droite) (B). Les flèches indiquent le début d’épisodes de ponte.

4.1.5. Reproduction

Sur une période annuelle, l’analyse histologique des gonades permet l’identification de six étapes typiques du cycle gamétogénique. L’analyse qualitative histologique effectuée en 2009 suggère que l’activité gamétogénique du lot d’huîtres adultes est plus précoce que celle du lot de naissains (Fig. 10). 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 adultes 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 (Fig. 10). La résorption des gamètes a lieu à partir de septembre.

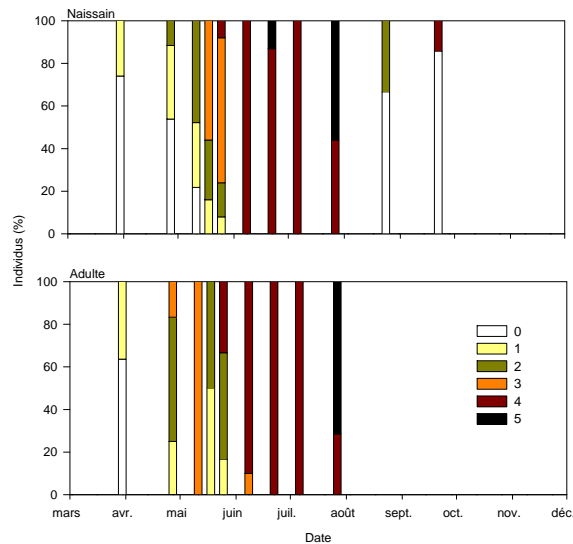


Figure 10. Evolution du stade de maturation des huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Les lots d'huîtres examinés sont constitués de naissains (haut) et adultes (bas) sauvages provenant d'Arcachon. Les stades de développement gonadiques sont : 0 (pas de gamète, repos sexuel), 1 (follicule 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).

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 (Fig. 11)

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. 11). 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 observée dans le bassin 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. 11). 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. 11).

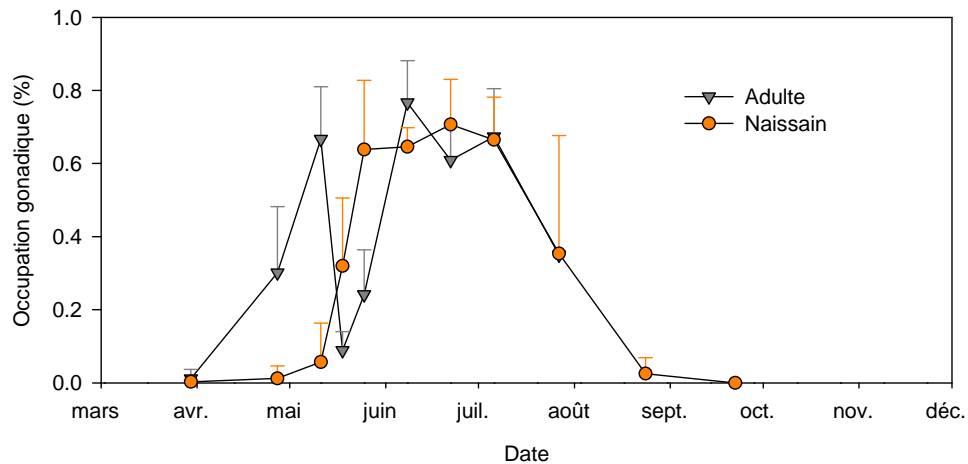


Figure 11. Evolution du pourcentage d'occupation gonadique évalué en histologie quantitative des huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction du temps. Les lots d'huîtres examinés sont constitués de naissains (haut) et adultes (bas) diploïdes sauvages provenant d'Arcachon.

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.

4.1.6. Energétique

Les triglycérides (TAG) et les sucres totaux sont des indicateurs du niveau de réserves énergétiques des mollusques bivalves. Chez *C. gigas*, les lipides et les sucres suivent généralement des cycles saisonniers d'accumulation et d'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 TAG et des sucres tel qu'observé dans la littérature scientifique (Fig. 12, $P_{\text{date}} < 0.001$ pour les TAG et les

sucres). Sur un cycle annuel, le naissain d'huître sauvage provenant d'Arcachon présente des teneurs en TAG et en sucres de respectivement 37% et 23% inférieures à celles observées chez les adultes (Fig. 12).

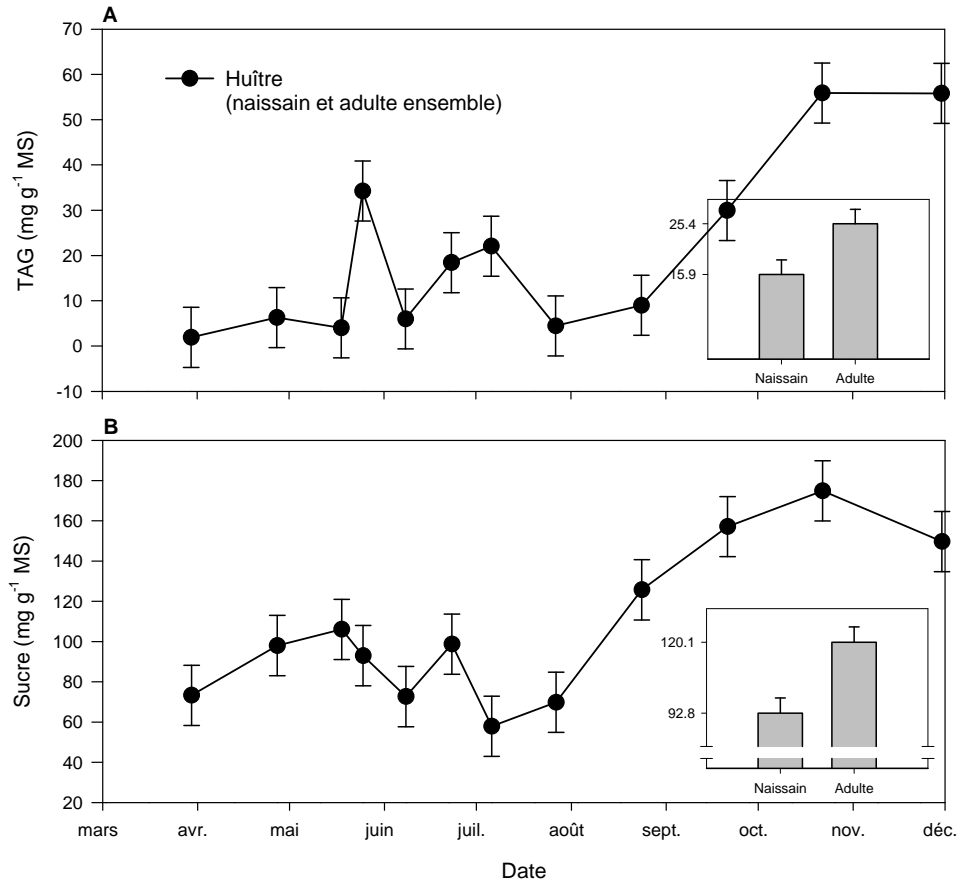


Figure 12. Concentration en triglycérides (TAG) et sucres totaux en mg g⁻¹ de matière sèche d'huître creuse *Crassostrea gigas* sauvages provenant d'Arcachon en fonction du temps (moyenne \pm erreur type, n=3 cordes \times 2 lots). Sur la figure principale, les lots de naissain et d'adulte ont été regroupés puisqu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'interaction stade \times date ($P= 0.093$ et $P= 0.076$ pour les TAG et les sucres respectivement). L'encadré illustre l'effet simple du stade (naissain vs adulte) sur les teneurs en TAG et en sucre.

Nous avons analysé la concentration en TAG et 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. Les concentrations moyennes en TAG et en sucre du naissain sont respectivement 4 et 2 fois plus faibles (2.5 et 67.4 mg g⁻¹ de matière sèche pour les TAG et les sucres) que celles des adultes qui contiennent en moyenne 10.0 et 132.6 mg de TAG et de sucre par gramme de matière sèche (Table 1). Les différences de concentration en TAG et en sucre entre les deux groupes (naissain [A 2n, A 3n, B 3n, Pool 3n, Sauvage] vs adulte [pool 3n, sauvage, pool 3n]) sont hautement significatives (contraste : $P=0.001$ et $P=0.003$) et coïncident avec des différences marquées de survie.

Tableau 1. Concentration en triglycérides (TAG), sucres totaux 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	TAG (mg g ⁻¹ tissu sec)	Sucres (mg g ⁻¹ tissu sec)	Activité CS (U mg ⁻¹ prot)
A 2n	Naissain	3.1 \pm 0.2	50 \pm 34	127 \pm 32
A 3n	Naissain	1.8 \pm 1.5	85 \pm 12	101 \pm 11
B 3n	Naissain	3.7 \pm 0.9	72 \pm 13	96 \pm 12
Pool 3n	Naissain	2.3 \pm 1.4	59 \pm 15	85 \pm 32
Sauvage Arcachon	Naissain	1.6 \pm 0.4	71 \pm 10	140 \pm 8
Pool 3n	½ élevages	7.6 \pm 2.5	163 \pm 58	103 \pm 39
Sauvage Arcachon	½ élevages	11.0 \pm 11.3	120 \pm 47	79 \pm 23
Pool 3n	Elevage	11.5 \pm 9.9	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 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 énergétiques, alors que les naissains diminuent 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.

En conclusion, les naissains sont caractérisés par des réserves énergétiques inférieures à celles des huîtres adultes, de sorte que les naissains sont probablement plus sensibles à un déficit énergétique que les adultes. En revanche, les naissains présentent des capacités de production d'énergie similaires à celles des adultes alors que nous attendions 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.

4.1.7. 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 essentiellement au moyen d'outils moléculaires spécifiques (PCR en temps réel ou PCR classique), ceci pour le virus Herpes OsHV-1 et des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus*).

Les résultats des analyses des tissus d'huître prélevés le 27 avril 2009, juste avant le constat des mortalités le 11 mai 2009, montrent que les charges en virus Herpes sont 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, où le phénomène de mortalité est en cours, tous les lots de naissain d'huître présentent des charges virales élevées supérieures à 10^6 cp mg^{-1} de tissu, signe d'une infection avec forte répllication qui suggère que le virus Herpes est impliqué dans le phénomène de mortalité (Table 2). Les lots de moule maintenus sur la même table au voisinage des huîtres infectées présentent des charges virales inférieures à 100 cp mg^{-1} de tissu, niveau de portage non associé à des mortalités.

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 *V. splendidus* alors que pendant le constat des mortalités, la concentration de *V. splendidus* augmente jusqu'à atteindre 10^6 - 10^7 cfu g^{-1} .

Tableau 2. 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 de naissain d'huître	OsHV-I (10^6 cp g^{-1} tissu)	<i>V. splendidus</i> (10^6 cfu g^{-1})
B 3n	15541.0 \pm 12714.4	23.6 \pm 13.2
Pool 3n	1613.4 \pm 1104.4	10.4 \pm 9.2
Sauvage Arcachon	43.4 \pm 51.4	2.2 \pm 5.9

En 2010, l'apparition des mortalités coïncide avec une infection par le virus Herpes et la bactérie *V. splendidus* dans le naissain d'huître, suggérant que ces derniers sont impliqués dans le phénomène de mortalité (Fig. 13). Comme en 2009, juste avant le constat des mortalités le 15 avril 2010, seul 1 pearl net sur 16 est positif au virus Herpes avec un niveau de portage faible inférieur à 10^4 cp mg^{-1} de tissu. Le 26 avril, dès que les mortalités commencent, les huîtres prélevées dans tous les pearl nets présentent un portage supérieur à 10^6 cp mg^{-1} de tissu (Fig. 13).

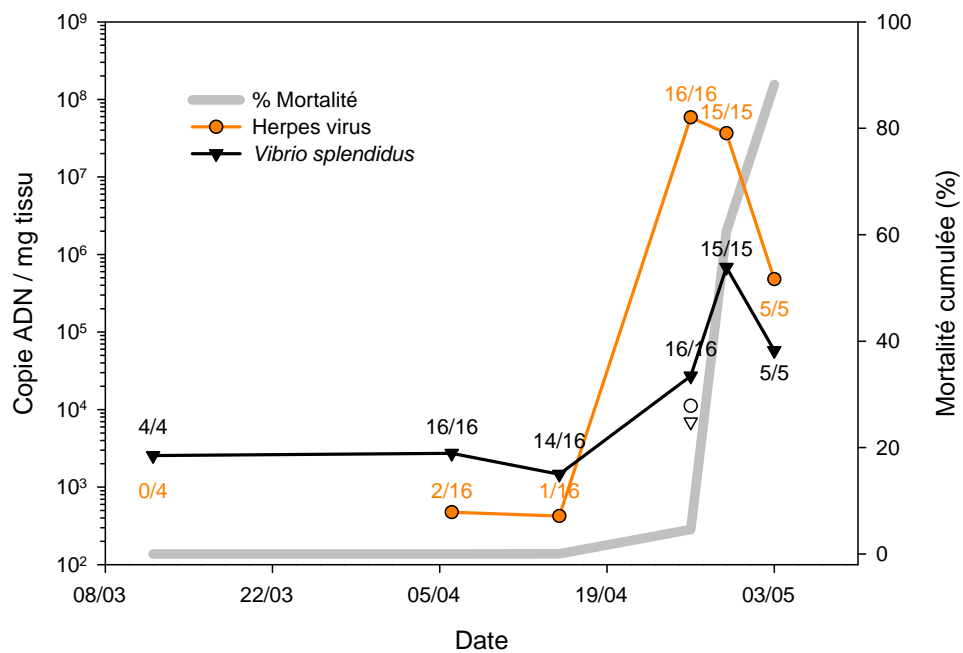


Figure 13. Evolution temporelle de l'infection par le virus Herpes OsHV-I et bactérie *V. splendidus* (axe gauche) dans les tissus d'huîtres creuses maintenues dans l'étang de Thau en 2010, en relation avec la mortalité (axe droit). Les données de portage et de mortalité sont des moyennes calculées sur 4 lots d'huîtres (sélectionnées « résistantes » R et « sensibles » S aux mortalités et des témoins diploïdes et triploïdes) chacun répartis dans 4 pearl nets (n=16). Les fractions indiquent le nombre d'unités positives par rapport au nombre total analysé. Les symboles vides indiquent les valeurs rencontrées dans les huîtres maintenues en mer ouverte exemptes de mortalité le 26 avril.

