

Contrat de projets Etat-Région Poitou-Charentes 2007 – 2013

Convention n°08/RPC-A-29 du 19 mai 2008

Projet « Développement durable des Pertuis charentais »

Laboratoire Environnement Ressource des Pertuis charentais, Ifremer, La Tremblade
 Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade

Denis Saulnier
 Jean-François Pépin
 Delphine Tourbiez
 Philippe Haffner
 Nicole Faury
 Lionel Degremont
 Tristan Renault

Patrick Soletchnik
 Olivier Le Moine
 Jean Luc Seugnet
 Philippe Geairon
 Stéphane Guesdon

Octobre 2011

Pepin J.F., Saulnier D., Guesdon S.

Mortalités massives de l’Huître creuse

Rapport final du programme de recherche sur l’étude de la cinétique de détection d’agents infectieux associés à des épisodes de mortalités de naissains d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur un site ostréicole de Marennes-Oléron (CIDAGINF 2009-2010)



Photo: D. Schikorski

REMERCIEMENTS

Les travaux scientifiques présentés dans ce rapport ont été réalisés avec un soutien financier de la Région Poitou-Charentes et du Feder

Mortalités massives de l'Huître creuse

Rapport final du programme de recherche sur l'étude de la cinétique de détection d'agents infectieux associés à des épisodes de mortalités de naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur un site ostréicole de Marennes-Oléron (CIDAGINF 2009-2010)

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		date de publication : Octobre 2011 nombre de pages : bibliographie : oui illustration(s) : 26 figures langue du rapport : française
Validé par : Adresse électronique :		
Titre de l'article : Etude de la cinétique de détection d'agents infectieux associés à des épisodes de mortalités de naissains d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> sur un site ostréicole de Marennes-Oléron. CIDAGINF		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal (aux) : Pépin J.F. ; Saulnier D. ; Guesdon S.		Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Direction des opérations / Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade ; Laboratoire Environnement Ressource des Pertuis charentais, Ifremer, La Tremblade
Contributeur(s) : Lionel Degremont, Nicole Faury, Philippe Haffner, Jean-François Pépin, Tristan Renault, Denis Saulnier, Travers Agnès, Delphine Tourbiez (Yann Couraleau, Neirouz Soussi, CDD) Philippe Geairon, Stéphane Guesdon, Olivier Le Moine, Jean Luc Seugnet, Patrick Soletchnik		Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, La Tremblade Laboratoire Environnement Ressource des Pertuis charentais, Ifremer, La Tremblade
Cadre de la recherche : Action CIDAGINF – CPER SP2		
Destinataires : Région PC, Ifremer		
Résumé		
Abstract		
Mots-clés Huître creuse, Mortalité, Virus herpès, Vibrions, Environnement, Pertuis charentais.		
Keys words Pacific oyster, Mortality, Herpes virus, Vibrios, Environment, Pertuis charentais.		

Sommaire

Fiche documentaire	1
1. Synthèse	2
2. Introduction	4
3. Matériel et Méthode	5
3.1. Site d'étude	5
3.2. Caractérisation environnementale	6
3.3. Plan d'expérience	6
3.4. Variables mesurées	8
3.4.1. Mortalité	8
3.4.2 Agents infectieux	8
4. Résultats	9
4.1. Caractérisation des mortalités d'huîtres creuses	9
4.1.1. Cinétiques des mortalités	9
4.1.2. Caractérisation environnementale	11
4.1.3. Cinétiques de détection des agents infectieux <i>in situ</i>	17
4.1.4. Évaluation de l'effet de traitements antibiotiques <i>ex situ</i> sur des lots d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> subissant un épisode de surmortalité	30
5. Discussion, conclusions et perspectives	37
6. Bibliographie	42

Avertissement

Le programme de recherche sur l'étude de la cinétique de détection d'agents infectieux associés à des épisodes de mortalités de naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur un site ostréicole de Marennes-Oléron dans le cadre des surmortalités d'huîtres creuses en pertuis charentais a été proposé par l'Ifremer pour co-financement aux travers des instances régionales. Il couvre la période de suivi sur le terrain 2009-2010. Cette étude a été réalisée dans le cadre du Contrat de projets État - Région Poitou-Charentes 2007 – 2013 (CPER-PC).

Deux laboratoires de l'Ifremer de Poitou-Charentes ont assuré la réalisation de cette étude, le Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade et le Laboratoire Environnement Ressource des Pertuis Charentais.

Ce document fait suite à deux rapports intermédiaires.

Résumé :

Cette étude a pour objectif d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en pertuis charentais en lien avec les paramètres environnementaux et la cinétique de détection d'agents infectieux ciblés, tels que les bactéries *Vibrio splendidus* (groupe) et *V. aestuarianus* ainsi que l'herpès virus OsHV-1. Deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur le site de d'Agnas en 2009 et 2010, avant, pendant ou après les épisodes de surmortalité de naissain, entre mars et septembre. L'approche retenue consiste à détecter et quantifier à pas de temps serrés les agents infectieux dans les tissus d'huîtres creuses d'élevage mises sur table ainsi que dans divers prélèvements réalisés à proximité : huîtres autochtones et autres espèces (moules sauvages et balanes), prélèvements d'eau de mer et de sédiment. Grâce aux sondes physico-chimiques placées sur le site des suivis cinétiques de paramètres environnementaux ont pu être réalisés (température, salinité, turbidité, fluorescence éq. Chlorophylle, Oxygène). Les données de ces paramètres ont permis de noter que les périodes de mortalité sont précédées par une élévation de la température de la colonne d'eau (+0,5°C/jour, >4jours). Des mortalités d'huîtres sont observées six jours environ après ce pic de température, avec une eau à plus de 16°C. La cinétique des bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* montre qu'elles sont très fréquemment détectées chez le naissain échantillonné vivant, avant ou durant les périodes de mortalité. Les niveaux de charges bactériennes détectés dans les tissus n'augmentent pas ou peu durant les périodes de surmortalité. La cinétique de détection de l'ADN viral d'OsHV-1 montre que le virus est faiblement ou pas détecté en dehors des périodes de mortalité alors que sa prévalence augmente rapidement juste avant et durant l'épisode de mortalité. Les niveaux des charges virales détectées dans les tissus s'élèvent très fortement durant les périodes de surmortalité. Le caractère infectieux des mortalités observées est bien établi, cependant la bactérie *V. aestuarianus* n'a pas été détectée. Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence de l'ADN viral d'OsHV-1 chez la moule et les balanes mais aussi dans l'eau de mer en dehors ou au cours des épisodes de mortalité. La température paraît jouer un rôle clé dans le déclenchement des mortalités de naissain associées à OsHV-1 et constitue un facteur de risque important.

1. Synthèse

Ce rapport fait état d'une étude de la cinétique de détection d'agents infectieux (CIDAGINF) associés à des épisodes de mortalités de naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur un site ostréicole de Marennes-Oléron dans le contexte des surmortalités d'huîtres creuses en pertuis charentais pour les années 2009 et 2010.

Ce projet avait pour objectif d'améliorer la compréhension des causes des mortalités de naissain en pertuis charentais en lien avec les paramètres environnementaux et la cinétique d'agents infectieux ciblés, tels que les bactéries *Vibrio splendidus* (groupe) et *V. aestuarianus* ainsi que l'herpès virus OsHV-1, agents qui sont fréquemment associés aux épisodes de mortalité d'huîtres juvéniles. Concernant le groupe génétiquement complexe de *V. splendidus* il faut bien garder à l'esprit que les outils de détection et de quantification développés sont très imparfaits en terme d'évaluation du risque zoo-sanitaire, puisque qu'ils ne permettent pas de discriminer les souches virulentes de celles qui ne le sont pas et qui font même partie de la flore commensale endogène de l'huître.

Dans le cadre du projet Etat-Région Poitou-Charentes 2007-2013, le Laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade en collaboration avec le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais a mené une étude sur le site d'Agnas au cœur du bassin de production de Charente Maritime. Les deux campagnes d'échantillonnage 2009 et 2010 ont été réalisées sur site, avant, pendant ou après les épisodes de surmortalité de naissain, entre mars et septembre. L'approche retenue a consisté à détecter et quantifier à pas de temps serrés les agents infectieux dans les tissus d'huîtres creuses *C. gigas* d'élevage suivies ainsi que dans divers prélèvements réalisés à proximité : huîtres autochtones et autres espèces (moules sauvages et balanes), prélèvements d'eau de mer et de sédiment. Pour ce faire, des lots d'huîtres creuses âgées de moins d'un an et n'ayant pas connu de mortalité ont été placées et suivies sur le banc d'Agnas dès le début du printemps jusqu'à l'été. Au cours de ces deux campagnes les lots suivis ont été affectés par de fortes mortalités. Par ailleurs, grâce aux sondes physico-chimiques placées sur le site dans le cadre du projet Développement Durable des Pertuis charentais (DDPC, SP2 action Hydrosat) financé également par le CPER Poitou Charentes et le FEDER, des suivis de certains paramètres environnementaux ont pu être réalisés (température, salinité, turbidité, fluorescence éq. Chlorophylle, O₂). Enfin en 2010, quelques huîtres suivies sur le banc d'Agnas et confrontées à un épisode de mortalité sévère ont été transférées à deux reprises dans la zone contrôlée du LGP afin d'évaluer l'effet d'un traitement antibiotique sur la dynamique des mortalités.

Les principales informations relevées au cours de cette étude sont les suivantes. A partir des analyses réalisées il a pu être observé lors du suivi 2009 (Mai-Sept) que l'ADN des bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* était détecté à une fréquence élevée (> 83%) dans le naissain d'huîtres suivies et prélevées vivantes,

quelle que soit la période de prélèvement, et que l'apparition des mortalités survenues le 20 juin 2009 ne coïncidait pas davantage avec une évolution des niveaux d'infection à *V. splendidus*. Par contre lors du suivi 2010, l'apparition des premières mortalités survenues de façon beaucoup plus précoce, le 31 Mai 2010, coïncident avec une augmentation brutale de la fréquence d'animaux infectés par des bactéries du groupe *V. splendidus* qui passe de 8-33% selon les dates de prélèvements à 67% le 31 Mai 2010. Néanmoins chez les huîtres trouvées infectées lors de ce suivi, on ne note aucune évolution significative des niveaux d'infection en relation avec l'apparition des mortalités. L'analyse des autres échantillons prélevés sur le site d'Agnas (huîtres creuses autochtones, moules et eau) révèle qu'il est fréquent de trouver de l'ADN de bactéries du groupe *V. splendidus* chez les huîtres creuses autochtones et moules analysées lors de ces deux campagnes de suivi, avec des niveaux de quantification similaires à ceux rencontrés chez les huîtres creuses faisant l'objet d'un suivi régulier. En revanche, il est rare d'en détecter à partir d'échantillons d'eau de mer ou de sédiments analysés bien qu'il faille interpréter avec prudence ces résultats du fait de la sensibilité de méthode de quantification utilisée ou de la présence éventuelle d'inhibiteurs de la polymérase au sein des échantillons de sédiments notamment. Bien que l'ADN de *Vibrio aestuarianus* ait été également systématiquement recherché, celui-ci n'a jamais été détecté dans aucun des échantillons d'animaux vivants collectés au cours des deux campagnes de suivi.

Les résultats relatifs aux essais de traitements antibiotiques des huîtres creuses suivies en 2010 et confrontées à un épisode de mortalité, révèlent que les mortalités sont significativement réduites après usage d'un antibiotique à spectre large vis-à-vis des bactéries Gram- ; par comparaison à des lots témoins n'ayant subi aucun traitement antibiotique. On observe en effet une réduction des mortalités cumulées de 61% (en l'absence de traitement) à 11% (au dixième jour du traitement antibiotique). Ces résultats révèlent la nature bactérienne d'un agent causal des mortalités observées.

A la lecture de l'ensemble des résultats d'analyses obtenus en bactériologie, le lien entre les mortalités observées *in situ* et les résultats d'analyse se rapportant à la détection et quantification des bactéries du groupe *V. splendidus* est difficile à établir. Il est important de rappeler cependant que les outils de détection et de quantification développés vis-à-vis des bactéries du groupe *V. splendidus* sont très imparfaits en terme d'évaluation du risque zoo-sanitaire, dans la mesure où aucun outil moléculaire spécifique de souches virulentes n'est actuellement disponible. Il n'est pas exclu également qu'un agent bactérien différent de ceux ciblés dans cette étude (*V. splendidus* et *V. aestuarianus*) et non encore identifié puisse être à l'origine des mortalités observées (notamment celles rencontrées sur Agnas en 2010).