Bien que les huîtres soient dès le départ positives au *V. splendidus*, les concentrations augmentent de 10^4 à 10^6 cp mg⁻¹ de tissu entre le 15 avril et le 26 avril alors que les mortalités et l'infection par le virus Herpes se déclarent.

Ces résultats suggèrent que le virus Herpes OsHV-I et *V. splendidus* sont impliqués dans la mortalité du naissain d'huître creuse en 2009 et 2010 dans l'étang de Thau, la coinfection pouvant contribuer à amplifier le phénomène. Cependant, la fréquence de détection d'OsHV-I augmente fortement (Fig.13 : de 1/16 à 16/16) juste avant les mortalités et cette évolution précède le phénomène, ce qui n'est pas ici observé pour *V. splendidus*.

La bactérie pathogène de l'huître creuse *Vibrio aestuarianus* n'a pas été détecté dans les échantillons analysés en 2009 et 2010.

4.1.8. Conclusion

Les mortalités d'huîtres creuses touchent spécifiquement le naissain quelles que soient l'origine et la ploïdie, lorsque la température de l'eau atteint 17°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 (Corse), les huîtres maintenues en mer à -22m au large de Marseillan demeurent indemnes en 2009 et en 2010.

L'apparition des mortalités coïncide systématiquement avec la détection de charges élevées en virus Herpes OsHV-I et *Vibrio splendidus* dans le naissain d'huître, suggérant que ces deux agents infectieux sont impliqués dans le phénomène de mortalité printanière. En appui à ce constat, les huîtres maintenues en mer à -22m au large de Marseillan, indemnes de mortalité en 2009 et 2010, présentent en 2010 des prévalences et des portages faibles pour ces deux agents infectieux.

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 diffère des observations faites en 2008 sur Thau ou plus généralement des résultats obtenus dans le cadre du défi Morest où l'apparition des mortalités succédait à l'atteinte de la maturité sexuelle et se situait proche de la période de ponte (Samain & McCombie 2008, Huvet et al. 2010).

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. Les résultats obtenus par voie de modélisation bioénergétique (voir rapport intermédiaire), analyse des réserves énergétiques ou enzymologie vont 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.

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. Il faut toutefois réfléchir à un type d'approvisionnement qui éviterait les mélanges d'origine et de parcours zootechniques. Par exemple, on peut favoriser un ensemencement avec du naissain d'élevage naturel local et/ou résistant, et éviter les mélanges de lots infectés et naïfs qui amplifient le système d'infection.

Bien que les huîtres dites « résistantes » ou (R) présentent les mêmes taux de mortalité que les témoins « sensibles » (S) et non sélectionnés 2n et 3n, la sélection offre des perspectives très intéressantes à moyens termes. Il faut rappeler

que les huîtres R testées dans ce projet ont été sélectionnées d'après leurs performances de survies en 2001 sur un site sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron. Donc, les différences entre les environnements, les pratiques culturelles, et les causes des mortalités du naissain de *C. gigas* entre 2001 et 2009, peuvent expliquer pourquoi les huîtres R n'ont pas présenté un gain de survie par rapport au témoin. Ensuite, les huîtres R et S ont été reproduites jusqu'à obtenir la 6^{ème} génération de reproduction sans aucune pression de sélection supplémentaire car les parents utilisés étaient des animaux n'ayant jamais connu d'épisode de mortalité, le but étant de conserver le différentiel de survie entre les huîtres R et S. Enfin, l'analyse de pedigree faite en 2009 sur les lots R a révélé la contamination de ces lots par des huîtres non sélectionnées, réduisant alors les capacités de résistance de ces huîtres étant donné la forte héritabilité du caractère survie au stade naissain (Dégremont et al. 2007, Dégremont et al. 2010, Dégremont, comm. Pers).

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. Cet aspect sera discuté dans la section suivante.

Les naissains de moule ne sont pas touchés par les mortalités bien que le virus Herpes OsHV-I y ait été détecté en faible quantité. Il est possible que les moules soient des porteurs sains du virus Herpes. Le rôle des moules dans la propagation de l'infection par le virus Herpes et des mortalités d'huîtres creuses est à étudier.

4.2. Effet des conditions d'élevage

Les conditions d'élevage incluent les pratiques d'élevage (période de mise en élevage [saison, âge et taille lors de l'ensemencement] et structures d'élevage) et l'environnement (la température et les sites de cultures).

4.2.1. La période de mise en élevage et l'âge des huîtres

Nous avons suivi l'effet de la période de mise en élevage d'un lot d'huître provenant d'un milieu sain (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau). L'expérience porte sur le lot d'huîtres creuses triploïdes produit en août 2008 (écloserie B), déployé le 18 mars 2009 en mer ouverte au large de Marseillan et maintenu exempt de mortalité. Ces huîtres maintenues en mer ouverte ont été transférées à sept reprises dans l'étang de Thau entre 2009 et 2011, et les mortalités, les agents infectieux et l'état énergétique des huîtres ont été suivis.

Les objectifs de cette expérience sont de :

- ▶ Définir les périodes à risque de mortalité et les agents infectieux en relation avec la température de l'eau.

Existe-t'il des périodes sans mortalité permettant de réaliser un cycle d'élevage en minimisant les pertes ?

- ▶ Savoir si les huîtres deviennent naturellement résistantes avec l'âge, lorsqu'elles ne sont pas exposées à la mortalité.

Peut-on maintenir des huîtres indemnes de mortalité dans des sites « sanctuaires » en première année pour les cultiver dans des milieux à risque de mortalité en seconde année sans pertes importantes ?

Faut-il exposer les huîtres dès leur plus jeune âge aux mortalités afin de sélectionner les individus résistants et limiter la mortalité aux jeunes stades d'élevage, moins coûteux pour l'entreprise ?

4.2.1.1. Mortalité

Les mortalités se produisent systématiquement lorsque la température est comprise entre 17°C et 24°C, quels que soient l'âge des huîtres et la date de transfert dans l'étang de Thau. Il n'y a pas de mortalité significative entre octobre et mai (2009-10 et 2010-11) lorsque la température de l'eau est inférieure à 16-17°C, et entre le 23 juin 2010 et le 9 août 2010 alors que la température de l'eau varie entre 24°C et 28°C. En revanche, lorsque la température de l'eau diminue sous 24°C (23.3°C le 5 août), les mortalités reprennent.

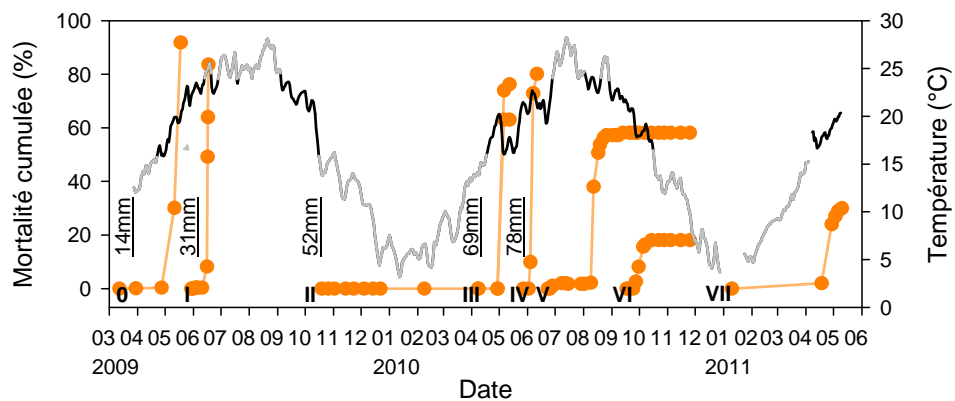


Figure 14. Mortalités cumulées d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction de la date de transfert dans l’étang de Thau en relation avec la température. Les longueurs de coquille des huîtres au moment du transfert sont indiquées sur la figure en mm. Les huîtres transférées après mars 2009 ont été maintenues exemptes de mortalité en mer ouverte au large de Marseillan. La courbe de température en gris indique les valeurs $<17^{\circ}\text{C}$ ou $>24^{\circ}\text{C}$, en noir les températures comprises entre 17°C et 24°C . Les chiffres romains indiquent le n° de transfert.

Il n’a pas été observé de développement de résistance à la mortalité au cours des deux premières années de développement de l’huître en mer ouverte en Méditerranée. En revanche, les huîtres âgées de plus de 2 ans (transferts VI et VII) présentent des mortalités moindres que les huîtres de moins de 2 ans. En parallèle, les huîtres témoins maintenues en mer ouverte ne présentent pas de surmortalité pendant toute la période d’étude.

Suite aux transferts 0 à IV, la mortalité finale est en moyenne de $79\% \pm 11\%$. La mortalité estivale constatée suite au transfert V, lorsque la température de l’eau est proche du seuil haut de non mortalité, est plutôt moindre, et se stabilise à $58\% \pm 15\%$. Suite au transfert VI qui a lieu pendant l’automne 2010, la mortalité est encore moindre ($18\% \pm 14\%$). La stabilisation de la mortalité constatée à partir du 14 octobre 2010 coïncide avec une diminution marquée de la température de l’eau jusqu’à devenir inférieure à 17°C . Enfin, les huîtres transférées dans l’étang de Thau pendant l’hiver 2011 subissent une mortalité modérée de $30\% \pm 2\%$ mi avril, lorsque la température de l’eau franchit 17°C .

4.2.1.2. Pathologie

Les mortalités constatées suite aux transferts 0 à V coïncident avec des charges en virus Herpes $> 10^4$ cp mg^{-1} dans les huîtres (Tableau 3). La bactérie *V. splendidus* est également associée aux événements de mortalité qui font suite aux transferts 0, II à IV et VI (Tableau 3). En d’autres termes, les mortalités observées coïncident avec la détection simultanée de virus Herpes OsHV-I et *V. splendidus* lors des transferts 0, II, III et IV, lorsque la température de l’eau est comprise entre 17°C et 24°C . Les mortalités coïncident avec la détection de virus Herpes sans *V. splendidus* lors des transferts I et V, lorsque la température de l’eau est proche du seuil thermique haut de non mortalité à 24°C . Enfin, la mortalité constatée au cours de l’automne 2010 qui touche seulement 18% des individus lorsque la température de l’eau baisse de façon marquée sous 17°C coïncide avec la détection de *V. splendidus* uniquement. Dans ce dernier cas, le virus Herpes est présent dans seulement 5 individus sur 9 analysés, à des

charges $< 10^4$ cp mg⁻¹ (Tableau 3). Finalement, les huîtres maintenues en mer ouverte exemptes de mortalité présentent des prévalences en virus Herpes très faibles et des charges toujours inférieures à 10^4 cp mg⁻¹ (Tableau 3).

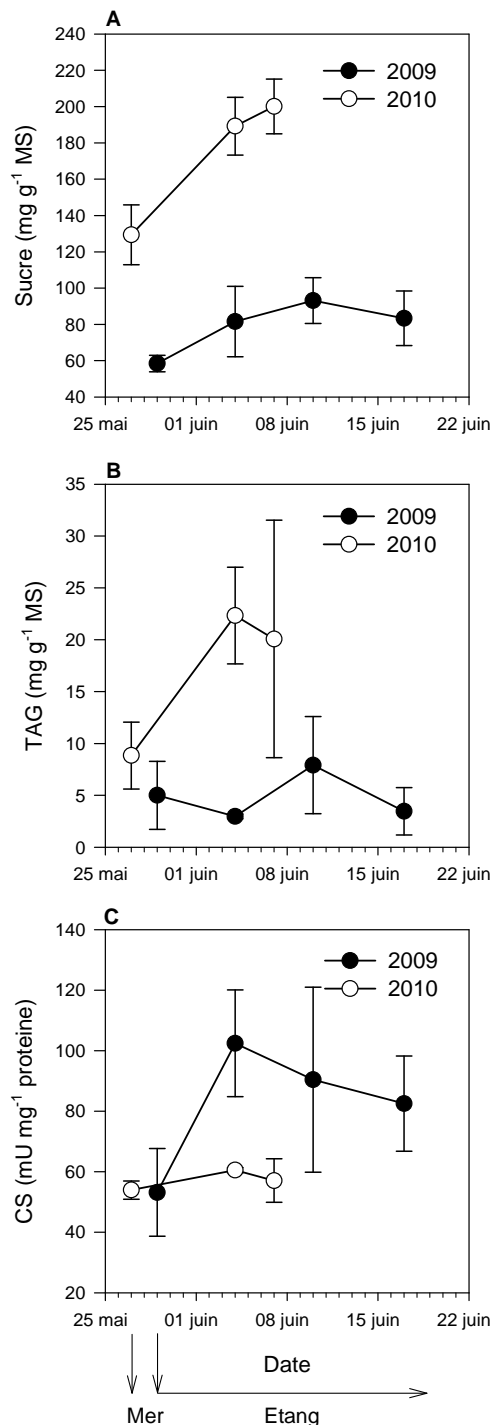
Tableau 3. Détection du *Vibrio splendidus* et du virus Herpes OsHV-I dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars au 29 mai 2009 puis transférées à différentes dates dans l'étang de Thau ou maintenues en mer. Pour les transferts 0 et I, la détection d'agent infectieux porte sur 4 huîtres provenant d'un même panier et groupées ensemble. Pour les transferts II à VI, la détection d'agent infectieux est effectuée au niveau individuel.

N° et date de transfert	Date de prélèvement	Site	<i>Vibrio splendidus</i>		Herpès virus OsHV-I	
			Prévalence [‡]	UFC/mg [§]	Prévalence [‡]	Cp/mg [§]
0	27/04/09	Thau	3/3	$8.1 \cdot 10^0$	1/3	$2.8 \cdot 10^3$
12/03/09	11/05/09	Thau	3/3	$1.0 \cdot 10^4$	3/3	$1.6 \cdot 10^6$
I	29/05/09	Mer	3/3	$1.0 \cdot 10^5$	2/3	$5.3 \cdot 10^2$
29/05/09	04/06/09	Thau	0/2	Nd	2/2	$4.1 \cdot 10^7$
	10/06/09	Thau	0/2	Nd	3/3	$4.4 \cdot 10^7$
	17/06/09	Thau	0/2	Nd	2/2	$2.5 \cdot 10^7$
	17/06/09	Mer	2/2	$2.6 \cdot 10^4$	2/2	$5.7 \cdot 10^3$
II	08/04/10	Thau	0/3	Nd	2/3	$2.7 \cdot 10^2$
19/10/09	28/04/10	Thau	3/3	$3.0 \cdot 10^3$	3/3	$6.1 \cdot 10^6$
	05/05/10	Thau	3/3	$2.0 \cdot 10^3$	3/3	$1.2 \cdot 10^4$
III	28/04/10	Thau	3/3	$6.4 \cdot 10^3$	3/3	$1.1 \cdot 10^6$
08/04/10	05/05/10	Thau	3/3	$4.2 \cdot 10^4$	3/3	$3.8 \cdot 10^5$
	06/05/10	Mer	5/5	$4.2 \cdot 10^3$	0/5	Nd
IV	27/05/10	Mer	6/6	$2.0 \cdot 10^3$	3/6	$6.0 \cdot 10^2$
27/05/10	04/06/10	Thau	8/9	$3.5 \cdot 10^2$	3/9	$9.0 \cdot 10^5$
	07/06/10	Thau	9/9	$3.5 \cdot 10^3$	7/9	$2.7 \cdot 10^6$
	11/06/10	Thau	5/9	$9.1 \cdot 10^2$	6/9	$2.5 \cdot 10^5$
	18/06/10	Mer	6/6	$1.1 \cdot 10^4$	1/6	$3.6 \cdot 10^3$
V	15/07/10	Thau	0/9	Nd	1/9	$7.1 \cdot 10^2$
23/06/10	12/08/10	Thau	0/9	Nd	9/9	$1.0 \cdot 10^7$
	17/08/10	Thau	0/9	Nd	8/9	$3.3 \cdot 10^5$
	19/08/10	Thau	0/9	Nd	7/9	$4.3 \cdot 10^4$
	23/08/10	Thau	0/9	Nd	7/9	$7.0 \cdot 10^3$
VI	17/09/10	Mer	5/6	$1.4 \cdot 10^3$	2/6	$9.9 \cdot 10^2$
17/09/10	30/09/10	Thau	9/9	$1.9 \cdot 10^4$	5/9	$2.4 \cdot 10^3$

[‡] Les prévalences indiquent le nombre d'individus ou paniers (dans le cas des analyses sur des groupes de plusieurs individus) positifs par rapport au nombre total analysé.

[§] Le portage moyen est calculé en tenant compte uniquement des valeurs des individus positifs. Les valeurs de portage en virus Herpes en gras ($> 10^4$ cp mg⁻¹) indiquent la charge seuil au delà de laquelle le virus est considéré comme impliqué dans la mortalité. Nd = non détecté.

4.2.1.3. Energétique



Les concentrations en sucres totaux des huîtres triploïdes maintenues exemptes de mortalité en mer ouverte sont largement supérieures dans les huîtres âgées de 2 ans (2010) par rapport à celles observées dans les huîtres âgées d'un an l'année précédente (2009, Fig. 15A). Les concentrations en sucres dans les huîtres ont tendance à augmenter suite au transfert de la mer ouverte vers l'étang de Thau, particulièrement dans les huîtres âgées de 2 ans comparativement aux huîtres d'un an en 2009. Ces différences de concentrations et de taux d'accumulation des sucres sont probablement le reflet de la condition physiologique accrue des huîtres de deux ans comparativement aux huîtres de 1 an. Ce résultat est en accord avec le fait que sur un cycle annuel, les teneurs en sucres du naissain sont inférieures à celles des adultes (Fig. 12 et Tableau 1).

Comme pour les sucres, les concentrations en TAG des huîtres de deux ans en 2010 sont supérieures à celles des huîtres de 1 an en 2009, confirmant les résultats précédents (Fig. 12 et Tableau 1). Alors que les concentrations en TAG dans les huîtres adultes en 2010 ont tendance à augmenter suite au transfert de la mer ouverte vers l'étang de Thau, ce n'est pas le cas des naissains en 2009.

Figure 15. Concentrations en sucres et en triglycérides (TAG), et activité de l'enzyme citrate synthase (CS) dans les huîtres triploïdes maintenues indemnes de mortalité en mer ouverte depuis le 12 mars 2009 puis transférées dans l'étang de Thau fin mai 2009 et 2010 (transferts I et IV respectivement) en panier australien.

En parallèle, l'activité CS, enzyme associée à la production d'énergie, augmente dans les huîtres âgées d'un an suite au transfert en étang en 2009 et se stabilise en moyenne à 91 U mg⁻¹ protéine, valeur similaire à celle observée sur le naissain dans l'étang de Thau le 27 avril 2009 (Tableau 1). En revanche, l'année suivante, l'activité CS des huîtres âgées de deux ans est peu affectée par le transfert dans l'étang, et demeure inférieure à l'activité mesurée chez les huîtres d'un an transférées dans l'étang de Thau.

D'une part, la production d'énergie des huîtres d'un an est supérieure à celle des huîtres de deux ans alors que leurs réserves énergétiques sont moindres. D'autre part, le transfert des huîtres de la mer ouverte, où aucune mortalité n'est constatée, vers l'étang de Thau, où les mortalités se déclarent (Fig. 14), conduit à une augmentation des réserves énergétiques, particulièrement marquée chez les huîtres de 2 ans comparativement aux huîtres âgées d'un an. Les mortalités suites aux transferts dans l'étang de Thau sont similaires chez les huîtres âgées de 1 et 2 ans malgré des différences énergétiques marquées. Par conséquent, la supériorité énergétique des huîtres de deux ans comparativement aux huîtres âgées d'un an ne procure aucun avantage en terme de survie et de résistance aux agents infectieux.

4.2.1.4. Conclusion

Les mortalités se produisent lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. En dehors de cette fenêtre thermique, les huîtres ne meurent pas. La mortalité des huîtres âgées de plus d'un an, protégées du risque de mortalité en mer ouverte, est similaire à celle des mêmes huîtres âgées de moins d'un an. Par conséquent, quelles que soient l'âge et la taille des huîtres à la date du transfert dans l'étang de Thau, elles restent exposées aux mortalités. Nous n'avons pas observé de mise en place de résistance aux mortalités au cours du développement des huîtres pendant les 2 premières années en Méditerranée.

Les quatre évènements de mortalités printanières (température comprise entre 17°C et 21°C) étudiés en 2009 et 2010 coïncident toujours avec une augmentation massive des charges en virus Herpes OsHV-I et en bactérie *V. splendidus*. En revanche les deux évènements de mortalité estivale (température proche de 24°C) coïncident avec une augmentation des charges en Herpes uniquement. Enfin, la mortalité automnale (température proche de 17°C) coïncide avec la détection de *V. splendidus* uniquement. Par conséquent, l'implication des agents infectieux étudiés semble changer en fonction de la saison (et de l'âge des individus), bien que les mortalités demeurent.

Les mortalités suites aux transferts dans l'étang de Thau sont similaires chez les huîtres âgées de 1 an et 2 ans, malgré des différences énergétiques marquées. Par conséquent, la supériorité énergétique des huîtres de 2 ans comparativement aux huîtres âgées d'un an ne procure aucun avantage en terme de survie et de résistance aux agents infectieux. L'hypothèse selon laquelle les différences de mortalité entre naissains et adultes reflètent un déficit énergétique chez le naissain comparativement aux adultes (section 4.2.7) est donc peu probable. Les différences de survie entre naissains et adultes reflètent plus vraisemblablement l'effet de la sélection qui a lieu lors de la première année : les huîtres survivantes en première année n'expriment pas de mortalité en deuxième année.

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. Cependant, il faut tenir compte du risque associé au maintien d'animaux indemnes de mortalité : ces huîtres non sélectionnées subiront une mortalité équivalente à celle qui aurait été

constatée en première année dès que la température de l'eau atteint 17°C dans un milieu à risque. En Atlantique, il est également possible de préserver les huîtres des mortalités en mer ouverte à 26m de profondeur, mais dès que ces huîtres sont transférées sur estran, elles présentent des mortalités importantes (Cochennec-Laureau et al. 2011). Dans ces deux expériences, la protection d'un lot vis à vis des mortalités en année n ne permet pas en année $n+1$ de le préserver indemne.

4.2.2. La période de mise en élevage et la ploïdie

Nous avons suivi l'effet de la période de mise en élevage d'huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3n) d'un milieu sain (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau). L'expérience porte sur des lots 2n et 3n produits en août 2009 (Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade, Ifremer), déployés le 18 mars 2010 en mer ouverte au large de Marseillan et maintenus exempt de mortalité. Ces huîtres ont été transférées à trois reprises dans l'étang de Thau en 2010, et les mortalités, les agents infectieux et l'état énergétique ont été suivis.

Les objectifs de cette expérience sont de confirmer les résultats obtenus suite aux transferts d'huîtres 3n maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau en 2009 et 2010 (voir section précédente) et :

- Examiner l'interaction possible entre la ploïdie et la date de transfert dans l'étang de Thau sur la mortalité en relation avec la présence d'agents infectieux et l'énergétique.

4.2.2.1. Mortalité

Les huîtres 2n et 3n déployées dans l'étang de Thau en mars 2010 sont mortes à 94% ± 5% début mai alors que les mêmes lots maintenus en mer ouverte ne présentent pas de mortalité (Fig. 16 et section 4.2.1). Tel qu'observé lors des transferts d'huîtres maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau en 2009 et 2010 (Fig. 14), les mortalités d'huîtres 2n et 3n se produisent lorsque la température est comprise entre 17°C et 24°C, quels que soient l'âge des huîtres et la date du transfert dans l'étang de Thau. Également, il n'y a pas de mortalité significative entre le 23 juin 2010 et le 9 août 2010 alors que la température de l'eau varie entre 24°C et 28°C. En revanche, lorsque la température de l'eau diminue sous 24°C, les mortalités reprennent.

Les mortalités printanières en mai et juin touchent indistinctement les huîtres 2n et 3n dans des proportions qui varient entre 80% et 100%. En revanche, les mortalités estivales sont moindres que celles enregistrées au printemps, peut-être reflétant que les températures estivales oscillent autour de 24°C, le seuil haut de non mortalité. Par ailleurs, les mortalités estivales du lot d'huîtres 3n sont moindres (27% et 57%) que celles du lot d'huîtres 2n qui atteignent 62% et 84% suite aux transferts II et III respectivement.