De l'ADN du virus OsHV-1 est détecté en 2009 dans tous les échantillons de naissain d'huître prélevé vivant avec des fréquences qui varient de 35% avant l'apparition de mortalité à 97% pendant, puis 58% après le pic de mortalité. En

2010 la cinétique observée pour OsHV-1 est différente, le virus n'est pas détecté dans le naissain vivant avant la survenue des mortalités (avril-mai), il est détecté en nombre dans 50% des individus échantillonnés 5 jours avant le pic de mortalité. Pendant le pic, la fréquence de détection moyenne est de 83% et elle est associée à des charges virales très fortes ($>10^{+6}$ UG/mg), puis elle chute à 39% vingt jours plus tard après le pic de mortalité. De l'ADN viral est aussi détecté en quantité très faible dans les moules avant et pendant les mortalités tant en 2009 qu'en 2010. Sa présence est confirmée (traces) dans quelques échantillons d'eau de mer avant ou pendant les pics de mortalités en 2009 et 2010. Des échantillons de balanes (*Balanus sp.*) collectés en 2010 ont permis aussi la détection d'un signal viral très faible avant et pendant les mortalités ainsi que de l'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus*. Au cours de l'épisode de mortalité 2010, du naissain a été prélevé parmi des huîtres survivantes quelques jours après le déclenchement des mortalités sur site pour être ensuite transféré en salle contrôlée au LGP et permettre d'évaluer l'effet d'un traitement antibiotique sur la cinétique des mortalités afin de préciser mieux la nature de l'étiologie. Cet essai a permis de montrer l'implication des bactéries du groupe *V. splendidus* dans les mortalités et que la mortalité observée sur estran en pleine période de surmortalité peut être contrée par un traitement antibiotique, du moins dans les conditions où celui-ci a été évalué, *ie ex situ*, après transfert des animaux en aquarium et mise en place de conditions contrôlées.

Le suivi des paramètres physico-chimiques a permis d'observer que les périodes de mortalité sont précédées par une élévation de la température de la colonne d'eau (+0,5°C/jour >4jours). Les mortalités d'huîtres sont observées six jours environ après ce pic de température, avec une eau à plus de 16°C. Au cours de cette période la salinité mesurée atteint 33,5‰.

En conclusion, un suivi régulier et individuel en période à risque (printemps-été) a permis d'établir la cinétique de mortalité de naissains d'huîtres creuses ainsi que la cinétique de détection de l'agent infectieux OsHV-1 et des bactéries du groupe *V. splendidus*, et au sein de ces animaux mais aussi dans d'autres compartiments de l'élevage. Le caractère infectieux des mortalités observées est établi, il est associé à la détection de l'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* (pour 2010 uniquement) ainsi que de l'ADN du virus OsHV-1 (2009 et 2010). Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence de l'ADN viral d'OsHV-1 chez la moule et les balanes mais également de confirmer sa détection possible dans l'eau de mer en dehors ou au cours des épisodes de mortalité. Les moules et les balanes pourraient agir comme 'porteurs passifs' des agents étudiés mais cet aspect devra être vérifié, l'eau de mer paraît agir comme un vecteur mécanique de ces agents pathogènes.

Enfin, le facteur température paraît jouer un rôle clé dans le déclenchement des mortalités de naissain. Ces données d'écologie microbienne, couplées à des mesures de paramètres environnementaux, participent à une meilleure connaissance des conditions favorisant les épisodes de mortalité de naissains d'huîtres creuses, afin, *in fine*, d'être en mesure d'en limiter l'impact par des mesures de gestion adaptées.

2. Introduction

Des agents infectieux de nature différente, des bactéries *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* ainsi que l'herpès virus OsHV-1, sont fréquemment associés aux épisodes de mortalité d'huîtres juvéniles (naissains) rencontrés dans la quasi-totalité des sites ostréicoles français (Samain, Mc Combie, 2008 ; Cochenec-Laureau *et al.*, 2010 ; Pernet *et al.*, 2010 ; Saulnier *et al.*, 2010 ; Garcia *et al.*, 2011). En 2008, les huîtres cultivées dans les pertuis charentais ont été très sévèrement touchées avec plus de 80% de mortalités pour les classes d'âges de moins de 18 mois, ce qui représente une menace très sérieuse pour l'économie de la filière. Ainsi, un besoin est apparu pour mener spécifiquement des travaux en lien avec ces surmortalités d'huîtres creuses dans les pertuis charentais.

Deux études ont concerné cette problématique en 2009 et 2010, dans le cadre du projet Etat-Région Poitou-Charentes 2007-2013. Une étude menée par le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de la Tremblade sur le site d'Agnas, CIDAGINF (Cinétique de Détection d'AGents INFectieux), et une étude ayant une finalité très proche menée sur 4 sites du bassin de Marennes Oléron, pilotée par le CREEA, Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole, en collaboration avec le LGP et la Section Régionale Conchylicole de Poitou-Charentes.

Les objectifs majeurs du projet CIDAGINF sont : l'acquisition de connaissances concernant la présence des agents infectieux *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus* ainsi que l'herpès virus OsHV-1 dans l'environnement sur des sites de production d'huîtres creuses du bassin de Marennes Oléron, la recherche d'une relation entre la détection de ces agents infectieux (présence / quantification) et la survenue d'un épisode de mortalités chez un lot de naissains d'huîtres creuses.

L'approche retenue dans le cadre de CIDAGINF a été de détecter et de quantifier à pas de temps serré ces agents infectieux dans les tissus de l'huître, dans l'eau de mer, l'eau interstitielle du sédiment et chez d'autres espèces (moules sauvages, balanes). Pour ce faire, des lots d'huîtres creuses âgées de moins d'un an et n'ayant pas connu de mortalité ont été placés et suivis sur le banc d'Agnas (Charente Maritime) du début du printemps au début de l'automne, en 2009 puis en 2010. Le site d'Agnas a été choisi en raison de son accessibilité et pour son instrumentation à savoir la présence de sondes installées par l'Ifremer pour l'acquisition de données dans le cadre du projet Développement Durable des Pertuis charentais –DDPC- financé par le CPER-PC).

La recherche des agents infectieux a été effectuée en utilisant des techniques i) de bactériologie classique, ii) de séquençage du gène codant la sous unité ribosomale 16S des isolats bactériens trouvés majoritaires et iii) de détection/quantification d'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus* et d'herpès virus OsHV-1 par PCR en temps réel.

3. Matériel et Méthode

3.1. Site de l'étude

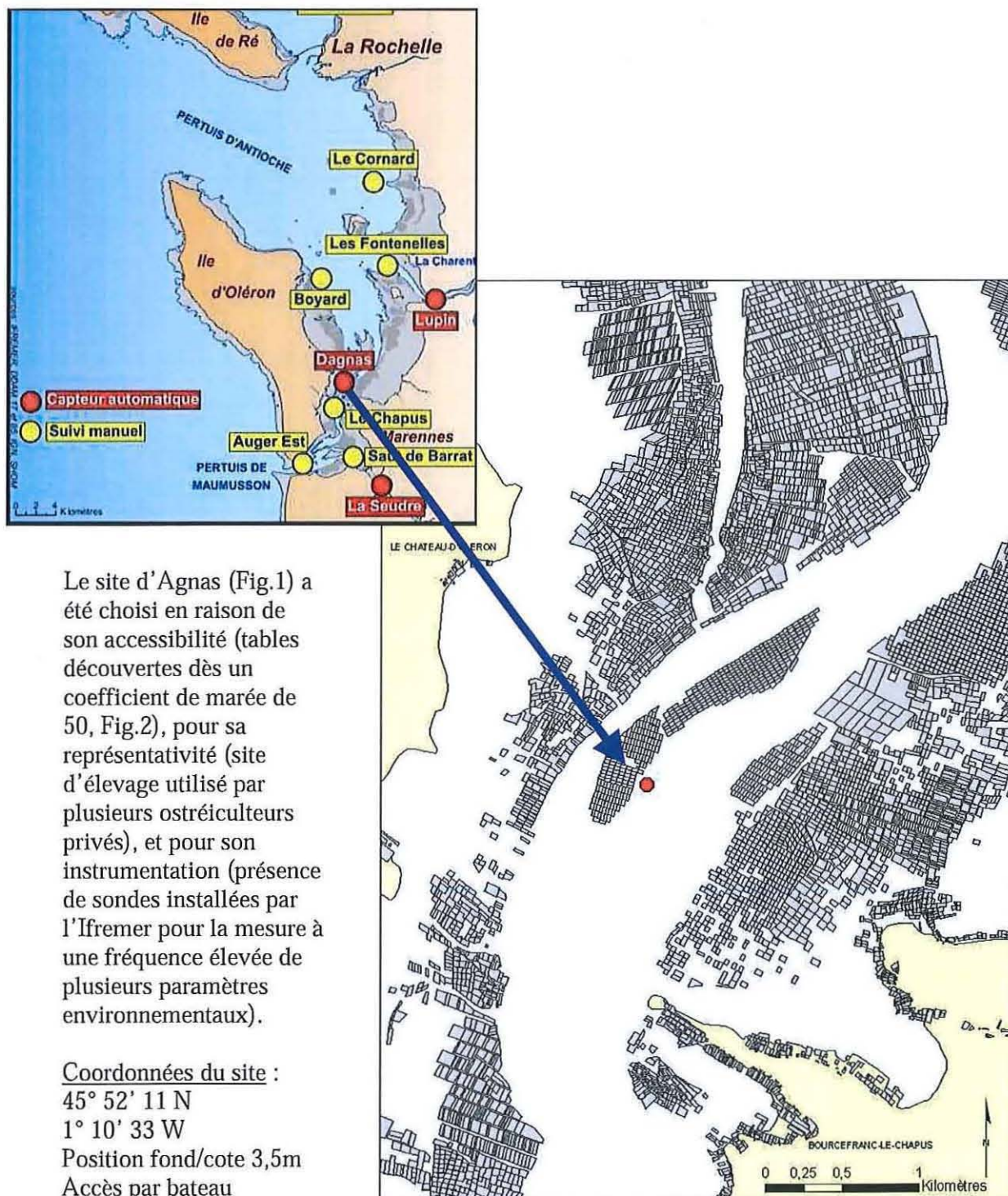


Figure 1 : Situation du banc d'Agnas dans les pertuis charentais



Figure 2 : Site d'Agnas, Sondes multi paramètres et tables ostréicoles (photos LERPC)

3.2. Caractérisation environnementale

Le site expérimental d'Agnas fait l'objet dans le cadre du projet Développement Durable des Pertuis Charentais (DDPC, SP2 action Hydrosat) 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

Les paramètres suivis et collectés au cours de cette étude sont :

Température de l'eau (°C), la salinité (‰, ou g/L), Fluorescence (équivalent chlorophylle *a* ($\mu\text{g. L}^{-1}$ ou mg/m^3), l'oxygène dissous (% saturation), la turbidité (FNU, formazine nephelometric unit).

3.3. Plan d'expérience

3.3.1. Animaux et compartiments échantillonnés

Cette étude a porté sur différents compartiments de l'environnement dans le bassin de Marennes Oléron : une espèce sensible, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la macro faune (moules, balanes), l'eau de mer et le sédiment.

Les animaux suivis sont en 2009, des huîtres creuses de moins d'un an (7 mois) issues de captage naturel réalisé sur Marennes. Ce naissain a été réparti en demi-poche à raison de 700 individus par poche, une pour le suivi de mortalité (comptage), une pour les prélèvements. Les animaux ont été mis à l'eau le 27 mai 2009 et suivis jusqu'au 2 septembre 2009. Au total en 2009 treize points de prélèvement ont été réalisés (Tableau 1). Des prélèvements complémentaires ont été réalisés : des moules (*Mytilus edulis*) sauvages à proximité des tables, de l'eau de mer, du sédiment (eau interstitielle), des huîtres 'sauvages' autochtones adultes.

En 2010, quatre lots distincts d'huîtres creuses âgées de moins d'un an et n'ayant pas connu de mortalité ont été répartis respectivement dans 2 poches, une pour le suivi de mortalité (comptage), une pour les prélèvements (environ 500 individus/poche). Un lot était constitué de naissain issu de captage naturel collecté à Arcachon. Les animaux ont été placés et suivis sur le banc d'Agnas du 31 mars au 24 juin 2010. Au total en 2010 treize points de prélèvement ont été réalisés (Tableau 1). Des prélèvements complémentaires ont été réalisés : des moules (*Mytilus edulis*) sauvages à proximité des tables, de l'eau de mer, des balanes (*balanus sp.*).

Tableau 1 : Calendrier des prélèvements et comptages en 2009 et 2010

Echantillonnage 2009		Echantillonnage 2010	
temps	dates	temps	dates
T0	27/05/2009	T0	31/03/2010
T1	28/05/2009	T1	29/04/2010
T2	29/05/2009	T2	03/05/2010
T3	02/06/2009	T3	10/05/2010
T4	03/06/2009	T4	12/05/2010
T5	08/06/2009	T5	17/05/2010
T6	10/06/2009	T6	20/05/2010
T7	15/06/2009	T7	25/05/2010
T8	23/06/2009	T8	27/05/2010
T9	24/06/2009	T9	31/05/2010
T10	26/06/2009	T10	03/06/2010
T11	30/06/2009	T11	08/06/2010
T12	03/07/2009	T12	24/06/2010
T13	02/09/2009		

3.4. Variables étudiées

3.4.1. La mortalité

A chaque visite sur le site, les poches sont contrôlées et les individus morts et les individus vivants sont dénombrés dans chaque poche 'pour comptage' afin de déterminer le pourcentage de mortalité par rapport à l'échantillonnage précédent. Les individus morts sont retirés. Dans les poches dédiées aux prélèvements, douze individus vivants sont échantillonnés à chaque visite. Pour les prélèvements de macrofaune, dix individus sont échantillonnés.