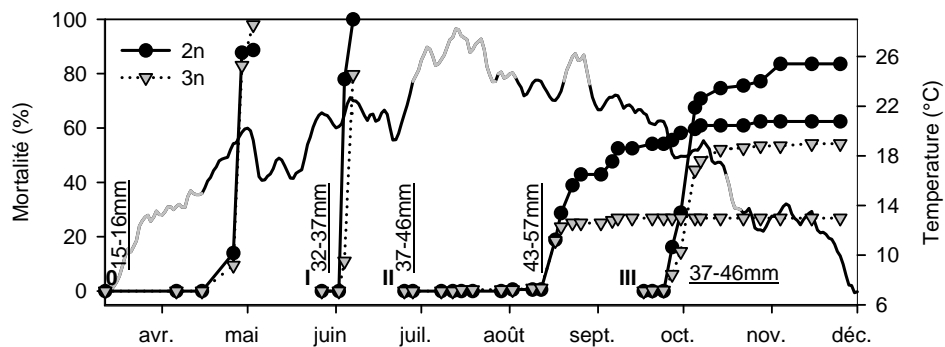


Figure 16. Mortalités cumulées d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* diploïde (2n) et triploïdes (3n) en fonction de la date de transfert dans l’étang de Thau en 2010 en relation avec la température. Les longueurs de coquille des huîtres au moment du transfert sont indiquées sur la figure en mm. Les huîtres transférées après mars 2010 ont été maintenues exemptes de mortalité en mer ouverte au large de Marseillan. La courbe de température en gris indique les valeurs <17°C ou >24°C, en noir les températures comprises entre 17°C et 24°C.

4.2.2.2. Pathologie

Les mortalités d’huîtres 2n et 3n coïncident avec la détection simultanée de virus Herpes OsHV-I et *V. splendidus* lors des transferts 0 et III, lorsque la température de l’eau est comprise entre 17°C et 24°C. En revanche, lors du transfert II, les mortalités correspondent avec la détection de virus sans *V. splendidus* alors que la température de l’eau est proche de 24°C, le seuil thermique haut de « non mortalité ».

Suite aux transferts II et III, les mortalités constatées sur le lot d’huître 2n sont près de 2 fois supérieures à celles constatées sur le lot d’huître 3n. Ce différentiel de mortalité suite au transfert II coïncide avec le fait que le lot d’huîtres 3n présentent des charges virales maximales ($1.9 \cdot 10^6$ cp mg^{-1}) nettement inférieure à celles observées dans le lot d’huîtres 2n ($5.0 \cdot 10^7$ cp mg^{-1}) le 12 août juste avant le démarrage des mortalités (Tableau 4, Fig. 17). D’autre part, la charge virale des huîtres issues du lot 3n diminue plus rapidement après l’atteinte du maximum que celle des huîtres provenant du lot 2n, au point de devenir inférieure au seuil de morbidité dès le 23 août chez les 3n.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Dégremont (2011) qui met en évidence (1) des corrélations positives fortes entre les charges virales et les mortalités d’huîtres, (2) des charges virales maximales moindres chez les huîtres résistantes aux mortalités comparativement aux huîtres plus sensibles et (3) une capacité d’élimination plus rapide du virus chez les huîtres résistantes aux mortalités comparativement aux huîtres plus sensibles.

Il est possible que les huîtres 3n utilisées dans cette étude présentent un caractère « R » comparativement aux huîtres 2n, confondu avec la ploïdie. En d’autres termes, les différences observées entre les huîtres 3n et 2n ne peuvent être attribuées seulement à la ploïdie, ce facteur étant confondu avec les caractéristiques génétiques des lots utilisés qui sont différents. Pour s’affranchir de ces potentiels effets confondus, il faut répliquer l’effet ploïdie (utiliser plusieurs lots 3n et 2n) comme nous l’avons fait dans le cadre du suivi de la cinétique des mortalités en 2009 (voir section 4.2.1).

Tableau 4. Détection du *Vibrio splendidus* et du virus Herpes OsHV-I dans les huîtres 2n et 3n déployées en mer ouverte du 12 mars au 27 mai 2010 puis transférées à plusieurs reprises dans l'étang de Thau ou maintenues en mer. Pour les transferts 0 et II, la détection d'agent infectieux porte sur 6 huîtres provenant d'un même panier et groupées ensemble (n=2 ou 4 paniers). Pour le transfert III, la détection d'agent infectieux est effectuée au niveau individuel sur 3 huîtres par panier (n=3 paniers).

N° et date de transfert	Date de prélèvement	Site	Lot	<i>Vibrio splendidus</i>		Herpès virus OsHV-I	
				Prévalence [‡]	UFC/mg [§]	Prévalence [‡]	Cp/mg [§]
0 12/03/10	15/04/10	Thau	2n	3/4	1.2•10 ³	0/4	Nd
			3n	3/4	8.1•10 ¹	0/4	Nd
	26/04/10	Thau	2n	4/4	2.2•10 ⁴	4/4	1.2•10⁸
			3n	4/4	2.0•10 ⁴	4/4	3.2•10⁷
29/04/10	Thau	2n	3/4	7.4•10 ⁵	3/4	5.0•10⁷	
		3n	4/3	5.3•10 ⁵	4/4	3.3•10⁷	
II 23/06/10	15/07/10	Thau	2n	0/2	Nd	0/2	Nd
			3n	0/2	Nd	1/2	2.7•10 ²
	12/08/10	Thau	2n	0/2	Nd	2/2	5.0•10⁷
			3n	0/2	Nd	2/2	1.9•10⁶
	17/08/10	Thau	2n	0/2	Nd	2/2	1.7•10⁷
			3n	0/2	Nd	2/2	1.1•10⁷
19/08/10	Thau	2n	0/2	Nd	2/2	4.7•10⁶	
		3n	0/2	Nd	2/2	3.8•10⁴	
23/08/10	Thau	2n	0/2	Nd	2/2	1.5•10⁶	
		3n	0/2	Nd	1/2	2.7•10 ³	
III 17/09/10	17/09/10	Mer	2n	3/3	8.3•10 ²	3/3	7.3•10 ³
			3n	3/3	2.1•10 ³	3/3	1.1•10 ³
	30/09/10	Thau	2n	6/9	2.3•10 ⁴	9/9	1.5•10⁷
			3n	1/9	6.2•10 ²	9/9	1.8•10⁷

[‡] Les prévalences indiquent le nombre d'individus ou paniers (dans le cas des analyses sur des groupes de plusieurs individus) positifs par rapport au nombre total analysé.

[§] Le portage moyen est calculé en tenant compte uniquement des valeurs des individus positifs. Les valeurs de portage en virus Herpes en gras (> 10⁴ cp mg⁻¹) indiquent la charge seuil au delà de laquelle le virus est considéré comme impliqué dans la mortalité. Nd = non détecté.

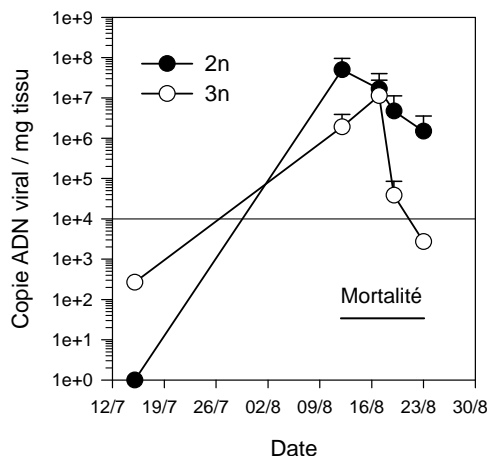
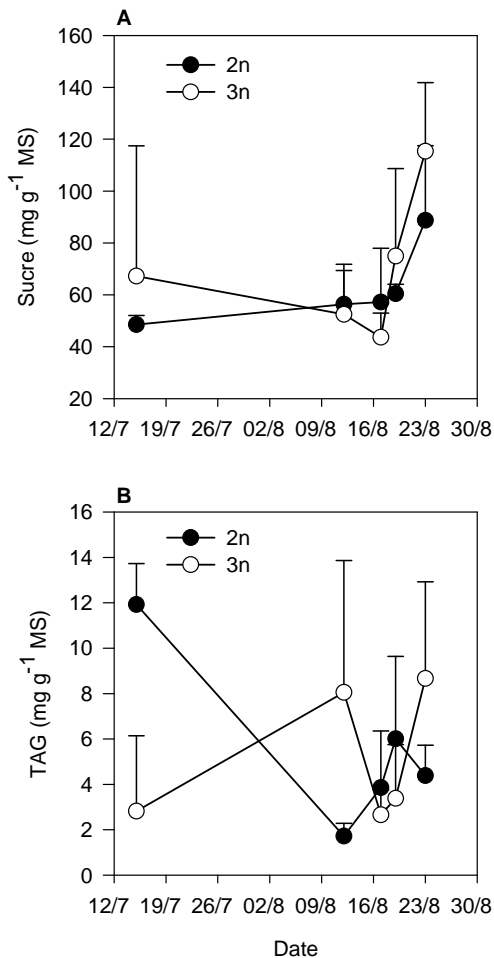


Figure 17. Détection du virus Herpes OsHV-I dans les huîtres 2n et 3n déployées en mer ouverte du 12 mars 2010 au 23 juin 2010 puis transférées dans l'étang de Thau. La ligne de référence = 10⁴ indique la charge virale seuil au delà de laquelle le virus Herpes est considéré comme impliqué dans le processus morbide.

4.2.2.3. Energétique



Les concentrations en sucre et en TAG dans les huîtres 2n sont similaires à celles observées dans les huîtres 3n (Fig. 18). Le différentiel de survie observé entre les huîtres 2n et 3n suite au transfert II ne s'explique pas par des différences de réserves énergétiques mais plutôt par la ploïdie ou le bagage génétique des lots.

Figure 18. Concentrations en sucres et en triglycérides (TAG) dans les huîtres 2n et 3n déployées en mer ouverte du 12 mars 2010 au 23 juin 2010 puis transférées dans l'étang de Thau.

4.2.2.4. Conclusion

Les transferts d'huîtres 2n et 3n de la mer ouverte (milieu sain) vers l'étang de Thau (milieu à risque de mortalité) en 2010 confirment plusieurs résultats obtenus suite aux transferts d'huîtres 3n maintenues en mer ouverte vers l'étang de Thau en 2009 et 2010. Notamment, les mortalités se produisent lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C quels que soient la saison, l'âge ou la taille des huîtres. Par ailleurs, les mortalités printanières coïncident avec une augmentation massive des charges en virus Herpes OsHV-I et en bactérie *V. splendidus* alors que les mortalités estivales coïncident avec une augmentation des charges en Herpes uniquement.

En plus, cette expérience montre que l'effet du lot sur la mortalité interagit avec la saison: la mortalité des individus issus du lot 2n égale celle du lot 3n en période printanière, alors qu'en été, la mortalité du lot 3n est 2 fois inférieure à celle du lot 2n.

Ces différences de mortalité pourraient refléter directement l'effet de la stérilité des individus 3n qui procure un avantage énergétique par rapport au 2n en période de reproduction. Les coûts énergétiques associés à la reproduction sont supérieurs chez les huîtres 2n comparativement aux huîtres 3n, laissant plus d'énergie disponible pour les autres activités (défense par exemple). L'analyse en histologie quantitative des tissus des huîtres 2n prélevées en mer le 27 mai 2010, montre que l'occupation gonadique est quasi-nulle (données non montrées), de sorte que les individus 2n sont similaires aux 3n

du point de vue du développement gonadique, ce qui expliquerait que la sensibilité à la mortalité entre les deux lots soit équivalente. En revanche, le 12 août 2010, 6 semaines après le transfert II dans l'étang de Thau à des températures $>24^{\circ}\text{C}$, les huîtres 2n ont probablement investi massivement dans la reproduction, contrairement aux huîtres 3n qui sont restées stériles. Par conséquent, lorsque la mortalité s'exprime après le 12 août, les individus 2n sont probablement dans un état reproducteur avancé par rapport aux individus 3n, pouvant expliquer le différentiel de survie observé entre 2n et 3n.

Les différences de survie observées entre les huîtres 2n et 3n ne peuvent être attribuées seulement à la ploïdie, ce facteur étant confondu avec les caractéristiques génétiques des lots utilisés qui sont différents. Pour s'affranchir de ces potentiels effets confondus, il faut répliquer l'effet ploïdie (utiliser plusieurs lots 2n et 3n) comme nous l'avons fait dans le cadre du suivi de la cinétique des mortalités en 2009 (voir section 4.2.1). Il est possible que les huîtres 3n utilisées dans cette étude présentent un caractère « R » comparativement aux huîtres 2n qui seraient plus sensibles. Il demeure cependant que l'effet du lot (2n vs. 3n) sur la mortalité varie en fonction de la saison et que cela peut refléter des différences d'effort reproducteur.

Les concentrations en réserves énergétiques (sucres et TAG) sont similaires entre les lots d'huîtres 2n et 3n, de sorte que ces variables n'expliquent pas les différences de survie observées entre ces deux lots. Seuls l'effort reproducteur et le bagage génétique, qui diffèrent entre ces lots, semblent pouvoir expliquer les différences de survie constatées entre 2n et 3n.