3.4.2. Agents infectieux et échantillonnage

Nous nous sommes principalement intéressés à la relation possible entre les épisodes de mortalité et la détection de l'herpès virus OsHV-1 et des bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *Vibrio aestuarianus*.

La recherche des agents infectieux a été réalisée de manière individuelle et non en pool et les analyses pour les vibrions et le virus étaient réalisées à partir du même individu.

En 2009, la bactériologie classique a été réalisée à partir de broyats de chairs d'huîtres (ou moules) entières préalablement dilués en eau de mer artificielle stérile. Les échantillons (surnageants) ont ensuite été étalés sur des boîtes de Pétri remplies de Marine Agar, un milieu synthétique permettant de cultiver la flore hétérotrophe totale d'origine marine. Une fraction aliquote de chaque broyat dilué (surnageant) constituait la prise d'essai congelée en vue de l'extraction des ADN totaux pour la recherche d'ADN viral par PCR quantitative.

En 2010, la recherche des agents infectieux a été effectuée par biologie moléculaire à partir des échantillons prélevés et congelés, après extraction des ADN totaux. Pour un même individu à tester, deux prises d'essai étaient réalisées : pour le virus, un morceau de manteau était prélevé et congelé à part, pour la bactériologie, le reste de l'animal était broyé et homogénéisé et une fraction aliquotée constituait ensuite la prise d'essai. Cette recherche est basée sur la détection/quantification d'ADN de *Vibrio splendidus*, de *V. aestuarianus* et d'herpès virus OsHV-1 par PCR en temps réel.

Pour les huîtres au minimum, 12 individus ont été analysés par date avec un échantillonnage de 45 individus à T0 (31/03/10) et 60 individus à T1 (29/04/10).

Pour les moules, 10 individus ont été analysés par date d'échantillonnage (T1 à T11) et 7 individus à T12. Pour les balanes, 10 individus ont été analysés par date d'échantillonnage.

3.4.2.1. Recherche de l'herpès virus OsHV-1

La méthode analytique utilisée pour la quantification de l'herpès 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.

3.4.2.2. Recherche de *Vibrio splendidus* et *Vibrio 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. Cette méthode ne permet néanmoins pas de distinguer les souches virulentes du groupe *V. splendidus* de celles qui ne le sont pas et qui font même partie de la flore commensale endogène de l'huître.

4. Résultats

4.1. Caractérisation des mortalités d'huîtres creuses

4.1.1 Cinétiques des mortalités d'huîtres

Les années 2009 et 2010 sont toutes deux caractérisées par des mortalités importantes de naissains d'huîtres creuses dans le bassin de Marennes Oléron et en particulier sur le site d'Agnas.

Cinétique des mortalités de naissain en 2009

Des premières mortalités significatives (>1% de mortalité journalière) ont été observées à partir du 20 juin 2009, soit 24 jours après le transfert des animaux sur site avec une fréquence d'espacement entre deux visites de 2,7 jours en moyenne (Fig. 3 et 3bis). Un premier pic de mortalité est donc observé entre le 20 et 29 juin 2009 avec une moyenne de mortalité journalière de 5,3 % sur cette période pour une fréquence de visite de 2,5 jours. Après une courte accalmie (mortalités journalières <1%), un deuxième pic de mortalité est apparu entre le 4 et 10 juillet, quoi que d'amplitude moindre par rapport au premier, avec une moyenne de mortalité journalière de 2,4 % sur cette période pour une fréquence de visite de 3,5 jours. Au 10 juillet (J44), les mortalités cumulées sont de **51,4%**. Passée cette date, les mortalités journalières sont à nouveau inférieures à 1%, et ce jusqu'au 21 octobre, excepté entre le 18 et 20 août où une mortalité de faible amplitude et de

très courte en durée est observée (1,4% de mortalité journalière). De façon remarquable, les différents pics de mortalité observés coïncident avec la survenue de marées de vives eaux (coefficient > 70, Fig. 3).

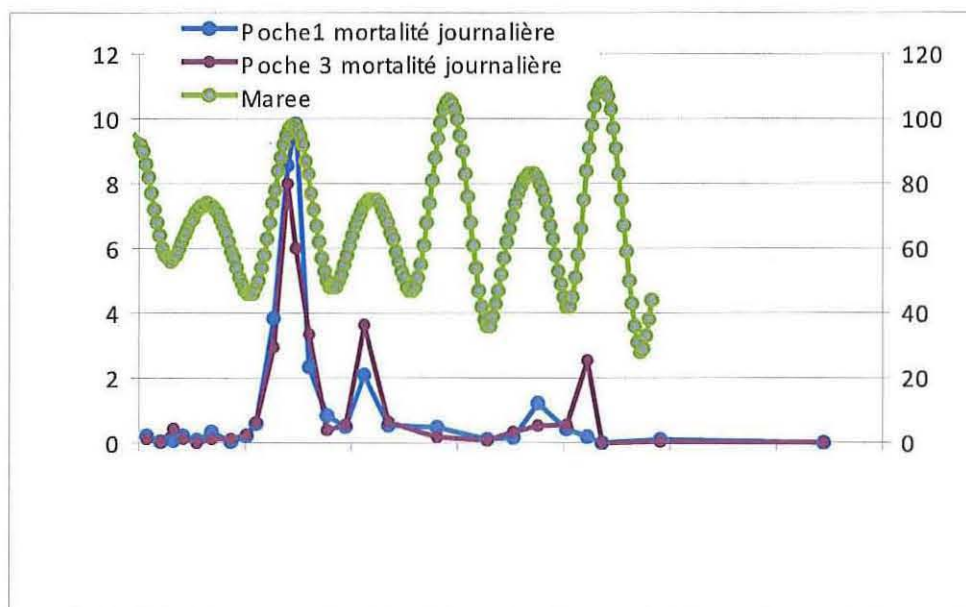


Figure 3 : Mortalités journalières moyennes du naissain *C. gigas* suivi en 2009 à d'Agnas (axe des ordonnées figuré à gauche du graphe et exprimé en % de mortalité journalière) et coefficients de marée (axe des ordonnées figuré à droite du graphe)

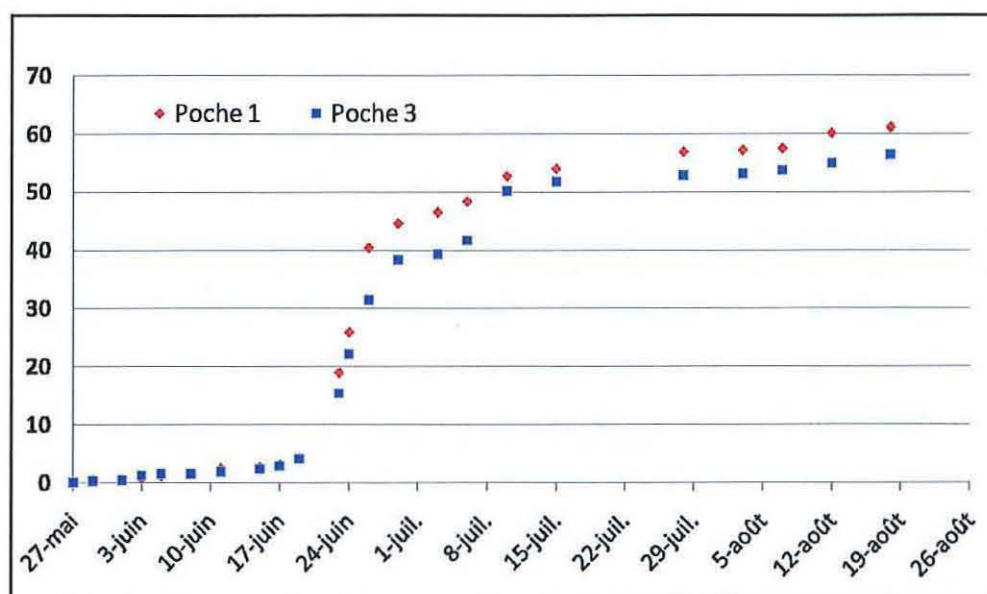


Figure 3bis: Mortalité cumulée du naissain de *C. gigas* suivi en 2009 à d'Agnas dans les deux poches de comptage. (axe des ordonnées en % de mortalité)

Cinétique des mortalités de naissain en 2010

Entre le 29 avril et le 8 juin 2010, en moyenne, la fréquence d'observation des mortalités et des prélèvements a été d'une visite tous les quatre jours.

Le suivi des mortalités a permis d'observer les premières mortalités des huîtres à la fin mai 2010 avec un pic mi-juin, soit 60 jours après la mise sur site (Fig. 4). En moyenne, la mortalité instantanée journalière du naissain entre le 3 et le 8 juin est de 9%. L'apparition des mortalités a été observée après le franchissement des 16°C (le 23/05/10) dans la masse d'eau (sonde LER-PC). La **mortalité cumulée** pour chaque lot varie entre 60% à 95% entre le 31/05/10 et le 24/06/10. Les moules et les balanes à proximité des lots d'huîtres n'ont pas présenté de mortalité.

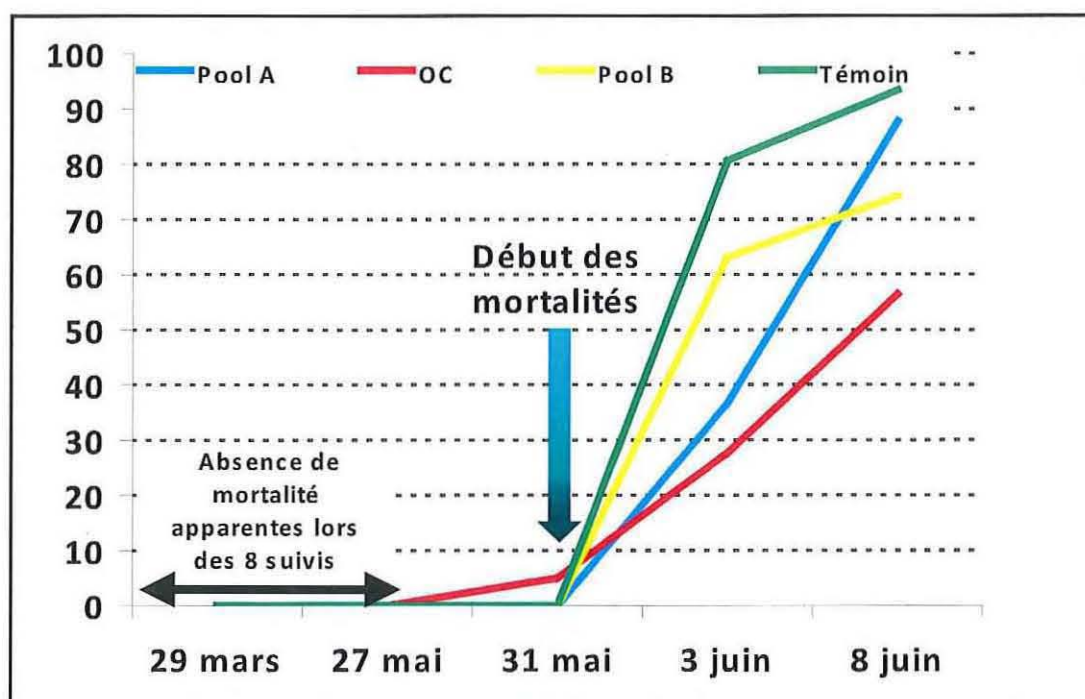


Figure 4 : Évolution des mortalités cumulées (en %) chez les huîtres creuses *C. gigas* suivies sur le site d'Agnas en 2010 (baie de Marennes Oléron), selon l'origine des animaux : Pool A, OC, Pool B et Témoin

4.1.2 Caractérisation environnementale

L'ensemble des données recueillies au cours des deux suivis 2009 et 2010 sont présentées ci-après sous forme de graphes et d'un tableau synthétique (tableau 2).

Résultats

Les cadres marqués en vert dans les graphes signalent les pics de mortalité.