4.2.3. Les pratiques d'élevage

Nous avons suivi l'effet du type d'élevage (paniers australiens vs cordes) et de la localisation (dans vs hors secteur conchylicole) lors du transfert d'un lot d'huître provenant d'un milieu sain (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau). L'expérience porte sur le lot d'huîtres creuses triploïdes produit en août 2008 (écloserie B), déployé le 18 mars 2009 en mer ouverte au large de Marseillan et maintenu exempt de mortalité. Ces huîtres maintenues en mer ouverte ont été transférées le 27 mai 2009 sur la table Ifremer dans la zone de Marseillan en paniers australiens et sur cordes, et au large du secteur conchylicole en panier. Les mortalités, les agents infectieux et l'état énergétique des huîtres ont été suivis.

Les objectifs de cette expérience sont de :

- ▶ Examiner l'effet des pratiques culturelles (panier australien vs. sur corde) sur la mortalité, la présence d'agents infectieux et l'état énergétique des huîtres.

Est-il possible d'influencer les mortalités en fonction des pratiques d'élevage ?

Les pratiques d'élevage ont-elles une influence sur la détection d'agents infectieux et l'état énergétique des huîtres ?

- ▶ Examiner l'effet de la localisation dans l'étang de Thau (effet intra bassin) et plus particulièrement, de la proximité de zones cultivées (dans vs hors secteur conchylicole).

Les mortalités sont-elles propres aux secteurs cultivés où les densités d'hôtes sont fortes ?

Peut-on envisager des zones « coupe feux » pour contenir les démarrages de mortalité et leur propagation ?

4.2.3.1. Mortalité

Entre le 27 mai et le 11 juin, la mortalité des huîtres en paniers australiens sur table est de ~80% contre seulement ~10% pour les huîtres sur cordes (Fig. 19). Les huîtres maintenues en paniers au large du secteur conchylicole hors table ne présentent pas de mortalité pendant cette période. Les pratiques culturales peuvent donc influencer la mortalité.

Suite au transfert V le 23 juin au cours duquel des huîtres de même origine ont été mises en paniers sur table, il n'y a pas de mortalité significative jusqu'au 9 août, alors que la température de l'eau est $>24^{\circ}\text{C}$ jusqu'au 5 août. En revanche, lorsque la température de l'eau diminue sous 24°C , les mortalités reprennent, touchant les huîtres en paniers sur table, ainsi que les huîtres en paniers au large (57% et 65% de mortalité respectivement), et, dans une moindre mesure, les huîtres sur cordes (+~20% entre le 9 août et le 23 août soit 30% au total depuis le 27 mai).

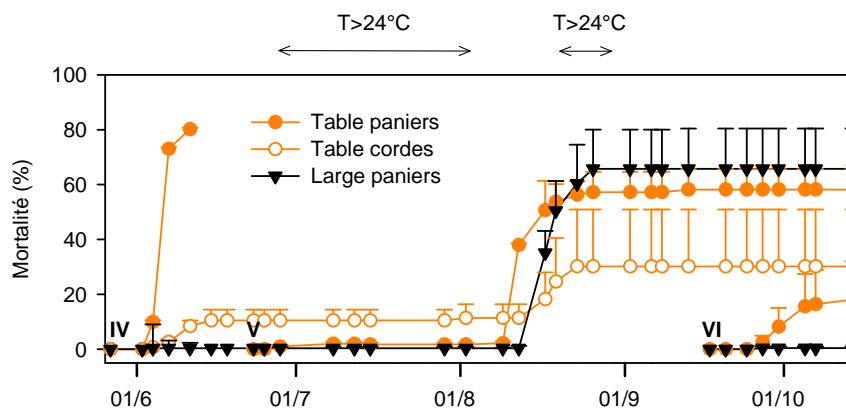


Figure 19. Mortalités cumulées d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en fonction de la pratique d'élevage et de la localisation dans l'étang de Thau (moyenne \pm EC, $n=3$). L'expérience porte sur un lot d'huîtres creuses triploïdes produit par un éclosier privé en août 2008 et déployé le 18 mars 2009 en mer ouverte au large de Marseillan. Les huîtres transférées de la mer ouverte dans l'étang de Thau le 27 mai 2010 (IV) ont été mises en culture sur table en paniers ou en cordes, et hors table en paniers au large du secteur conchylicole de Marseillan. Les huîtres transférées le 23 juin (V) ont été maintenues en paniers dans les tables pour être comparées avec les survivantes du transfert IV sur cordes et en paniers au large. Les animaux transférés le 17 septembre (VI) ont été mis en culture en paniers sur table et au large.

Les mortalités au large du secteur conchylicole, constatées le 17 août, suivent de quelques jours les mortalités constatées sur la table Ifremer (12 août) et coïncident avec des courants forts ($>30 \text{ cm s}^{-1}$) provenant du secteur conchylicole (direction 95°) qui ont sévis entre le 8 août et le 11 août (Fig. 20). La propagation des mortalités du secteur conchylicole vers le large semble donc dépendre de l'hydrodynamique. Des événements hydrodynamiques similaires se sont produits fin juin, mi-juillet et fin juillet sans occasionner de mortalité au large alors que la température était supérieure ou égale 24°C (Fig. 20). Par conséquent, la mortalité des huîtres au large serait le produit de l'interaction température et hydrodynamique.

Enfin, suite au transfert VI le 17 septembre au cours duquel des huîtres de même origine ont été mises en culture en paniers australiens sur table et au large, la mortalité touche seulement 18% du lot dans les tables (voir 4.3.1.1), contre 0% hors table, le 15 octobre lorsque la température devient inférieure à 17°C et que les mortalités sont stabilisées.

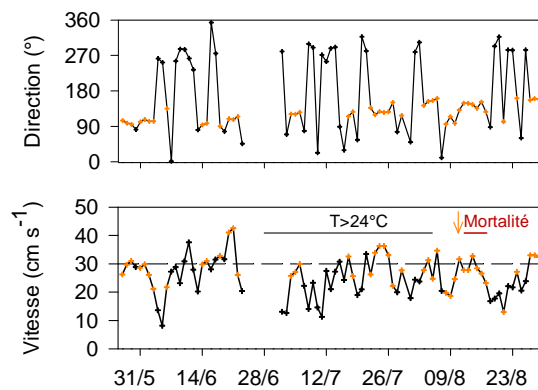


Figure 20. Direction et vitesse des courants mesurés sous la table Ifremer dans la zone de Marseillan dans l'étang de Thau en fonction du temps. Les points orange indiquent les directions comprises entre 90° et 170° correspondant à une circulation des masses d'eau des tables conchylicoles vers le large.

4.2.3.2. Pathologie

Les huîtres maintenues au large du secteur conchylicole de Marseillan dans l'étang de Thau en paniers australiens qui ne font état d'aucune mortalité entre le 27 mai et le 7 juin présentent une faible proportion d'individus infectés par le virus Herpes (Tableau 5). Par ailleurs, les quelques individus infectés présentent des charges virales très faibles. En revanche, les huîtres maintenues en paniers sur table, dans lesquels les mortalités atteignent $\sim 80\%$, sont progressivement et quasiment toutes infectées par le virus Herpes entre le 27 mai et le 7 juin, et les charges sont suffisamment élevées pour que le virus soit considéré comme impliqué dans la mortalité des huîtres. Enfin, les huîtres maintenues en table sur cordes qui présentent des mortalités significatives mais faibles ($\sim 10\%$) sont progressivement toutes infectées par le virus et présentent des charges virales aussi élevées que les huîtres maintenues en panier qui meurent massivement. Par conséquent, la présence de mortalité coïncide toujours avec des charges virales en Herpes $>10^4 \text{ cp ADN mg}^{-1}$. Toutefois, que la mortalité soit forte ($\sim 80\%$ en paniers) ou faible ($\sim 10\%$ sur cordes), les charges virales sont similaires, de sorte que l'intensité de la mortalité semble dépendre d'un autre facteur que la charge virale. La bactérie *V. splendidus* pourrait en partie expliquer ce différentiel de mortalité puisque le 4 juin et le 7 juin, lorsque la mortalité s'exprime, les prévalences et les charges bactériennes sont plutôt moindres dans les huîtres sur cordes comparativement à celles en paniers (Tableau 5). Cependant, *V. splendidus* est toujours détecté.

Tableau 5. Détection du *Vibrio splendidus* et du virus Herpes OsHV-I dans les huîtres triploïdes déployées en mer ouverte du 12 mars 2009 au 27 mai 2010 puis transférées à différentes dates dans l'étang de Thau en fonction de la pratique d'élevage et de la localisation dans l'étang de Thau, ou maintenues en mer. La détection d'agent infectieux est effectuée au niveau individuel.

N° et date de transfert	Date de prélèvement	Site	Culture	<i>Vibrio splendidus</i>		Herpès virus OsHV-I	
				Prévalence [‡]	UFC/mg [§]	Prévalence [‡]	Cp/mg [§]
IV 27/05/10	27/05/10	Mer		6/6	2.0•10 ³	3/6	6.0•10 ²
	04/06/10			8/9	3.5•10 ²	3/9	9.0•10 ⁵
	07/06/10	Thau Table	Panier	9/9	3.5•10 ³	7/9	2.7•10 ⁶
	11/06/10			5/9	9.1•10 ²	6/9	2.5•10 ⁵
	04/06/10			7/9	1.3•10 ²	4/9	1.7•10 ⁶
	07/06/10	Thau Table	Corde	5/9	1.9•10 ²	9/9	5.4•10 ⁶
	11/06/10			5/9	1.0•10 ³	1/9	6.2•10 ²
	04/06/10			7/9	6.6•10 ²	3/9	1.6•10 ²
	07/06/10	Thau Large	Panier	8/9	7.0•10 ¹	4/9	4.0•10 ²
	11/06/10			7/9	4.3•10 ²	1/9	1.3•10 ³
	18/06/10	Mer		6/6	1.1•10 ⁴	1/6	3.6•10 ³
V 23/06/10	15/07/10			0/9	Nd	1/9	7.1•10 ²
	12/08/10			0/9	Nd	9/9	1.0•10 ⁷
	17/08/10	Thau Table	Panier	0/9	Nd	8/9	3.3•10 ⁵
	19/08/10			0/9	Nd	7/9	4.3•10 ⁴
	23/08/10			0/9	Nd	7/9	7.0•10 ³
IV 27/05/10	15/07/10			0/9	Nd	0/9	Nd
	12/08/10			0/9	Nd	0/9	Nd
	17/08/10	Thau Table	Corde	0/9	Nd	5/9	2.0•10 ³
	19/08/10			0/9	Nd	1/6	5.2•10 ²
	23/08/10			Nd	Nd	Nd	Nd
	15/07/10			0/9	Nd	2/9	5.8•10 ³
	12/08/10			0/9	Nd	7/9	7.4•10 ⁵
	17/08/10	Thau Large	Panier	0/9	Nd	9/9	2.2•10 ⁶
	19/08/10			0/9	Nd	9/9	9.0•10 ⁵
	23/08/10			0/9	Nd	6/9	2.0•10 ⁵
VI 17/09/10	17/09/10	Mer		5/6	1.4•10 ³	2/6	9.9•10 ²
	30/09/10	Thau Table	Panier	9/9	1.9•10 ⁴	5/9	2.4•10 ³
	30/09/10	Thau Large	Panier	2/9	3.4•10 ²	1/9	9.2•10 ²

[‡] Les prévalences indiquent le nombre d'individus positifs par rapport au nombre total analysé.

[§] Le portage moyen est calculé en tenant compte uniquement des valeurs des individus positifs. Les valeurs de portage en virus Herpes en gras (> 10⁴ cp mg⁻¹) indiquent la charge seuil au delà de laquelle le virus est considéré comme impliqué dans la mortalité. Nd = non détecté.

Les huîtres maintenues sur cordes qui subissent un second épisode de mortalité modéré (+20%) à partir du 12 août présentent une prévalence et un portage en virus Herpes remarquablement faible, ce dernier étant sous le seuil généralement accepté de

morbidité de 10^4 cp ADN mg^{-1} (Tableau 5). Au même moment, les huîtres maintenues en paniers australiens (sur table conchylicole et au large dans l'étang de Thau depuis le 23 juin) qui présentent des mortalités $\sim 60\%$ ont un portage en virus Herpes largement supérieur à 10^4 cp ADN mg^{-1} pour la totalité des individus analysés à un moment donné. A cette période, *V. splendidus* n'est pas détecté dans les huîtres.

La propagation des mortalités du secteur conchylicole vers le large constatée entre le 9 août et le 17 août coïncide parfaitement avec la dynamique de l'infection par le virus Herpes (Tableau 5, Fig. 21). En effet, les maxima de charges virales dans les huîtres sont atteints le 12 août dans la zone d'élevage et le 17 août au large.