Données du suivi de la turbidité en 2009 (Fig. 5) et 2010 (Fig. 6)

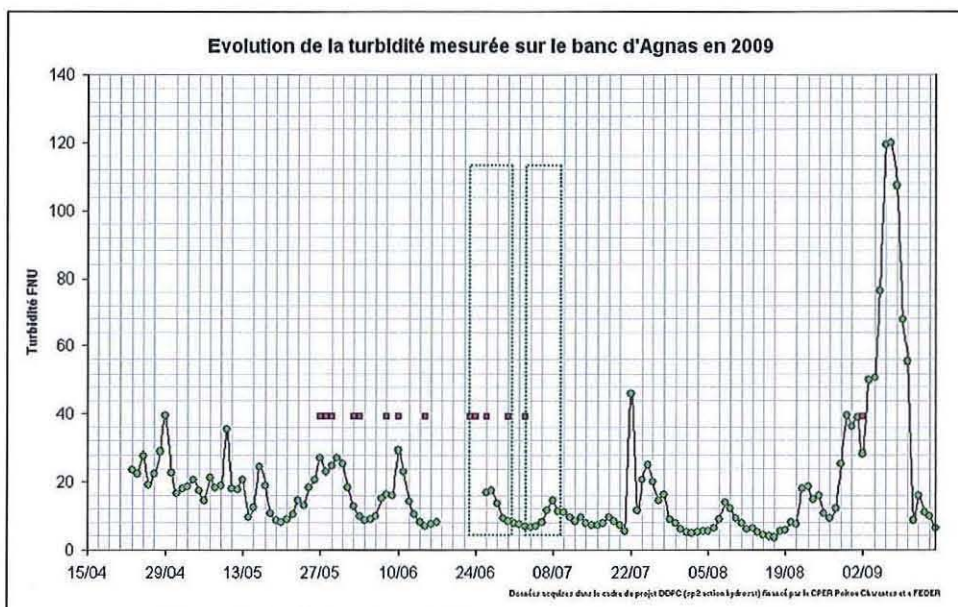


Figure 5 : Données du suivi de la turbidité en 2009 (en rose dates du suivi)

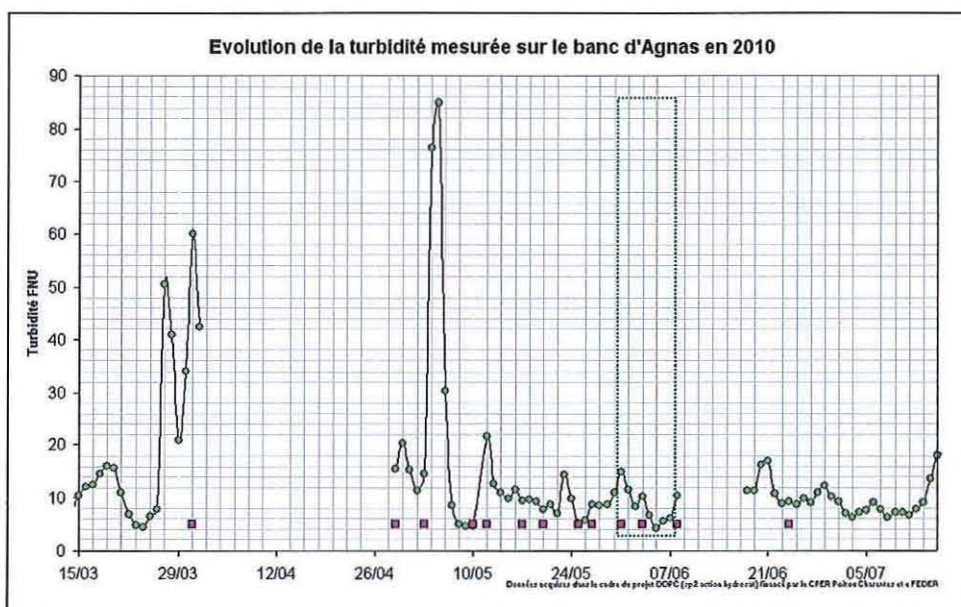


Figure 6 : Données du suivi de la turbidité en 2010 (en rose dates du suivi)

Résultats

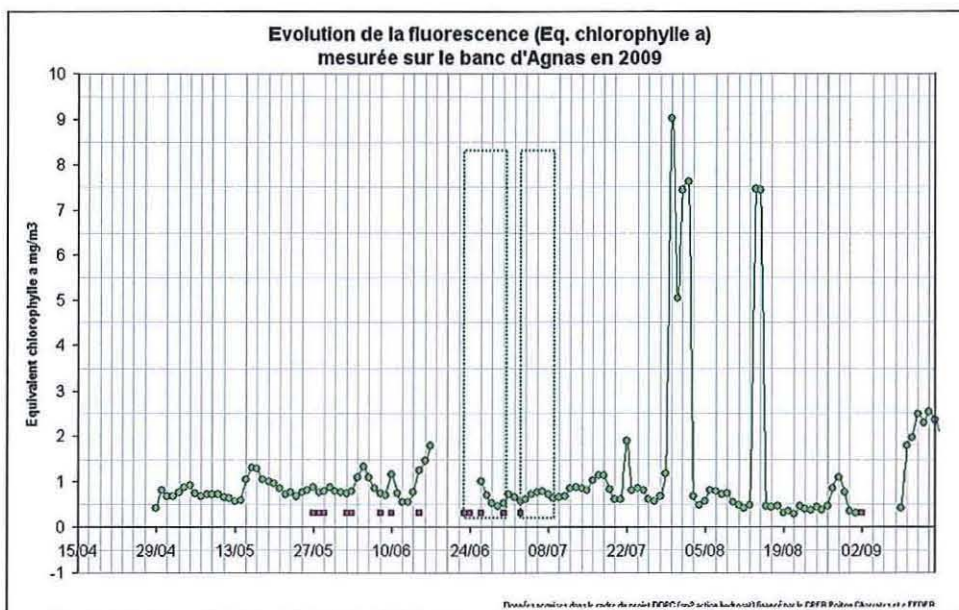


Figure 7 : Données du suivi de la fluorescence en 2009 (en rose dates du suivi)

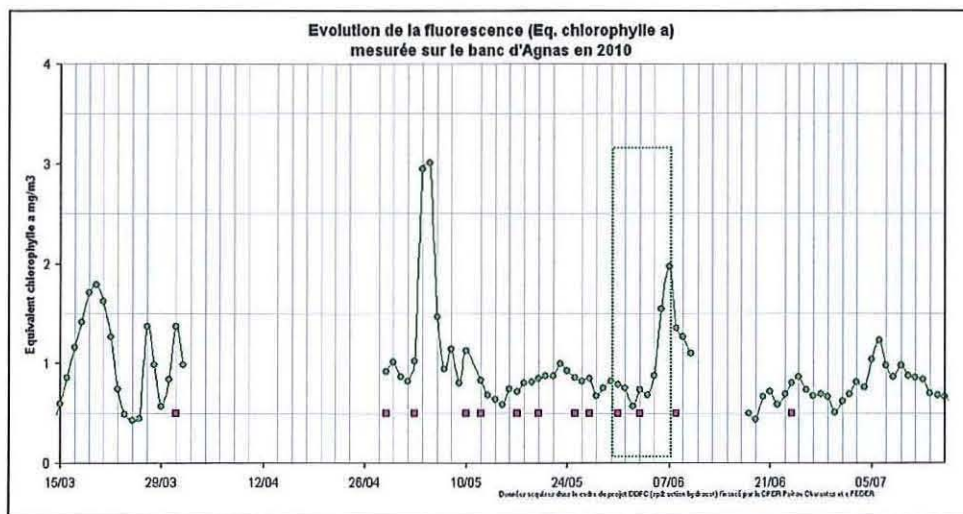


Figure 8 : Données du suivi de la fluorescence en 2010 (en rose dates du suivi)

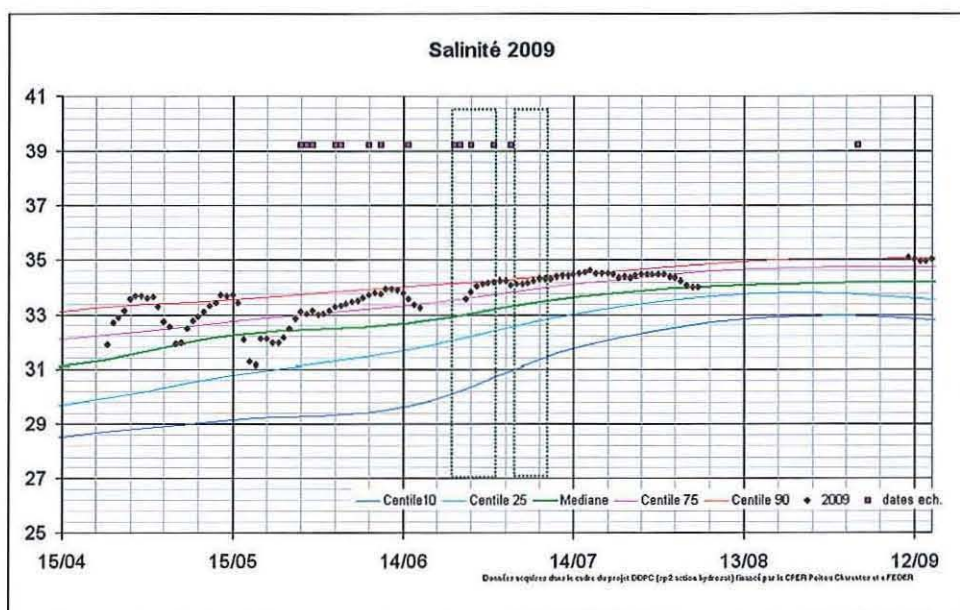


Figure 9 : Données du suivi de la salinité en 2009 (en rose dates du suivi)

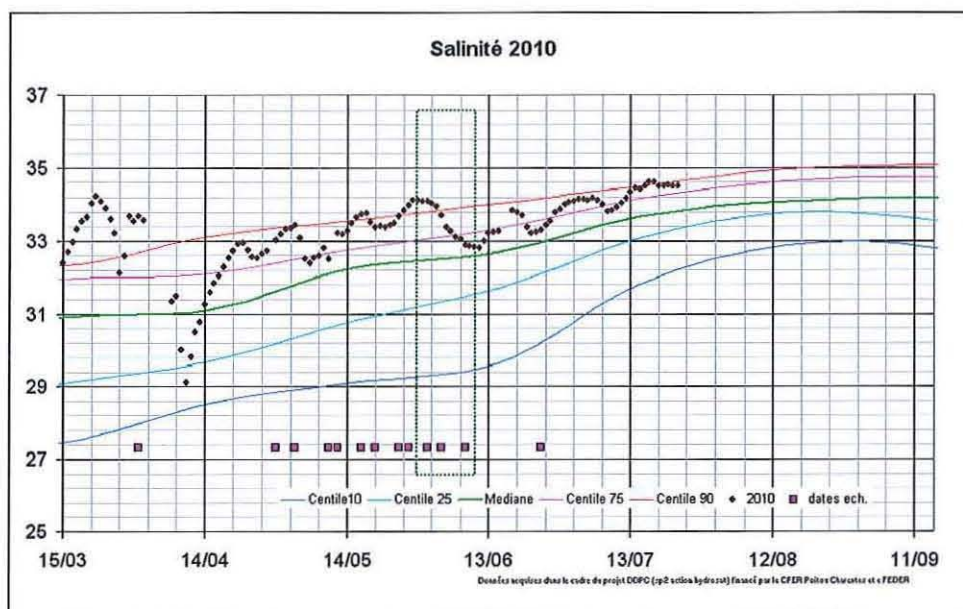


Figure 10 : Données du suivi de la salinité en 2010 (en rose dates du suivi)

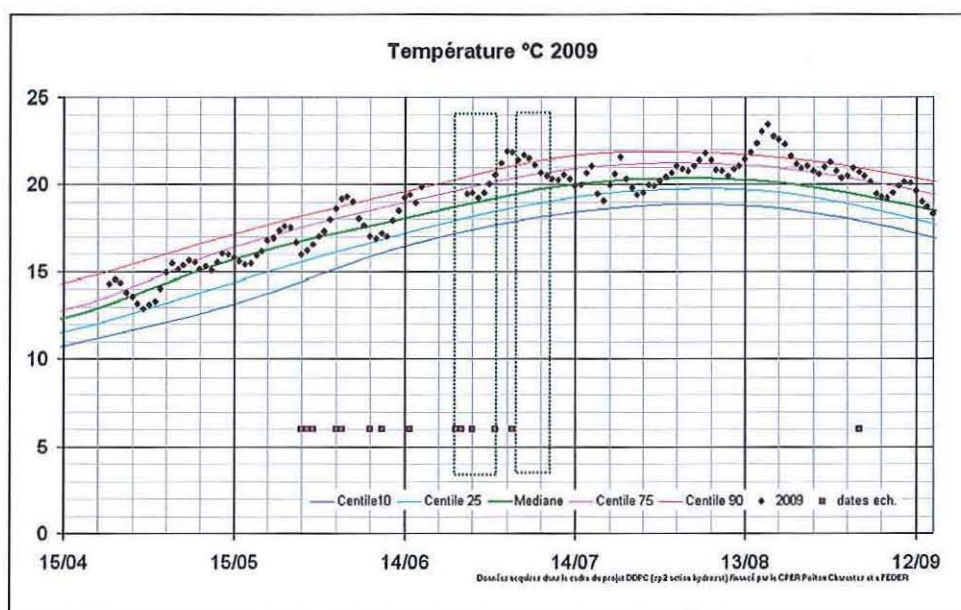


Figure 11 : Données du suivi de la température en 2009 (en rose dates du suivi)