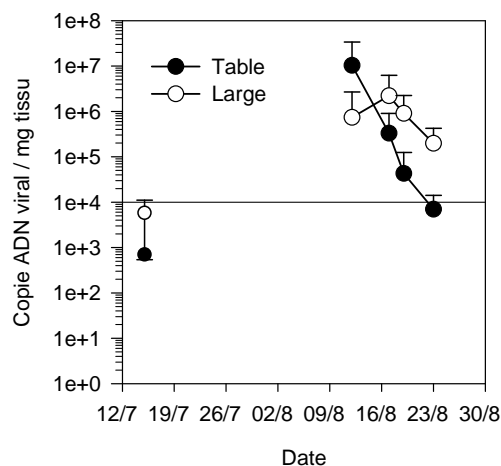


Figure 21. Détection du virus Herpes OsHV-I dans les huîtres 3n maintenues en mer ouverte depuis le 12 mars 2009 puis transférées dans l'étang de Thau sur table conchylicole à Marseillan le 23 juin 2010 et au large le 27 mai 2010. La ligne de référence = 10^4 indique la charge virale seuil au delà de laquelle le virus Herpes est considéré comme impliqué dans le processus morbide.

Enfin, les huîtres transférées en septembre 2010 en paniers australiens sur table conchylicole, qui présentent des mortalités modérées de 18%, présentent un portage en virus Herpes légèrement inférieur à 10^4 cp ADN mg^{-1} et touche seulement la moitié des animaux analysés. Par ailleurs, le virus Herpes n'est quasiment pas détecté dans les huîtres transférées au même moment au large du secteur conchylicole (Tableau 5). En revanche, l'ADN de *V. splendidus* est toujours détecté en quantité importante dans les huîtres prélevées sur table alors qu'au large du secteur conchylicole, la détection est plutôt rare et faible. Le différentiel de mortalité entre les huîtres maintenues dans et hors du secteur conchylicole coïncide avec des différences en prévalences et en charges à la fois du virus Herpes et de *V. splendidus*.

4.2.3.3. Energétique

Les réserves énergétiques (sucres et en TAG) sont plus élevées dans les huîtres maintenues sur cordes comparativement aux animaux maintenus en paniers (Fig. 22A et B), alors que c'est l'inverse pour l'activité de la CS qui est généralement corrélée avec la respiration et la production d'énergie chez les bivalves (Fig. 22C). Ces résultats suggèrent que la condition physiologique des huîtres sur cordes est meilleure que celle des huîtres en paniers puisqu'elles disposent de plus de réserves et produisent moins d'énergie. La faible mortalité des huîtres infectées par le virus Herpes sur cordes (10%) comparativement aux huîtres infectées en paniers (80%) pourrait refléter une condition physiologique accrue chez les huîtres sur cordes.

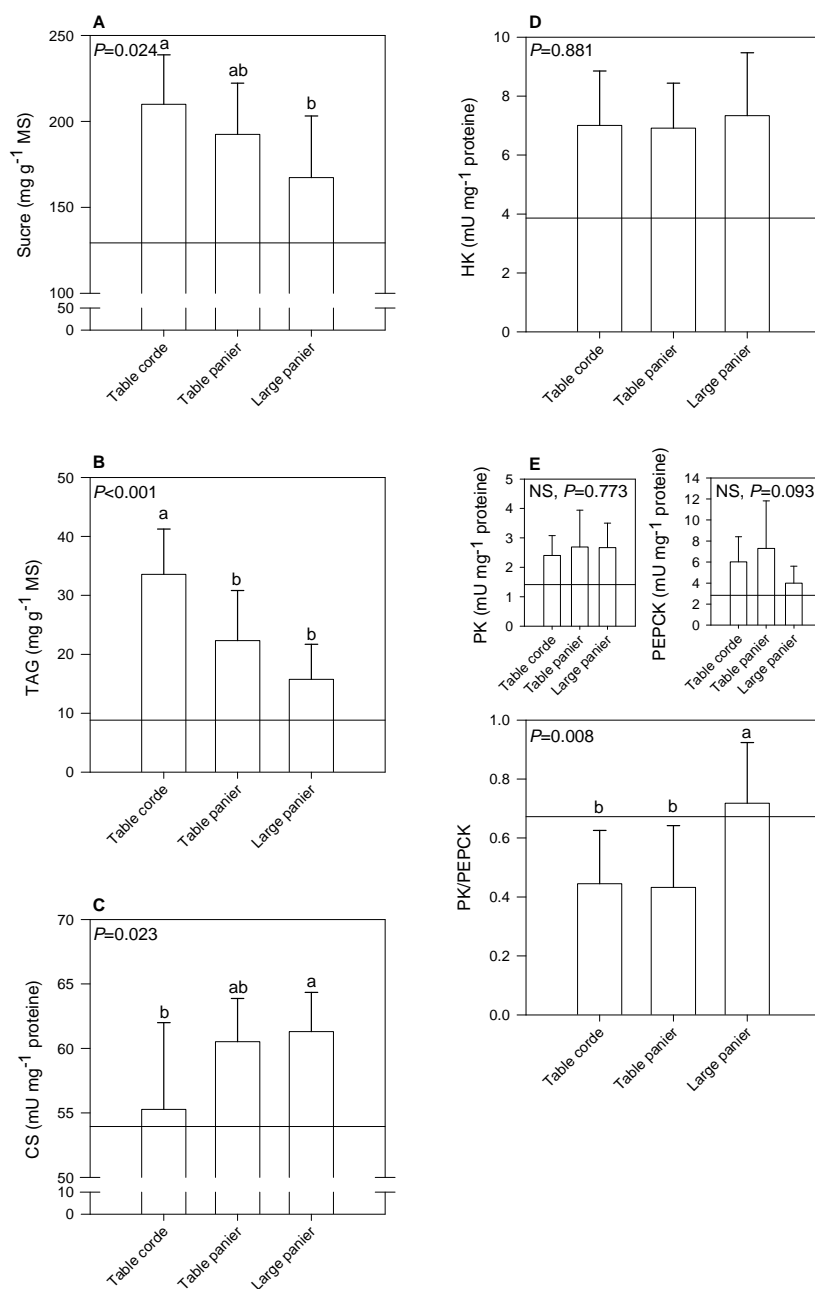


Figure 22. Concentration en sucres et en triglycérides (TAG), activités des enzymes citrate synthase (CS), hexokinase (HK), pyruvate-kinase (PK) et phospho-énolpyruvate-carboxykinase (PEPCK) et ratio PK/PEPCK d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* prélevées le 4 juin 2010 suite au transfert de la mer ouverte dans l'étang de Thau le 27 mai 2010, en fonction de la pratique d'élevage et de la localisation (moyenne \pm EC, n=9). L'expérience porte sur un lot d'huîtres creuses triploïdes produit en août 2008 et déployé le 18 mars 2009 en mer ouverte au large de Marseillan. Ces huîtres ont été mises en culture sur table en paniers ou en cordes, et hors table en paniers au large du secteur conchylicole de Marseillan. La ligne de référence indique les valeurs de chaque variable mesurée sur les huîtres prélevées en mer avant le transfert dans l'étang de Thau le 27 mai. Les lettres différentes indiquent les différences significatives (ANOVA, $P < 0.05$).

Les activités des enzymes clés de la glycolyse (HK et PK) et de la néoglucogenèse (PEPCK) des huîtres sont similaires, quelles que soient les pratiques d'élevage et la localisation dans l'étang de Thau (Fig. 22D et E). En revanche, le rapport PK/PEPCK des huîtres non infectées au large du secteur conchylicole est ~1.7 fois supérieure à celui des huîtres déployées sur table conchylicole qui sont infectées par le virus Herpes (Fig. 22E). Par conséquent, il semble que la présence d'agents infectieux, et notamment de virus Herpes, dans les huîtres maintenues sur table conchylicole influence le métabolisme des sucres en faveur de la néoglucogenèse qui tend à produire du glucose à partir de substrats non glucidiques. Ces résultats coïncident d'ailleurs avec des teneurs en sucres plus élevées dans les huîtres infectées sur table conchylicole comparativement aux animaux non infectés déployés au large (Fig. 22A).

Toutefois, l'analyse plus poussée des paramètres énergétiques des huîtres en fonction de la présence d'agents infectieux (quelles que soient les modalités d'élevage et les dates de prélèvement), suggère que la présence de virus Herpes, seul ou en mélange, n'a pas d'effet (Tableau 6). En revanche, les huîtres dans lesquelles la bactérie *V. splendidus* est détectée présentent des niveaux plus faibles de sucre et, dans une moindre mesure (différences presque significatives), d'activité PK, que les huîtres non infectées et que les huîtres infectées par le virus Herpes, seul ou en mélange. Il est possible que les huîtres utilisent leurs réserves en sucres pour faire face à une infection à *V. splendidus*, au point de réduire l'activité de la PK.

Cette expérience montre que le transfert des huîtres de la mer ouverte vers l'étang de Thau conduit à une augmentation marquée et rapide des réserves énergétique, du métabolisme aérobie (activité CS, sauf dans le cas des huîtres sur cordes) et du métabolisme des sucres (activité HK, PK et PEPCK), traduisant probablement l'effet d'une ressource trophique plus abondante dans l'étang de Thau comparativement à la mer ouverte.

Tableau 6. Concentration en sucres et en triglycérides (TAG), activités des enzymes citrate synthase (CS), hexokinase (HK), pyruvate-kinase (PK) et phospho-énolpyruvate-carboxykinase (PEPCK) et ratio PK/PEPCK en fonction des agents infectieux détectés[‡] dans les tissus d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Les huîtres ont été transférées de la mer ouverte vers l'étang de Thau le 27 mai 2010 selon trois modalités d'élevage et prélevées le 27 mai, le 4 juin et le 7 juin. Les valeurs de *P* sont indiquées en gras lorsque les différences sont significatives (ANOVA, *P*<0.05). Les lettres différentes indiquent les différences significatives.

Variable mesurée	Aucun	Herpès	<i>Vibrio splendidus</i>	Herpès + <i>V. splendidus</i>	<i>P</i>
Réserves énergétiques (mg g⁻¹ MS)					
Sucre	205 ^a ± 37	210 ^a ± 31	160 ^b ± 36	197 ^a ± 32	< 0.001
TAG	22 ± 9	24 ± 8	20 ± 15	20 ± 10	0.755
Activités enzymatiques (mU mg⁻¹ protéine)					
CS	60.2 ± 5.7	56.3 ± 4.5	57.3 ± 6.5	59.1 ± 8.2	0.419
HK	7.4 ± 2.5	6.1 ± 1.7	6.0 ± 2.0	6.1 ± 1.6	0.214
PK	2.9 ± 1.2	3.0 ± 1.2	2.0 ± 0.9	2.7 ± 1.2	0.068
PEPCK	5.4 ± 1.7	6.0 ± 2.0	5.6 ± 4.2	5.1 ± 1.8	0.771
Rapport					
PK/PEPCK	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.675
Nb individus analysés	11	14	16	19	

[‡] La détection du virus Herpes ou du *Vibrio splendidus* est considérée positive lorsque le portage est > 100 cp ADN mg⁻¹.

4.2.3.4. Conclusion

Les pratiques culturales peuvent influencer la mortalité, puisque, dans le cadre de cette expérience, les huîtres collées sur cordes résistent mieux (10% de mortalité) que les huîtres en paniers australiens qui meurent à 80%. Étonnement, les huîtres sur cordes qui présentent des mortalités faibles sont progressivement toutes infectées par le virus Herpes et présentent des charges virales aussi élevées que les huîtres maintenues en paniers qui meurent massivement. Par conséquent, les différences de mortalité observées entre ces deux conditions d'élevage ne s'expliquent pas par des différences de charges virales mais plutôt par (1) la prévalence et la charge en bactérie *V. splendidus* qui sont plutôt moindres dans les huîtres sur cordes, et (2) une condition physiologique accrue des huîtres sur cordes comparativement à celle des huîtres en paniers australiens. Ces deux facteurs moduleraient l'effet de l'infection par le virus Herpes sur la mortalité des huîtres.

La proximité des sites d'élevage joue également un rôle important dans l'expression des mortalités. Les huîtres maintenues protégées du risque de mortalité en mer ouverte transférées dans l'étang de Thau meurent à 80% dans les tables après seulement 10 jours alors que les mêmes individus déployés au large à ~200m de la zone conchylicole présentent 100% de survie au même moment. Les huîtres placées au large de la zone conchylicole présentent des prévalences et des portages faibles en virus Herpes et *V. splendidus* comparés aux huîtres maintenues dans les tables. L'analyse des courants et des agents infectieux dans les huîtres montre que les huîtres placées au large de la zone conchylicole n'ont pas été contaminées par les huîtres cultivées dans la zone

conchylicole entre le 27 mai et le 11 juin. Ainsi, la contamination des huîtres par les agents infectieux et la mortalité qui en découle dépend de la localisation dans l'étang de Thau et plus précisément de l'hydrodynamique.

La suite des événements confirme cette conclusion. Les huîtres placées au large de la zone conchylicole présentent des mortalités et des charges en virus Herpes significatives à partir du 17 août, suivant de quelques jours la reprise des mortalités constatées sur la table Ifremer lorsque la température devient inférieure à 24°C. Les mortalités et l'infection par le virus des huîtres placées au large suivent l'établissement de courants forts provenant du secteur conchylicole qui ont sévis entre le 8 août et le 11 août.

4.2.4. L'exposition aux mortalités

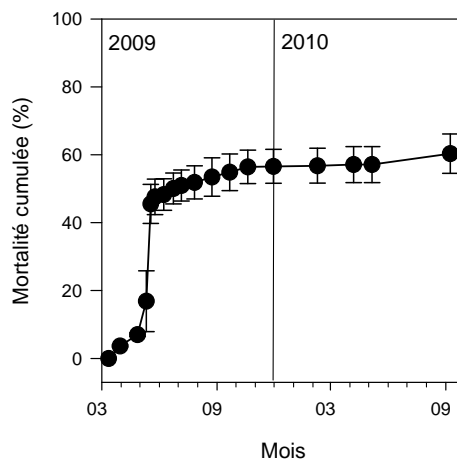
Nous avons suivi la mortalité d'un lot de naissain huîtres provenant du captage d'Arcachon déployé dans l'étang de Thau en mars 2009 jusqu'à fin 2010. L'hypothèse est que le naissain survivant en 2009 résiste en 2010.

Nous avons comparé la mortalité constatée au printemps 2011 des huîtres maintenues exemptes de mortalité en mer ouverte avec celle des huîtres survivantes à une exposition aux mortalités dans l'étang de Thau en 2010. L'expérience porte sur les lots 2n et 3n produits en août 2009 (Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade, Ifremer), déployés le 18 mars 2010 en mer ouverte au large de Marseillan et maintenus exempt de mortalité. Ces huîtres ont été transférées dans l'étang de Thau le 23 juin 2010 (groupe exposé aux mortalités) ou le 10 janvier 2011 (groupe non exposé). La mortalité est suivie pendant le printemps 2011.

L'objectif de cette expérience est de :

- Savoir si les huîtres survivantes suite à une exposition aux mortalités sont résistantes l'année suivante.

Faut-il exposer les huîtres dès leur plus jeune âge aux mortalités afin d'écrémer les populations cultivées et limiter la mortalité aux jeunes stades d'élevage, moins coûteux pour l'entreprise ?



Le naissain provenant du captage d'Arcachon exposé aux mortalités en 2009 est résistant en 2010 (Fig. 23). Ce lot qui a subi ~60% de mortalité au printemps 2009 présente une mortalité additionnelle de seulement 4% en 2010.

Figure 23. Mortalité cumulée d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* provenant du captage d'Arcachon déployées dans l'étang de Thau en mars 2009 en fonction du temps (moyenne \pm écart-type, n=3)

Les huîtres survivantes suite à l'exposition aux mortalités en 2010 dans l'étang de Thau présentent des mortalités additionnelles de seulement 8% au printemps 2011. En revanche, les huîtres de même origine, maintenues indemnes de mortalité en mer ouverte en 2010, transférées dans l'étang de Thau en janvier 2011, font état de 26% et 70% de mortalité pour les lots 3n et 2n respectivement au printemps 2011. A titre indicatif, la mortalité printanière d'un lot d'huître 2n de l'année (source LGP, Ifremer) atteint plus de 90% au même moment lorsque la température atteint 17°C.

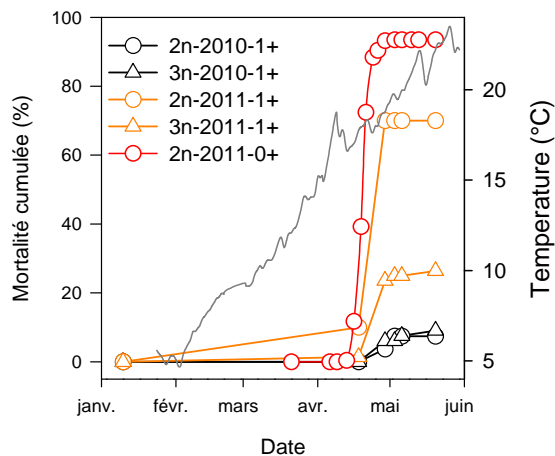


Figure 24. Mortalités cumulées d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* diploïde (2n) et triploïdes (3n) en 2011. Ces huîtres de plus d'un an (1+) sont transférées dans l'étang de Thau le 23 juin 2010 (groupe exposé aux mortalités) ou le 10 janvier 2011 (groupe non exposé). La mortalité des huîtres de l'année (0+) est indiquée en relation avec la température.

4.2.5. Conclusion

Les mortalités se produisent lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C quels que soient la saison, l'âge ou la taille des huîtres. Par ailleurs, les mortalités printanières (température comprise entre 17°C et 21°C, coïncident avec une augmentation massive des charges en virus Herpes OsHV-I et en bactérie *Vibrio splendidus* alors que les mortalités estivales (température proche de 24°C) coïncident avec une augmentation des charges en Herpes uniquement. Par conséquent, les infections sont simples ou multiples selon la température du milieu.

La mortalité d'un lot d'huître est fonction du parcours zootechnique (exposition ou non à la mortalité dans le passé) et non pas de l'âge ou de la taille des animaux. Les expériences de transferts successifs de lots d'huîtres maintenus indemnes de mortalité en milieu sain (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau) conduit inexorablement à des pertes importantes, variables entre 30% et 90%, lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. En contrepartie, les huîtres qui survivent à une exposition aux mortalités durant l'année n sont résistantes l'année $n+1$.

La mortalité est également fonction de l'hydrodynamique. L'infection par le virus Herpes et la mortalité des huîtres placées au large des zones d'élevage fait suite à des courants forts provenant des zones d'élevage.

Enfin, la mortalité dépend des pratiques culturelles. Les huîtres collées sur cordes résistent mieux (10% de mortalité) que les huîtres en paniers australiens qui meurent à 80%. Les huîtres sur cordes qui présentent des mortalités faibles présentent le même niveau d'infection virale que les huîtres maintenues en paniers qui meurent massivement. Par conséquent, les différences de mortalité observées entre ces deux conditions d'élevage ne s'expliquent pas par des différences d'infection virales mais plutôt par la prévalence et la charge en bactérie *V. splendidus* qui sont plutôt moindres dans les huîtres sur cordes, et une condition physiologique accrue des huîtres sur cordes comparativement à celle des huîtres en paniers australiens. Ces deux facteurs moduleraient l'effet de l'infection par le virus Herpes sur la mortalité des huîtres.

5. Conclusions, perspectives et recommandations

Les mortalités d'huîtres dans l'étang de Thau résultent d'infections simples (virus Herpes OsHV-I) ou multiples (virus Herpes et bactérie *Vibrio splendidus*) lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. Les mortalités d'un lot d'huîtres varient principalement en fonction de son parcours zootechnique et de l'hydrodynamique. Plus singulièrement, les mortalités peuvent être modulés par les pratiques culturales.

- ▶ Effet du parcours zootechnique : les mortalités touchent spécifiquement les huîtres naïves, c'est à dire celles qui n'ont jamais été exposées aux mortalités au préalable.
- ▶ Effet de l'hydrodynamique : les mortalités au large des secteurs conchylicoles dépendent de l'apport de masses d'eau provenant de foyers infectieux dans les zones d'élevage.
- ▶ Effet des pratiques culturales : les huîtres sur cordes meurent moins que les huîtres placées en paniers australiens.

5.1. Caractère infectieux des mortalités

L'apparition des mortalités aux printemps dans l'étang de Thau coïncide systématiquement avec des charges élevées en virus Herpes OsHV-I et en bactérie *Vibrio splendidus* dans les huîtres, lorsque la température atteint 17°C. Ce résultat suggère que ces deux agents infectieux sont impliqués dans le phénomène des mortalités massives. En appui à cette conclusion :

- ▶ les mortalités constatées suite aux multiples transferts de la mer ouverte (milieu sain) vers l'étang de Thau (milieu à risque), dans le secteur conchylicole de Marseillan, réalisés en période printanière, coïncide toujours avec une augmentation massive des charges en virus Herpes OsHV-I et en bactérie *V. splendidus*,
- ▶ les huîtres maintenues indemnes de mortalité au large du secteur conchylicole de Marseillan dans l'étang de Thau en juin 2010 présentent des prévalences et des portages faibles ou nulles pour ces deux agents infectieux,
- ▶ les huîtres maintenues indemnes de mortalité en 2009 et en 2010 en mer ouverte, présentent des prévalences et des portages faibles ou nulles pour ces deux agents infectieux.

Néanmoins, quelques questions importantes demeurent concernant le rôle de ces agents infectieux dans les mortalités massives d'huîtres creuses :

Lorsque la température est proche de 24°C, les mortalités d'huîtres coïncident avec une augmentation des charges en Herpes virus uniquement : la bactérie *V. splendidus* n'est plus détectée. Par conséquent, le lien de causalité entre les

mortalités d'huîtres et la présence de *V. splendidus* dans ces conditions n'est pas clairement démontré.

Des huîtres qui présentent des mortalités faibles (10%) peuvent être autant infectées par le virus Herpes que des huîtres de même origine qui meurent massivement (80%, cordes vs paniers, section 4.2.3). Des facteurs autres que la charge en virus Herpes pourraient moduler l'effet de l'infection par le virus Herpes sur la mortalité des huîtres. Dans ce cas précis, ces facteurs pourraient être la détection de *V. splendidus* et la condition physiologique (réserves énergétiques) des huîtres.

5.2. Facteurs favorisant les mortalités

5.2.1. Le parcours zootechnique

La survie d'un lot d'huître est fonction de l'exposition ou non à la mortalité dans le passé. Les transferts de lots d'huîtres maintenus indemnes de mortalité en milieu sain (mer ouverte) dans un milieu à risque de mortalité (étang de Thau) conduisent inexorablement à des pertes importantes lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C. En contrepartie, les huîtres qui survivent à une exposition aux mortalités durant l'année n sont résistantes l'année $n+1$.

Par conséquent, il semble préférable d'exposer les huîtres aux mortalités dès leur plus jeune âge afin d'écrémer les populations cultivées et limiter la mortalité aux jeunes stades d'élevage, moins coûteux pour l'entreprise, plutôt que de conserver les huîtres indemnes de mortalité dans un site « sanctuaire », de type mer ouverte. Dans ce dernier cas, le risque de mortalité est toujours présent. Le maintien et le transfert d'huîtres sensibles aux mortalités vers des bassins à risque de mortalité contribuent à entretenir des potentiels foyers d'infection.

Ces résultats sont en accord avec l'idée selon laquelle le naissain d'huître issu de captage précoce, exposé aux mortalités pendant la première année, est plus résistant que celui qui provient de captage tardif, peu ou pas exposé aux mortalités pendant la première année (Cochennec-Laureau et al. 2011, pour revue).

Par ailleurs, ces résultats confortent l'intérêt porté au développement des activités de captage de naissain d'huître sur Thau. Le captage des huîtres en 2010 a eu lieu début juillet et mi-août (Rayssac et al. 2011), de sorte que le naissain récolté a été exposé aux mortalités pendant sa première année. Début mai 2011, ce naissain présente des mortalités faibles (3% à 37%, source CRCM), alors que les huîtres naïves du même âge provenant directement de nurseries présentent des mortalités supérieures à 90% fin avril 2011 (source Ifremer).

5.2.2. L'hydrodynamique

Notre étude suggère que la mortalité et l'infection par le virus Herpes se propagent dans l'étang de Thau en fonction des courants. Dans les Pertuis Charentais, en période de fortes mortalités des naissains d'huîtres dans les zones

d'élevage, le virus Herpes n'est pas détecté dans les naissains et les adultes provenant de gisements sauvages isolés du point de vue hydrodynamique. Deux études récentes montrent le couplage qui existe entre l'hydrodynamique et la transmission de maladies virales en milieu marin (Gustafson et al. 2007, Viljugrein et al. 2009). Par exemple, le virus de l'anémie infectieuse chez le saumon Atlantique se transmet entre les fermes d'élevage grâce aux courants et aux marées. Par conséquent, la gestion sanitaire des fermes connectées par l'hydrodynamique est considérée comme un tout indissociable et non comme des sous unités d'entreprises individuelles et indépendantes (Gustafson et al. 2007).

Il est fort probable que le virus Herpes parcourt des distances plus ou moins grandes en fonction de la vitesse des courants en dehors de son hôte (sous forme libre ou adsorbé à la matière particulaire), tout en conservant sa virulence. La connaissance de la durée pendant laquelle le virus Herpes est virulent en dehors de son hôte est cruciale pour envisager une adaptation des pratiques d'élevage. Par rapport au milieu terrestre, la connectivité en milieu marin est forte, de sorte que l'éradication des maladies et le confinement des épidémies sont complexes à appréhender (McCallum et al. 2004).

L'excellente survie des huîtres en filière en mer ouverte au large de Marseillan à 22m de profondeur reflète probablement l'isolement hydrodynamique de ce site vis à vis des foyers d'infection les plus proches, qui sont majoritairement localisés dans l'étang de Thau (peu de communication avec la mer et distance > 3 Km) et plus sporadiquement en mer ouverte dans une autre zone d'élevage en surface (les Aresquiers à 3 Km de distance). De plus, cette filière fait l'objet d'une exploitation modérée, essentiellement dédiée à la mytiliculture.

5.2.3. Les pratiques culturelles

Diverses pratiques d'élevage sont susceptibles d'influer sur les phénomènes de mortalité en amplifiant le système infectieux et les mortalités (Samain & McCombie 2008).