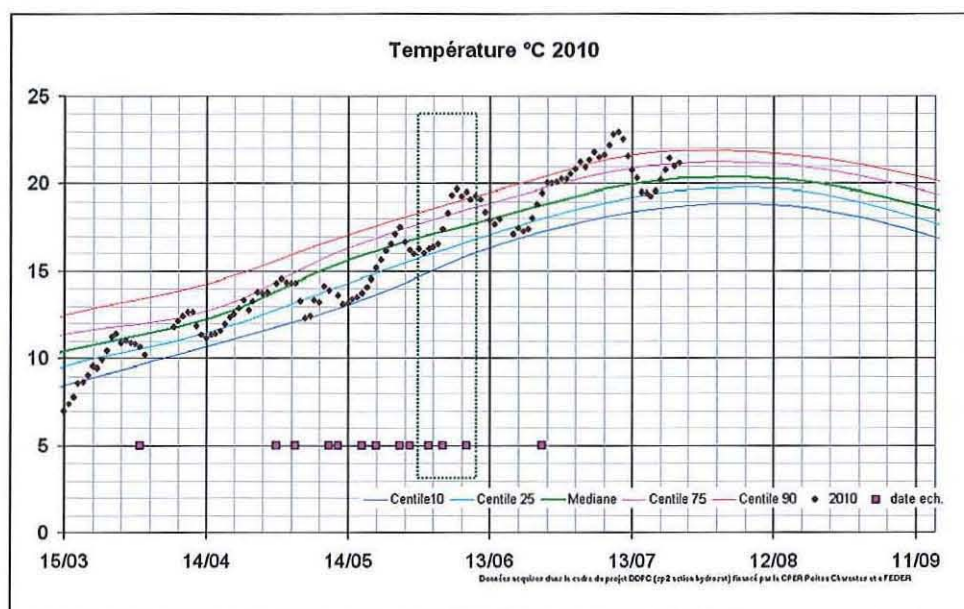


Figure 12 : Données du suivi de la température en 2010 (en rose dates du suivi)

Résultats

Tableau 2 : Résultats pour le suivi des paramètres environnementaux de l'eau de mer au niveau du site de d'Agnas pour les deux campagnes de suivis 2009-2010

		SUIVI 2009		SUIVI 2010	
		suivi du 27/05/09 au 02/09/09		suivi du 31/03/10 au 24/06/10	
		période 1ere mortalité : 20/06 au 29/06/09	date valeur	période 1ere mortalité : 30/05 au 08/06/10	date valeur
Temperature (°C)	Minimum	15,9	27/05/2009	10,17	01/04/2010
	Maximum	23,4	17/08/2009	20,4	25/06/2010
	date Température > 16°C	16,5	21/05/2009	16,5	23/05/2010
	Moyenne sur toute la période avant 1eres mortalités	17,85	/	13,25	/
	Moyenne /10 jours avant mortalité	18,48	/	16,31	/
	Moyenne /10 jours pendant mortalité	20,47	/	17,86	/
Salinite (g/L)	Minimum	32,46	25/05/2009	29,13	10/04/2010
	Maximum	34,58	17/07/2009	34,1	28/05/2010
	Moyenne sur toute la période avant 1eres mortalités	33,38	/	32,65	/
	Moyenne /10 jours avant mortalité	33,68	/	33,68	/
	Moyenne /10 jours pendant mortalité	34,06	/	33,55	/
Turbidité (FNU)	Minimum	3,63	17/08/2009	4,12	05/06/2010
	Maximum	28,36	02/09/2009	84	05/05/2010
	Moyenne sur toute la période avant 1eres mortalités	16,12	/	20,09	/
	Moyenne /10 jours avant mortalité	13,33	/	8,46	/
	Moyenne /10 jours pendant mortalité	10,38	/	8,85	/
équivalent Chlorophyle a (mg/m3)	Minimum	0,46	29/06/2009	0,44	19/06/2010
	Maximum	9,04	30/07/2009	3,01	05/05/2010
	Moyenne sur toute la période avant 1eres mortalités	0,92	/	1,02	/
	Moyenne /10 jours avant mortalité	1,03	/	0,84	/
	Moyenne /10 jours pendant mortalité	0,64	/	1,01	/
Oxygene (% saturation)	Minimum	d, mq	/	92,3	12/06/2010
	Maximum	d, mq	/	112,4	23/05/2010
	Moyenne sur toute la période avant 1eres mortalités	d, mq	/	101,48	/
	Moyenne /10 jours avant mortalité	d, mq	/	105,77	/
	Moyenne /10 jours pendant mortalité	d, mq	/	102,31	/

d. mq : donnée non disponible

Les données obtenues par capteurs 'haute fréquence' (T° & S‰₀, Fig 9, 10, 11, 12) sont comparées aux valeurs observées depuis 1977 (Réseau Ifremer RAZLEC et données Bulldoser 2009-2010).

En 2009, les périodes printanières et estivales (début) sont caractérisées :

- par des oscillations thermiques fluctuant autour de la médiane historique (+1°C) avec 3 pics centrés sur le 4 juin, 17 juin et 3 juillet,
- par des salinités globalement élevées (souvent proche des valeurs exceptionnelles en fin de printemps) et marquées ponctuellement par des chutes importantes - notamment entre le 15 et 25 juin, et début août-,
- par une dynamique phytoplanctonique faible.

Résultats

Le seuil thermique de 16°C est dépassé à partir du 21 mai conformément à la dynamique saisonnière.

Les salinités présentent des variations notables, 8 jours avant le premier pic de mortalité : une baisse de salinité est observée de 34‰ à 33.2‰, puis une augmentation jusqu'à 34.2‰ durant le pic de mortalité sur 10 jours (Fig. 9).

Parallèlement, les températures de masses d'eau font apparaître une augmentation significative de 3°C (17°C à 20°C) durant les 8 jours précédant le premier pic de mortalité (Fig. 11).

Les descripteurs turbidité et oxygène dissous ne présentent pas de caractéristiques remarquables ou de valeurs inhabituelles pouvant être associées aux mortalités observées.

Les printemps et été 2010 présentent les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- des températures en moyenne plutôt faibles jusqu'à fin mai, et plutôt élevées après. Des valeurs exceptionnelles sont relevées à 2 reprises, proches du 8 juin et du 10 juillet,
- les salinités sont particulièrement élevées sur l'ensemble de la période ; l'ensemble des valeurs journalières oscille entre la médiane et les maximums historiques. Une dessalure importante est observée en début de printemps.

Le seuil thermique de 16°C est dépassé à partir du 23 mai conformément à la dynamique saisonnière.

L'observation du premier pic de mortalité est concomitante avec une légère augmentation de salinité (< 1‰) durant les 4 jours précédents, jusqu'à atteindre 34‰ (Fig. 10). Les températures font apparaître une augmentation significative lors de la quinzaine qui précède le premier pic de mortalité : la température passe de 13°C à 17.5°C entre le 14/05 et le 26/05/10 (Fig. 12).

Les autres paramètres, turbidité, oxygène dissous et chlorophylle-a ne présentent pas de cinétiques remarquables ou des valeurs inhabituelles que l'on pourrait associer aux mortalités observées.

Lors des événements de mortalité, les années 2009 et 2010 sont caractérisées par des températures et des salinités plutôt élevées, par rapport aux données historiques. Il apparaît également que les développements phytoplanctoniques, pendant ces périodes, sont globalement inférieurs aux observations généralement faites.

4.1.3. Cinétique des agents infectieux *in situ*

4.1.3.1. Cinétique des agents infectieux en 2009

Détection et quantification des bactéries

La bactériologie classique a été réalisée à partir de broyats de chairs d'huîtres entières préalablement dilués en eau de mer artificielle stérile. Les échantillons ont ensuite été étalés sur des boîtes de Pétri remplies de Marine Agar, un milieu synthétique permettant

de cultiver la flore hétérotrophe totale d'origine marine. Ce travail a permis d'isoler plus d'une centaine d'isolats bactériens représentatifs des principaux types bactériens associés à chaque échantillon d'huître, après sélection des colonies présentant des caractéristiques macroscopiques différentes (couleur, forme, taille). Les travaux de séquençage, sur le gène 16S d'intérêt phylogénétique codant la sous unité ribosomale, de 45 isolats bactériens ont permis d'affilier une majorité d'isolats aux genres *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* (3/4 des souches). Le quart restant étant représenté par de nombreux autres genres bactériens tels que *Staphylococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Ruegeria*, *Pseudoamonobacter* ou *Alteromonas*. De façon surprenante, 21 isolats correspondant à des prélèvements du 2 et 3 juin (huîtres et moules) ont été identifiés comme appartenant au genre *Psychrobacter*, ce genre n'étant pas retrouvé dans des prélèvements effectués à d'autres dates. Tous les animaux analysés à ces dates (n=24) étaient fortement contaminés ou « infectés » par cette bactérie trouvée majoritaire, à des concentrations comprises entre 2×10^4 à 8×10^5 CFU/mg de tissus. Une infection expérimentale a été réalisée à partir de cinq isolats bactériens du genre *Psychrobacter*. L'injection en intramusculaire d'environ 10^8 CFU à des huîtres d'apparence saines n'a induit aucune mortalité en opposition au choix de l'utilisation, à titre de contrôle positif, d'une souche *V. splendidus* pathogène (LGP32). Ces résultats démontrent le **caractère non virulent des bactéries *Psychrobacter* isolées dans le cadre de cette étude**. Il semble par conséquent que l'association à forte concentration des ces bactéries au sein des tissus des huîtres suivies soit la résultante de l'activité de filtration des animaux et de la présence dans l'eau de mer de ce genre bactérien. Le fait que ces bactéries n'aient pas été détectées à d'autres dates de prélèvements indique néanmoins que la flore bactérienne présente dans l'eau de mer pourrait fortement évoluer d'un point de vue qualitatif à la faveur de paramètres environnementaux favorables dont la nature reste à préciser.

La bactériologie classique devait permettre un dénombrement des bactéries hétérotrophes totales. Le protocole de cryo-conservation utilisé lors de ce suivi devait en outre permettre de différer dans le temps les analyses bactériologiques effectuées en offrant la possibilité de grouper les analyses afin de limiter le temps d'analyse. Ce protocole s'est révélé décevant en introduisant un biais lié à la perte de cultivabilité de certaines bactéries, dont notamment celles appartenant à l'espèce *V. splendidus* (Fig. 13). C'est la raison pour laquelle les données de dénombrement obtenus lors de cette étude n'ont pas été exploitées et que nous avons fait le choix d'utiliser des extraits d'ADN de broyats d'huître pour la détection et quantification des bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* et à l'espèce *V. aestuarianus* en utilisant une technique de PCR quantitative nous permettant de nous affranchir de l'étape de culture des isolats bactériens. Bien que cette technique ait déjà été développée et publiée pour cette dernière espèce (Saulnier et al., 2009), il nous a fallu au préalable la mettre au point pour répondre aux objectifs de cette étude en ce qui concerne *V. splendidus*.

Résultats

La quasi-totalité des animaux échantillonnés (145/153 soit 95%) est porteuse de l'ADN bactéries appartenant au groupe de *V. splendidus* (Fig. 14). On observe de plus des niveaux variables d'un individu à l'autre compris entre 5×10^3 et 1×10^8 bactéries/g de tissus. Les charges bactériennes tendent à décroître du 27 mai, date de transfert des animaux sur site, au 10 juin ($6,4 \times 10^5$ bactéries/g), avant de ré augmenter ensuite du 10 au 24 juin (6×10^6 bactéries/g le 24 juin). Cette tendance précède l'apparition du 1^{er} pic de mortalité (20-29 juin). Peu avant la survenue du deuxième pic de mortalité (4-10 juillet), la quantité moyenne d'ADN bactérien chez les animaux infectés diminue (8×10^4 bactéries/g le 30 juin) puis ré augmente le 3 juillet.

En ce qui concerne les autres compartiments de l'élevage, l'ADN de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* a également été détecté chez la totalité des moules sauvages échantillonnées et prélevées à proximité des huîtres suivies. Les niveaux d'abondance se situent entre $1,1 \times 10^7$ bactéries/g le 29 mai et $6,5 \times 10^4$ bactéries/g le 3 juillet (Fig. 15). En revanche, l'ADN de l'espèce bactérienne *V. aestuarianus* n'a pas été détecté par PCR quantitative (Saulnier et al, 2009) dans aucun des extraits d'ADN analysés quelle que soit leur origine, suivi de naissains ou autres compartiments de l'élevage.