La mortalité dépend des pratiques culturelles. Les huîtres collées sur cordes résistent mieux (30% de mortalité totale pendant toute la durée de l'étude) que les huîtres en paniers australiens qui meurent rapidement à 80%. Pourtant, des mortalités importantes d'huîtres sont également rapportées sur cordes par les professionnels (CRCM comm. pers.). Nos résultats doivent être pris dans leur contexte : ils portent sur des grosses huîtres âgées de plus d'un an maintenues exemptes de mortalités en mer ouverte et cette expérience comparative n'a été réalisée qu'une seule fois, fin mai 2010. Il aurait été intéressant de faire la même expérience sur des huîtres plus petites lorsque les mortalités démarrent au printemps. En fait, il est possible que l'effet des pratiques culturelles sur la mortalité ne soit visible que lorsque la pression des agents infectieux est modérée. En période épidémique aigue, la pression des agents infectieux serait si forte que les huîtres naïves meurent massivement quelles que soient les pratiques culturelles en vigueur.

5.3. Autres facteurs à prendre en compte

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 dans l'étang de Thau.

Toutefois, des huîtres d'écloseries (sources : éclosion B et Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'Ifremer) ont été maintenues pendant 1 à 2 ans en mer ouverte sans mortalité, à des températures parfois largement supérieures à 17°C . Par conséquent, ces huîtres d'éclosion sont saines, bien qu'elles meurent massivement dès qu'elles sont transférées dans l'étang de Thau. Ces huîtres naïves préservées des mortalités en éclosion peuvent rester épargnées lorsqu'elles sont élevées dans des zones « sanctuaires », non touchées par les mortalités.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que les lots d'élevage « porteurs asymptomatiques de virus » sont capables, en conditions isolées et à la température seuil de 16°C , de développer la maladie et de subir des mortalités en l'absence de transmission par l'eau (Cochennec-Laureau et al. 2011). En mélange, une fois les mortalités initiées, les agents infectieux se transmettent par l'eau aux huîtres naïves et saines et la mortalité se déclare dans tous les lots.

5.4. Perspectives

5.4.1. Les pratiques culturelles et l'hydrodynamique à grande échelle

La question de l'effet des pratiques culturelles sur la mortalité est cruciale puisqu'elles sont le seul facteur sur lequel professionnels et gestionnaires locaux peuvent agir pour limiter l'épidémie et les mortalités d'huîtres qui sévissent chaque année. La faible mortalité des huîtres collées comparativement aux huîtres maintenues en panier constatée au mois de juin dans la zone de Marseillan est une observation ponctuelle qui ne saurait être généralisée à l'ensemble des secteurs conchylicoles de l'étang de Thau en tout temps de l'année. D'ailleurs, les professionnels ont déclaré des mortalités importantes sur cordes fin avril début mai lorsque la température de l'eau dépassait 16°C .

L'effet des pratiques culturelles sur la mortalité des huîtres cultivées et la transmission des agents infectieux dans l'étang de Thau doivent être appréhendés à l'échelle du bassin conchylicole. En effet, le résultat d'une expérience ponctuelle dépend de la quantité d'agents infectieux dans le milieu au moment de l'expérience. Si la pression des agents infectieux exercée sur les huîtres en élevage est extrême (très forte ou nulle), alors l'effet des pratiques culturelles sur la survie des huîtres risque d'être complètement gommé par l'effet dominant des agents infectieux (mortalité totale ou nulle quelles que soient les conditions). A l'inverse, si la pression des agents infectieux qui s'exerce sur les huîtres est modérée, alors il sera possible de détecter des différences significatives entre pratiques culturelles si

il y en a. Nous proposons en 2011 de suivre la mortalité d'un lot d'huîtres sain et naïf déployé sur une centaine de stations dans l'étang de Thau où les pratiques culturelles seront qualifiées selon différents critères afin d'examiner la relation possible entre les pratiques culturelles en vigueur et la mortalité des huîtres en relation avec les agents infectieux.

5.4.2. Les huîtres sélectionnées

Bien que la mortalité des huîtres sélectionnées « résistantes » (R) aux mortalités estivales qui sévissaient en 2001 soit similaire à celle des témoins dans l'étang de Thau en 2010, il faut tester l'effet de la sélection d'huîtres survivantes à des épisodes de mortalité récents. Les huîtres R testées présentent généralement un caractère de résistance aux mortalités estivales où l'environnement et la physiologie jouent un rôle majeur, alors que les mortalités actuelles sont dominées par l'action d'agents infectieux.

Pour poursuivre l'amélioration génétique vis-à-vis des mortalités, deux lots ont été produits en mars 2010 en utilisant pour chaque lot, soit des parents ayant connu des mortalités en 2009 (lot amélioré), soit des parents préservés des mortalités 2009 (lot témoin, Cochenec-Laureau et al. 2011). Les naissains de 3 mois ont été testés dès juin 2010 dans le bassin de Marennes-Oléron. En septembre, la survie des lots témoins était de 4% et 13% contre 16% et 29% pour les lots améliorés. Des résultats similaires ont été obtenus en Baie de Bourgneuf. Ainsi, les descendants d'huîtres survivantes à un épisode de mortalités ont montré une meilleure survie que les descendants d'individus qui n'ont pas connu d'épisode de mortalité massive. Ces résultats sont encourageants et confirment l'héritabilité du caractère « résistant », et donc la possibilité d'améliorer la survie par la sélection.

Ces lots améliorés et témoins sont actuellement (2011) en cours de testage dans l'étang de Thau et en mer ouverte (site témoin de non mortalité). Les résultats obtenus sont très encourageants.

5.5. Recommandations

Compte tenu que les mortalités d'huîtres présentent un caractère infectieux et qu'elles varient en fonction du parcours zootechnique et de l'isolement/connectivité hydrodynamique du site d'élevage, il faut systématiquement connaître les caractéristiques des lots mis en élevage et les caractéristiques du site d'accueil. Concernant les caractéristiques du lot, il faut connaître :

- ▶ La mortalité subie pendant la première année. Si cette information n'est pas disponible, il faut connaître la date de captage ou de production en éclosérie et le parcours d'élevage, afin de déterminer si le lot a été exposé ou non aux mortalités dans le passé. Cette information permet d'évaluer si le lot est sensible ou non aux épisodes de mortalité futurs. Les chances de

survie d'un lot exposé à la mortalité l'année précédente sont largement supérieures à celle d'un lot non exposé préalablement.

- Attention, la taille et l'âge des huîtres ne sont pas forcément des indicateurs de résistance : des huîtres de plus d'un an peuvent subir de la mortalité si elles n'ont pas été exposées l'année précédente. Inversement, des huîtres de petites tailles âgées d'un an seulement peuvent survivre si elles ont été exposées à la mortalité l'année précédente.
- ▶ Le statut sanitaire des huîtres. Concernant le virus Herpes, les huîtres peuvent être indemnes, porteuses asymptomatiques (sans mortalité) ou infectieuses (avec mortalité). Selon le statut sanitaire, les huîtres doivent être cultivées dans des sites épargnés (lots indemnes seulement) ou dans des sites déjà touchés par la mortalité (lots indemnes, porteurs asymptomatiques et infectieux). L'évaluation du statut sanitaire implique une analyse par PCR quantitative du portage en Herpes virus, par un laboratoire agréé, qui permet de détecter les huîtres infectieuses et parfois des huîtres porteuses asymptomatiques. Pour un diagnostic plus complet, c'est à dire pour détecter les porteurs asymptomatiques, il faut par exemple exposer un échantillon du lot à une élévation rapide de température de 13°C à 21°C (Cochennec-Laureau et al. 2011). Suite à cette épreuve thermique, des individus classés négatifs pour la détection d'ADN de virus OsHV1 par qPCR peuvent se révéler porteurs asymptomatiques ou infectieux.
- ▶ L'origine des huîtres (naturel et éclosion), qui est un facteur généralement confondu avec le parcours zootechnique et le statut sanitaire. Les naissains naturels fortement touchés au cours de l'année de captage présente un potentiel de survie important quel que soit le statut sanitaire de la zone d'accueil, alors que les naissains d'éclosion, généralement maintenus exempts de mortalité, présentent un potentiel de survie qui dépend de la qualité du site d'accueil : ils survivent dans des sites « sanctuaires » et meurent massivement dans des sites infectés.

Il apparaît donc indispensable de mettre en place un dispositif de traçabilité et de certification sanitaire des huîtres. D'ores et déjà, l'épreuve thermique représente une avancée importante dans la mesure où elle permet de déclencher l'expression virale et donc de distinguer les individus sains et porteurs asymptomatiques ou infectieux (Cochennec-Laureau et al. 2011).

Concernant les caractéristiques du site d'accueil, il faut connaître son niveau d'isolement/connectivité hydrodynamique avec les zones d'élevage touchées par les mortalités. Idéalement, il faudrait pouvoir connaître le niveau d'occupation des concessions, cartographier les gisements naturels, connaître le statut sanitaire de la zone, évaluer l'importance des transferts...

Le caractère infectieux des mortalités nous encourage à favoriser les pratiques d'élevage qui permettent de réduire la transmission des maladies à l'échelle des

zones d'élevages. Cela revient à envisager des densités d'élevage plus faibles, éviter la proximité entre individus et structures d'élevage, et suivre les cheptels afin de régulièrement retirer les huîtres moribondes ou mortes qui constituent de nouveaux foyers d'infection. Bien que les résultats d'études ponctuelles à petite échelle sur l'effet de la densité sur la mortalité soient contradictoires et peu concluantes (Cochennec-Laureau et al. 2011), ces mesures, prises collectivement à grande échelle, pourraient influencer la propagation de l'infection et des mortalités.

Finalement, la production d'huître en mer Méditerranée sur site profond est intéressante, à condition de pouvoir y réaliser un cycle d'élevage complet. La difficulté est d'obtenir un produit commercialisable. De plus, il faut éviter de transférer ces huîtres naïves et sensibles à la mortalité dans des milieux à risque de mortalité (ex. étang de Thau). Enfin, il faut éviter d'introduire des huîtres porteuses asymptomatiques ou infectieuses, au risque de perdre le caractère « sain » du site d'accueil.

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.

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.

Cochennec-Laureau N, Baud J-P, Pepin J-F, Benabdelmouna A, Soletchnik P, Lupo C, Garcia C, Arzul I, Boudry P, Huvet A, Pernet F, Bachere E, Bedier E, Petton B, Gaussem F, Stanisiere J-Y, Degremont L (2011) Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : acquis des recherches en 2010, <http://archimer.ifremer.fr/doc/00033/14423/>

Dégremont L (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317:94-98.

Dégremont L, Bédier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299:21-29.

Dégremont L, Ernande B, Bedier E, Boudry P (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262:41-53.

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.

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 Pennec 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.

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, Burrenson 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.

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.

Genard B, Pernet F, Lemarchand K, Boudry P, Moraga D, Tremblay R (sous presse) Physiological and biochemical changes associated with massive mortality event occurring during premetamorphic development of American oyster *Crassostrea virginica*. Aquatic Living Res

Gustafson LL, Ellis SK, Beattie MJ, Chang BD, Dickey DA, Robinson TL, Marengi FP, Moffett PJ, Page FH (2007) Hydrographics and the timing of infectious salmon anemia outbreaks among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) farms in the Quoddy region of Maine, USA and New Brunswick, Canada. Preventive Veterinary Medicine 78:35-56.

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.

Huvet A, Normand J, Fleury E, Quillien V, Fabioux C, Boudry P (2010) Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. Aquaculture 304:95-99.

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.

Lafferty KD, Porter JW, Ford SE (2004) Are diseases increasing in the ocean? Annu Rev Ecol Evol Syst 35:31-54.

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.

Le Moullac G, Fleury P-G, Le Coz J-R, Moal J, Samain J-Fo (2007) Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquat Living Resour 20:279-286.

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.

Malham SK, Cotter E, O'Keeffe 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.

- McCallum HI, Kuris A, Harvell CD, Lafferty KD, Smith GW, Porter J (2004) Does terrestrial epidemiology apply to marine systems? *Trends in Ecology & Evolution* 19:585-591.
- 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.
- 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, Gall PL, Malet N, Pastoureaud A, Munaron D, Lorgeril JD, Bachère E, Vaquer A, Huvet A, Corporeau C, Normand J, Boudry P, Moal J, Quéré C, Quillien V, Daniel JY, Pépin J-F, Saulnier D, Gonzalez JL, Bouchoucha M (2010) Mortalité du naissain d'Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau en 2009. Ifremer, 10-008, 86p, <http://archimer.ifremer.fr/doc/00002/11354/>
- 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.
- Rayssac N, Perignon A, Le Gall P, Gervasoni E, Pernet F, Regler D (2011) Production de naissain d'huître en Méditerranée, Rapport intermédiaire, 92p, http://www.srcm.fr/blog/wp-content/uploads/2011/04/Rapport_PDFfinal050411.pdf
- 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 Morest Project Vol
- 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.
- 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, 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.

Viljugrein H, Staalstrom A, Molvaer J, Urke HA, Jansen PA (2009) Integration of hydrodynamics into a statistical model on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis Aquat Organ* 88:35-44.

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.