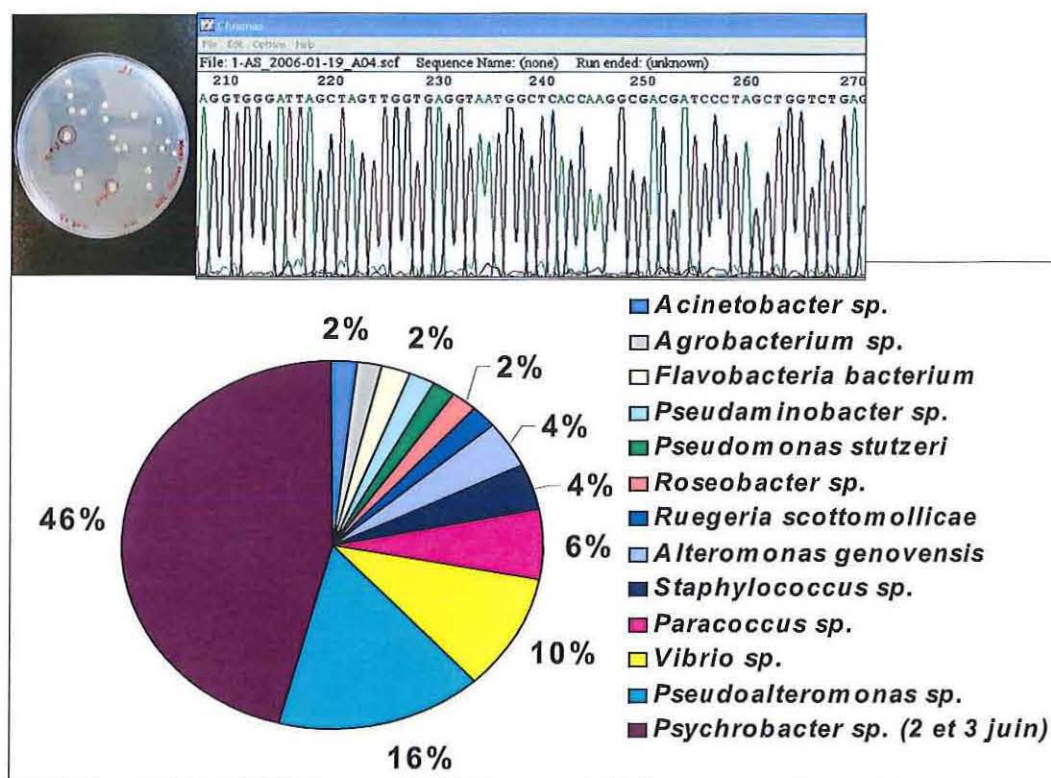


Figure 13 : Répartition des espèces bactériennes cultivables après cryoconservation sur la base du séquençage du gène 16S.

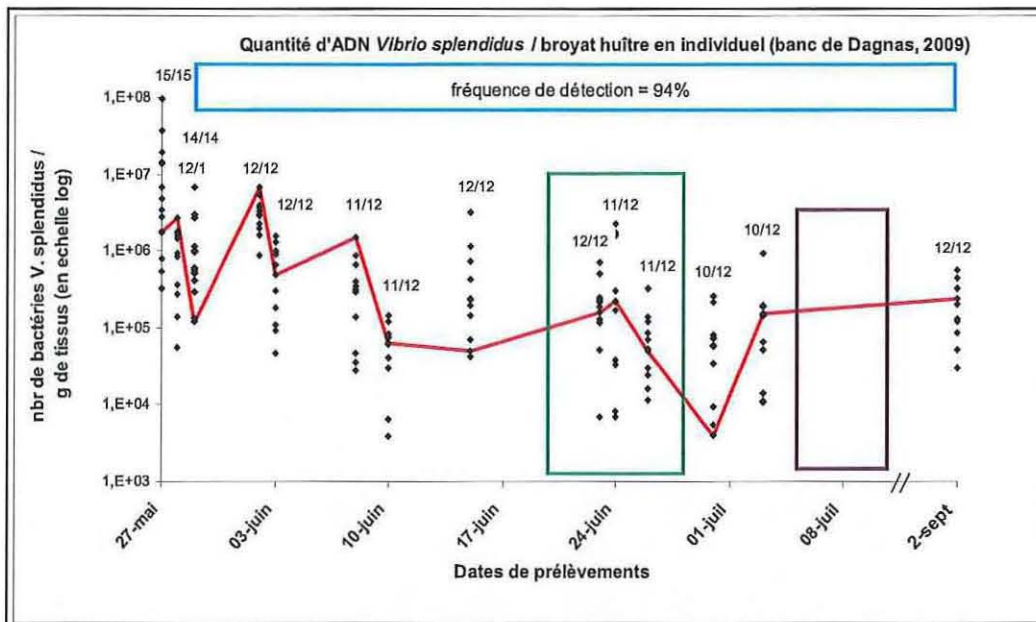


Figure 14: Détection et quantification de l'ADN de bactéries appartenant au genre *V. splendidus* chez le naissain *C. gigas* suivi (broyats sur individus entiers) analysé à un niveau individuel (losanges noirs). La quantification est exprimée en échelle logarithmique du nombre de bactéries *V. splendidus* détecté par gramme de tissu. La courbe rouge indique les variations des niveaux d'infection moyens des huîtres trouvées infectées selon la date de prélèvement considérée. Les cadres en vert et violet indiquent la période de survenue du 1^{er} et 2^{ème} pic de mortalité respectivement.

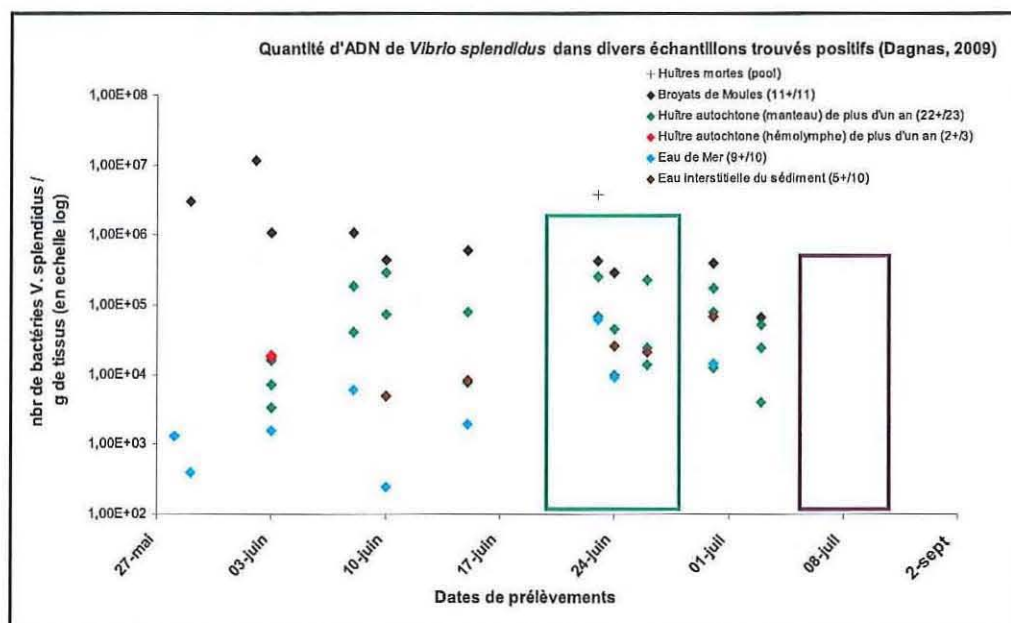


Fig 15 : Détection et quantification de l'ADN de bactéries appartenant au genre *V. splendidus* dans différents compartiments d'élevage prélevés aux mêmes dates que le naissain d'huître creuse suivi dans le cadre de cette étude (losanges). Les différents prélèvements (huîtres de plus d'un an, moules sauvages fixées sur les tables, eau de mer et eau interstitielle du sédiment) ont été prélevés à proximité du naissain d'huître creuse suivi. La quantification est exprimée en échelle logarithmique du nombre de bactéries *V. splendidus* détecté par gramme de tissu ou par millilitre d'échantillons d'eau. Les cadres en vert et violet indiquent la période de survenue du 1^{er} et 2^{ème} pic de mortalité respectivement.

Détection et quantification de l'ADN viral OsHV-1

Concernant la détection d'ADN d'OsHV-1 dans les échantillons d'huître (Fig. 16), on constate que de 1 à 10 huîtres sur les 12 analysées par date de prélèvement sont positives avant l'apparition des mortalités (27 mai au 17 juin), avec une prévalence moyenne sur cette période de 35%. Les huîtres trouvées positives présentent une charge en ADN viral variable d'un individu à l'autre, toujours inférieure à $5,2 \times 10^3$ copies d'ADN viral/mg de tissus. Par contre lors de la survenue du 1^{er} pic de mortalité (20-29 juin), toutes les huîtres analysées (à l'exception d'une huître) sont positives (prélèvements du 23 et 24 et 26 juin), soit une prévalence de 97%, avec des charges variables d'un individu à l'autre comprises entre 425 copies et $1,4 \times 10^6$ copies d'ADN viral/mg de tissus. Peu avant la survenue du deuxième pic de mortalité (prélèvements du 30 juin et 3 juillet), la prévalence en huîtres infectées diminue (6/12 et 8/12), soit 58%, ainsi que la quantité moyenne d'ADN viral chez les animaux trouvés infectés, avec des valeurs individuelles comprises entre 450 copies et $4,7 \times 10^5$ copies d'ADN viral/mg de tissus. Concernant le prélèvement du 2 septembre effectué après la survenue des deux épisodes de mortalité, de l'ADN d'OsHV-1 est détecté chez 9 des 11 huîtres analysées avec des quantités d'ADN viral faibles, comprises entre 200 à $1,2 \times 10^2$ copies d'ADN viral/mg de tissus.

En ce qui concerne les autres compartiments de l'élevage (Fig. 17), l'ADN d'OsHV-1 n'est jamais détecté dans l'eau interstitielle du sédiment. Trois des 10 prélèvements d'eau de mer sont trouvés faiblement positifs avec des charges comprises entre 1×10^3 à 4×10^3 copies d'ADN viral/ml (prélèvements du 8 et 23 juin ainsi que du 3 juillet). L'ADN d'OsHV-1 est détecté dans 2 des 10 pools de broyats de moules entières analysés (280 copies et $7,3 \times 10^4$ copies d'ADN viral/mg de tissus, le 29 mai et 24 juin respectivement) ainsi que dans les manteaux d'huîtres de plus d'un an (10/ 23 huîtres traitées individuellement), avec cependant des quantités d'ADN viral globalement faibles (< 670 copies/mg) à l'exception de deux individus présentant des quantités plus élevées de $4,2 \times 10^5$ copies (le 3 juin) et 1×10^5 copies/mg de tissus (le 30 juin). Ainsi de l'ADN viral est retrouvé entre le 29 mai et le 8 juin chez des huîtres adultes, des moules et un prélèvement d'eau de mer. La même constatation est faite dans d'autres prélèvements de même nature au moment de la survenue du 1^{er} pic de mortalité observée chez le lot d'huîtres suivies (20-29 juin).

Résultats

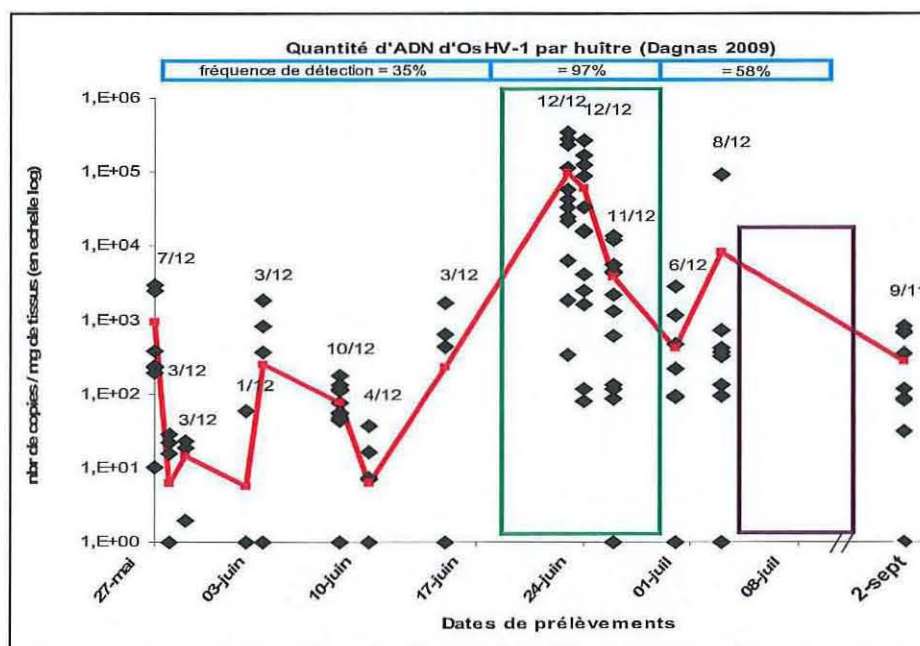


Figure 16 : Détection et quantification de l'ADN d'OsHV-1 chez le naissain *C. gigas* suivi (broyats sur individus entiers), analysé à un niveau individuel (losanges noirs). La quantification est exprimée en échelle logarithmique du nombre de copies d'OsHV-1 par milligramme de tissu. La courbe rouge indique les variations des niveaux d'infection moyens des huîtres trouvées infectées selon la date de prélèvement considérée. Les cadres en vert et violet indiquent la période de survenue du 1^{er} et 2^{ème} pic de mortalité respectivement.

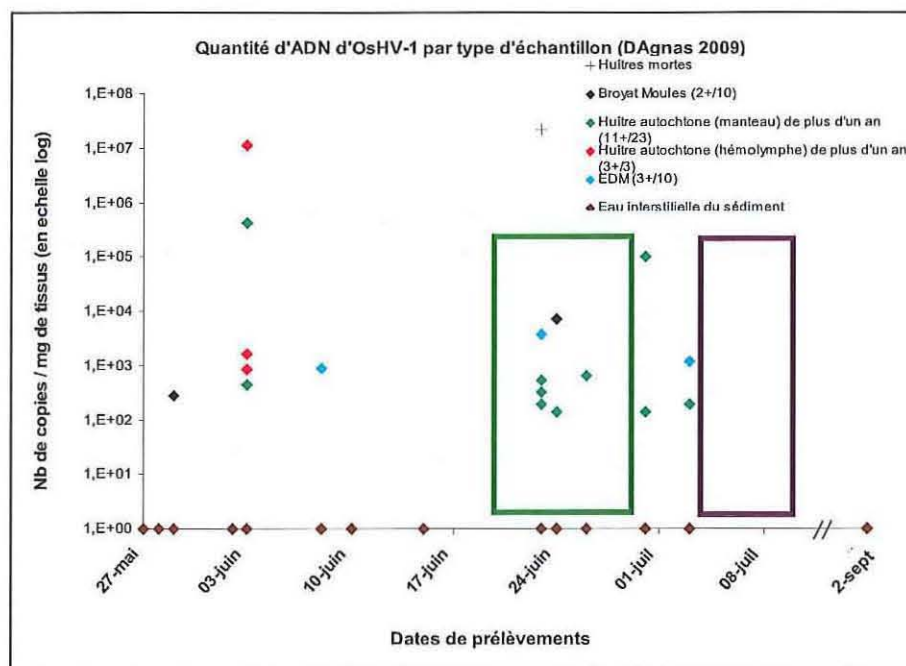


Figure 17: Détection et quantification de l'ADN d'OsHV-1 dans différents compartiments d'élevage prélevés aux mêmes dates que le naissain d'huître creuse suivi dans le cadre de cette étude. Les différents prélèvements (huîtres de plus d'un an, moules sauvages fixées sur les tables, eau de mer et eau interstitielle du sédiment) ont été prélevés à proximité du naissain d'huître creuse suivi. La quantification est exprimée en échelle logarithmique du nombre de copies d'OsHV-1 détecté par milligramme de tissus ou par millilitre d'échantillons d'eau. Les cadres en vert et violet indiquent la période de survenue du 1^{er} et 2^{ème} pic de mortalité respectivement.

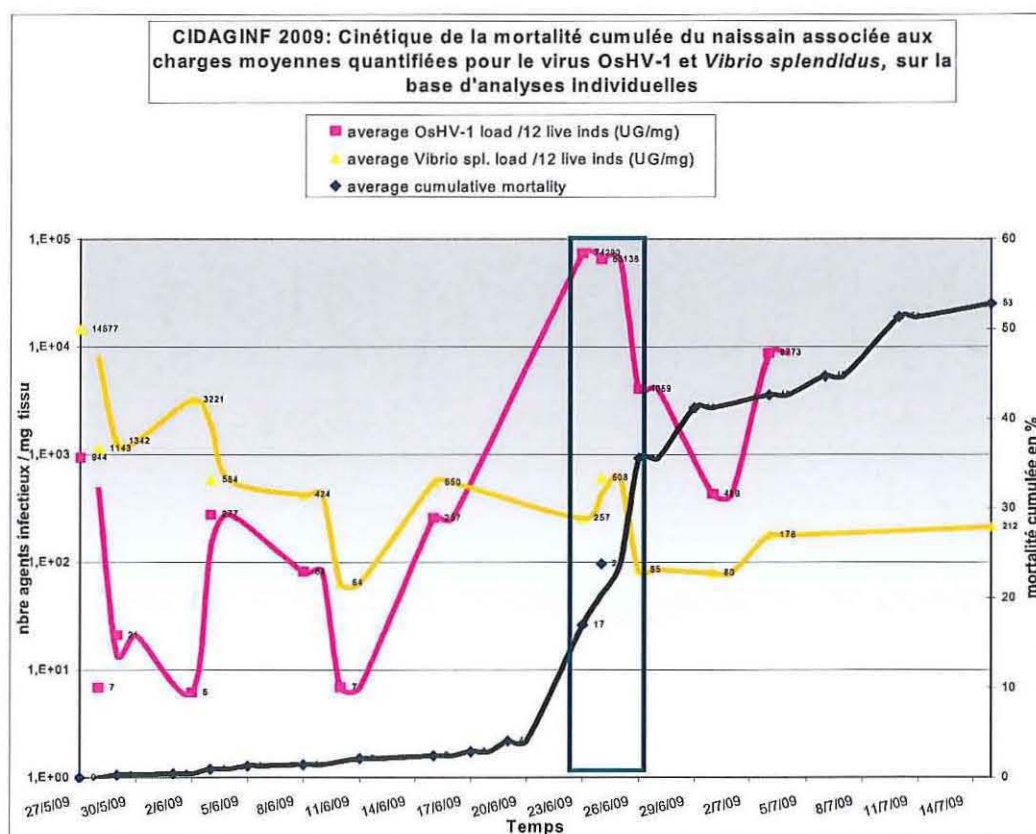


Figure 18: Cinétique de la mortalité cumulée du naissain d'huître creuse en 2009 (courbe noire) associée aux cinétiques de détection de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* (courbe orange) et du virus OsHV-1 (courbe mauve), le cadre vert figure le 1^{er} pic de mortalité. La quantification est exprimée en échelle logarithmique du nombre d'unités génomiques détectées par milligramme de tissus.

Il est observé que l'augmentation des charges virales précède le pic de mortalité et qu'en moyenne durant le pic il existe un facteur 100 par rapport aux charges constatées hors mortalité (Fig. 18). Cette tendance n'est pas observée pour l'évolution des charges en bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* durant cette période.

4.1.3.2. Cinétique des agents infectieux en 2010

Analyses pour la détection des agents infectieux en 2010

Détection et quantification des bactéries

La détection des bactéries dans les échantillons collectés au cours du suivi en 2010 a porté uniquement sur la recherche d'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus*, sans phase de culture ou d'isolement sur milieu synthétique. Une partie de ces analyses a été sous-traitée à un laboratoire agréé.

En 2010 comme en 2009, aucun échantillon issu d'animal vivant n'a présenté de signal positif pour la détection par PCR-Q de *Vibrio aestuarianus*.

Les échantillons de **naissain d'huître** testés au cours du suivi présentent de l'ADN de *Vibrio splendidus* pour toutes les dates de prélèvement. La fréquence de détection varie de 8% à 66% (Fig. 19). Entre T0 et T7, période hors mortalité, 35 individus sur 189 testés ont présenté un signal positif pour la détection de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus*, soit 18,5%. Pour ces échantillons, les charges maximales observées sont de $3,7 \times 10^6$ eq. UFC/mg avec une moyenne de $5,3 \times 10^6$ eq. UFC/mg (voir tableau 3). Entre T9 et T12, période avec mortalité, 28 individus sur 54 testés ont présenté un signal positif pour la détection de *V. splendidus*, soit 51,8%, associés à une charge maximale de $9,1 \times 10^4$ eq. UFC/mg.

Les huîtres mortes collectées et testées sont positives pour la détection d'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* (10/10).

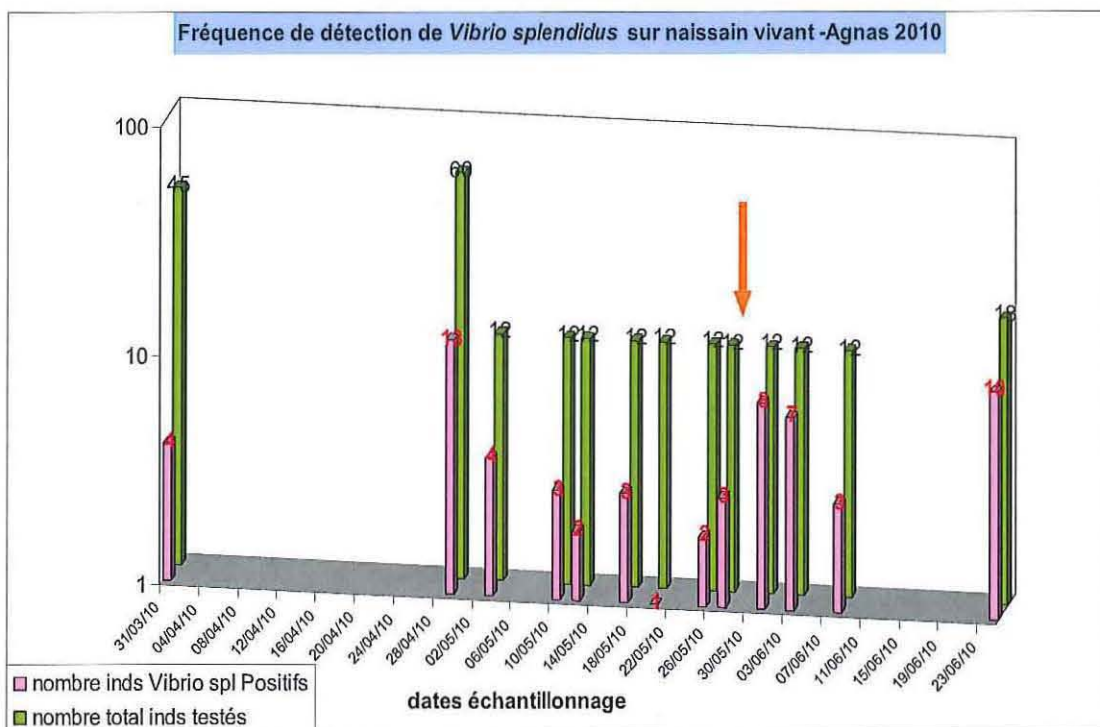


Figure 19 : Cinétique de détection des Vibrions sur le naissain. Les nombres correspondent aux d'individus trouvés positifs (histogramme rose), par rapport au nombre total d'individus testés (histogramme vert). Flèche : début des mortalités

En 2010, 120 **moules** ont été analysées individuellement. Les échantillons de moules testés au cours du suivi présentent de l'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* pour toutes les dates de prélèvement. La fréquence de détection varie de 40% à 100% (voir tableau 3). Entre T1 et T8, période hors mortalité, 61 individus sur 80 testés ont présenté un signal positif pour la détection de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus*, soit 76%. Pour ces échantillons, les charges maximales observées sont de $2,5 \times 10^6$ eq. UFC/mg avec une moyenne de $6,0 \times 10^5$ eq. UFC/mg (voir tableau 3). Entre T9 et T12, période avec mortalité, 36 individus sur 40 testés ont présenté un signal positif pour la détection de bactéries du groupe *V. splendidus*, soit 90%, associés à une charge maximale de $1,1 \times 10^6$ eq. UFC/mg.

Les échantillons de **balanes** testés pour la détection de l'ADN de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* sont limités à cinq dates (T6-T10) et 50 individus. L'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* est détecté pour les cinq dates analysées. La fréquence de détection varie de 30% à 80% (voir tableau 3) avec une charge moyenne de 2.6×10^2 eq. UFC/mg.

L'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* a été recherché dans l'**eau de mer** pour 12 dates (T1-T12). Quatre prélèvements ont présenté un signal positif, fin avril, début mai, début juin et fin juin (voir tableau 3). La moyenne des quantités détectées est de 4.4×10^3 eq. UFC/ μ L.

Détection et quantification de l'ADN viral OsHV-1

Concernant la détection d'ADN d'OsHV-1 dans les échantillons d'**huître** (Fig. 20), on constate que pour les deux premiers prélèvements qui comprennent respectivement 45 et 60 huîtres analysées individuellement, aucun signal OsHV-1 n'est décelé. Cet échantillonnage plus conséquent avait pour but d'augmenter la probabilité de détection dans un contexte de faible prévalence. Par la suite les six prélèvements suivants réalisés sur 12 individus ne présentent pas de signal pour l'ADN d'OsHV-1. A partir du 27 mai 2010, la fréquence de détection augmente et six individus sur 12 sont positifs pour la détection du virus. Quatre jours plus tard le prélèvement suivant montre une prévalence de 91.6% (11/12), et trois jours après, le 3 juin, une prévalence de 83% (10/12). Le 8 juin cette prévalence décroît et passe à 75% (9/12). Le 24 juin, sept individus sur 12 sont encore détectés positifs pour le virus (58%) (voir tableau 3). La charge virale moyenne observée pour cette période est de $3,3 \times 10^8$ copies/mg avec une charge maximale de $1,1 \times 10^9$ copies/mg. La charge virale moyenne observée pour 13 huîtres collectées mortes est de $1,4 \times 10^8$ copies/mg. Pour le naissain d'huître, les charges virales supérieures à $1. \times 10^4$ copies/mg sont le signe d'une infection aiguë à OsHV-1 associée à un grand nombre de répliquations virales qui vont engendrer la mort de l'hôte.

Les prélèvements de **moules** permettent la détection d'ADN viral sur quelques individus (7 /120) sans que les charges virales associées soient signe de répllication (<10+2 copies/mg). De l'ADN viral d'OsHV-1 a été détecté hors période de mortalité, à T1 et T4. Comme observé lors de la campagne 2009, les moules peuvent présenter de l'ADN viral sans être affectées (absence de mortalité), il peut s'agir d'un portage passif (contamination).

Pour la première fois de l'ADN viral d'OsHV-1 a été recherché dans **les balanes** sur 9 points de prélèvement (90 échantillons testés). Les échantillons de balanes testés ont présenté un signal positif pour 5 dates, 3 hors périodes de mortalité (T1, T2, T5) et 2 au cours du pic de mortalité (T10 et T11). La fréquence de détection pour ces dates varie de 20% à 50% (voir tableau 3) avec des charges virales très faibles et non quantifiables (<10 copies ADN OsHV-1/ng d'ADN).

Les prélèvements **d'eau de mer** ont permis la détection d'ADN viral pour deux dates (T8 et T9) sur les 11 analysées (voir tableau 3), avec un signal très faible (<10 copies/ μ L), résultat déjà observé durant la campagne 2009. Hors période de mortalité, de T1 à T7, l'ADN viral n'est pas détecté, il est décelé le 27 mai, 4 jours avant l'apparition des premières mortalités.

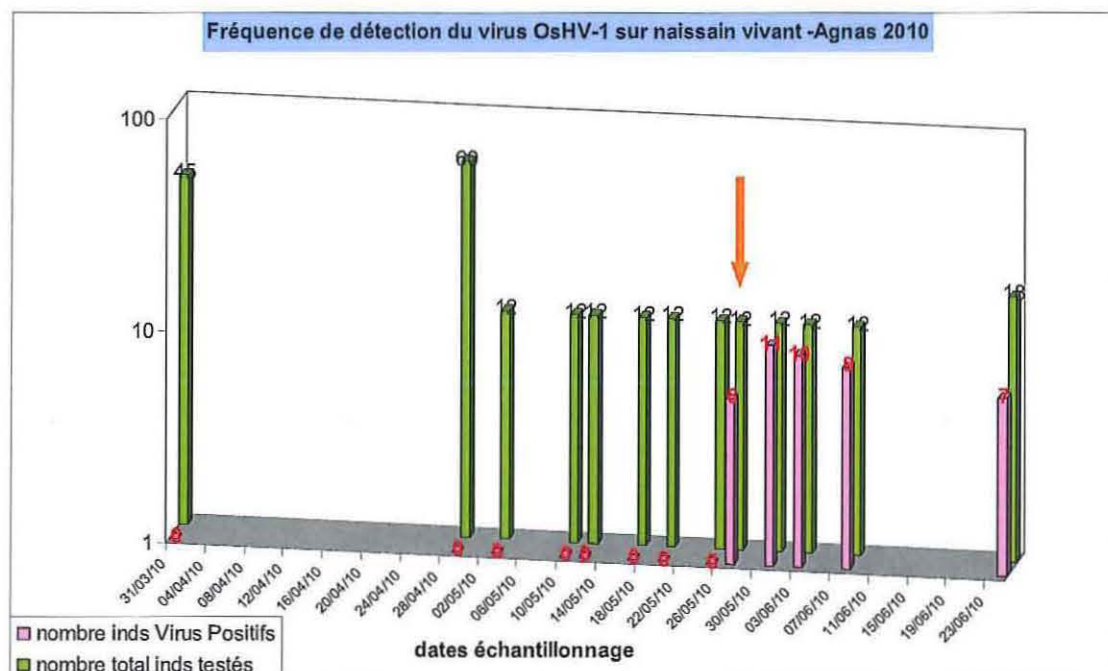


Figure 20 : Cinétique de détection de l'ADN viral sur le naissain. Les nombres correspondent aux d'individus trouvés positifs (histogramme rose), par rapport au nombre total d'individus testés (histogramme vert). Flèche : début des mortalités.

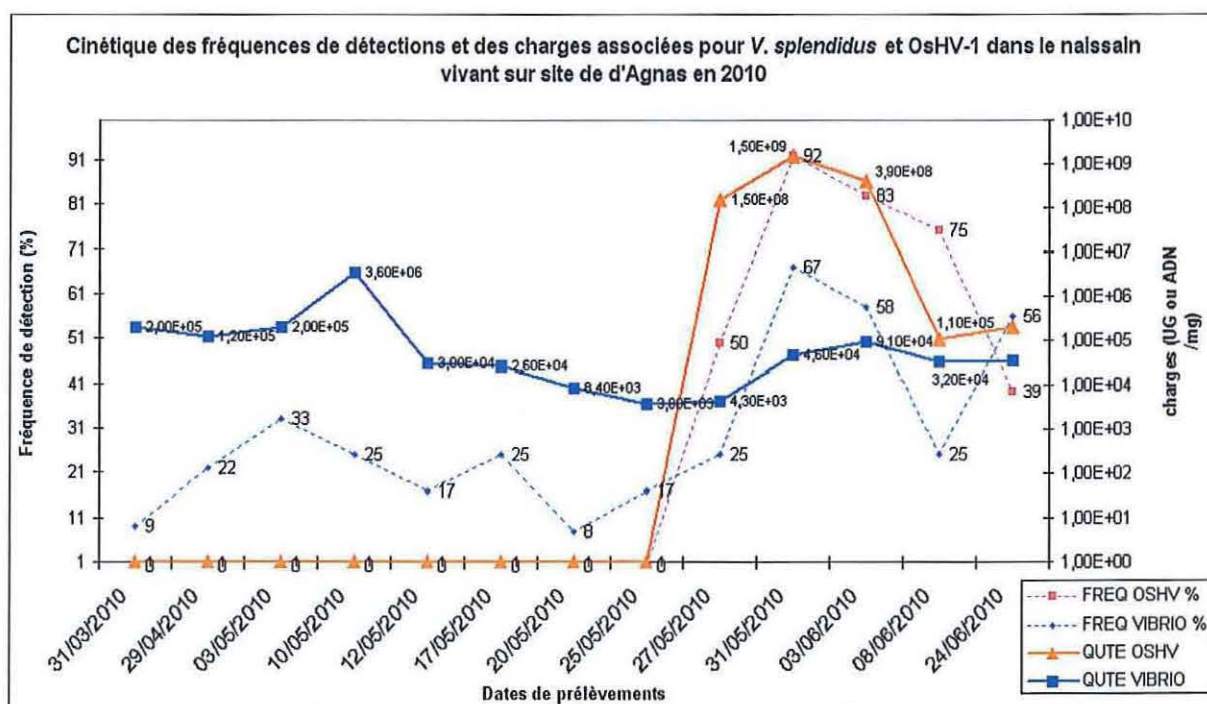


Figure 21 : Cinétique de la fréquence de détection de l'ADN de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* et du virus OsHV-1 ainsi que les charges associées dans le naissain échantillonné vivant sur le banc d'Agnas entre fin mars et fin juin 2010.

En 2010, la **cinétique de détection des agents infectieux** étudiés dans le naissain d'huîtres montre, que l'ADN des bactéries du groupe *V. splendidus* est observé pour toutes les dates du suivi de mars à juin avec hors période de mortalité une fréquence de détection minimale de 8% et durant le pic de mortalité elle atteint 67%. La cinétique de détection du virus OsHV-1 est différente, avec absence totale de détection de mars jusqu'au 27 mai, détection dans 50% des huîtres testées ce même jour, pour atteindre 92% 4 jours plus tard (Fig. 21). Cette évolution brutale de la fréquence de détection d'OsHV-1 de 0% à 92% en 6 jours est associée à une mortalité cumulée de 5%, calculée sur 3 poches de 500 individus (Fig. 4).

Type échantillon testé	Agents infectieux	Tests	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	
echs de naissains	virus OsHV-1	fréquence de détection	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	92%	83%	75%	39%
		charge maxi associée (/mg)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,50E+08	1,10E+09	3,90E+08	1,10E+05
	V. splendidus	fréquence de détection	9%	22%	33%	25%	17%	25%	8%	17%	25%	25%	67%	58%	25%	56%
		charge maxi associée (/mg)	2,0E+05	1,2E+05	2,0E+05	3,7E+06	3,0E+04	2,6E+04	8,4E+03	3,8E+03	4,3E+03	4,3E+03	4,6E+04	9,1E+04	3,2E+04	3,4E+04
echs de moules	virus OsHV-1	fréquence de détection	d. mq	20%	0%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	10%	10%	14%	
		charge maxi associée (/mg)	d. mq	<10	0	0	<10	0	0	0	0	0	0	<10	<10	<10
	V. splendidus	fréquence de détection	d. mq	80%	80%	40%	90%	100%	50%	100%	70%	80%	90%	90%	100%	
		charge maxi associée (/mg)	d. mq	4,4E+04	1,3E+05	5,9E+04	1,0E+06	5,7E+05	1,9E+04	5,0E+05	2,5E+06	1,2E+06	2,2E+06	2,1E+05	6,6E+05	
echs de balanes	virus OsHV-1	fréquence de détection	d. mq	20%	30%	d. mq	d. mq	30%	0%	0%	0%	0%	40%	50%	d. mq	
		charge maxi associée (/ng)	d. mq	<10	<10	d. mq	d. mq	<10	0	0	0	0	<10	<10	d. mq	
	V. splendidus	fréquence de détection	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	30%	70%	40%	50%	80%	d. mq	d. mq	
		charge maxi associée (/ng)	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	d. mq	1,0E+01	1,0E+02	1,0E+03	1,0E+02	1,0E+02	d. mq	d. mq	
echs Eau de Mer	virus OsHV-1	fréquence de détection	d. mq	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	présence	présence	absence	absence	d. mq
		charge maxi associée (µL)	d. mq	0	0	0	0	0	0	0	0	<10	<10	0	0	d. mq
	V. splendidus	fréquence de détection	d. mq	présence	présence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	présence	présence
		charge maxi associée (µL)	d. mq	1,1E+03	1,1E+03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1E+03	1,3E+04
*d. mq : donnée manquante		Mortalité du naissain	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	

Tableau 3 : Résultats globaux pour la cinétique de détection des agents infectieux en 2010, dans le naissain, les moules, les balanes et l'eau de mer.

4.1.4. Évaluation de l'effet de traitements antibiotiques sur des lots d'huîtres creuses subissant un épisode de surmortalité (31 Mai 2010) en baie de Marennes Oléron

Vers une hypothèse bactérienne et non virale des causes de cette mortalité ?

Contexte et objectifs

Dans le cadre du suivi cinétique mené en 2010 sur le site d'Agnas et compte tenu des nombreux cas de co-infections OsHV-1-*Vibrio splendidus* relatés les années précédentes chez des lots d'huîtres creuses subissant des épisodes de mortalité, il a été planifié de tester l'effet de traitements antibiotiques sur des lots d'huîtres creuses suivis dans le cadre de l'action Cidaginf 2010 et confrontés à des mortalités.

Démarche

Le suivi de la mortalité à pas de temps rapprochés a été effectué et a permis de prélever des animaux au plus près de l'événement.

Une fois les premières mortalités déclarées *in situ* sur les quatre lots suivis sur site, quelques huîtres **d'apparence saine** ont été sélectionnées le 3 Juin 2010 (1^{ère} expérimentation) puis une seconde fois le 8 Juin 2010 (2^{ème} expérimentation) au sein de chacun des lots avant d'être transférées par bateau dans les installations du LGP (2 à 3 heures de temps de transport). Les animaux sélectionnés une deuxième fois sur le critère « huître **d'apparence saine** », une fois parvenus dans les installations du LGP, ont été placés dans des aquariums (J0) remplis d'eau de mer (2,5L) traitée aux UV (n=20 animaux) thermo-régulés à 18°C, puis traités ou non avec un antibiotique à large spectre vis-à-vis des bactéries Gram négatif. Les animaux n'ont pas été nourris durant la totalité de l'expérimentation. Un suivi quotidien des mortalités a été effectué avec un retrait régulier des animaux ayant succombé.

Résultats

- **Observation des mortalités *in situ***

Le suivi régulier des lots de naissains (500 animaux par poche et par lot) révèle que les premières mortalités apparaissent le 31 Mai 2010 chez le lot « OC » notamment (5,1%). Entre le 29 Mars et le 27 Mai inclus, 8 suivis sont réalisés et aucune mortalité n'est observée dans aucun des lots étudiés (Fig. 4). Par contre au 3 Juin la mortalité cumulée est de plus de 25% (entre 27,6% et 80,7% selon le lot considéré) et de plus de 50% (56,5% à 93,4%) le 8 Juin.

A noter que la température de l'eau atteint pour la première fois le seuil de 16°C le 22 Mai 2010 (cf. Fig. 12).

- **Observation des mortalités *ex situ***

➤ 1^{ère} expérimentation

Plusieurs lots d'huîtres ont été testés. Aucun effet différentiel du traitement antibiotique n'a été observé entre les lots d'huîtres testés : le graphique 22 ci-après représente donc les mortalités cumulées observées tous lots confondus (6 aquariums/condition, 20 ind./aquarium, écarts types représentant la variabilité inter-bac). **L'antibiotique réduit significativement les mortalités sans les annihiler pour autant.** La faiblesse physiologique des huîtres ou les forts niveaux d'infection probables à J0 (4 jours après le déclenchement des mortalités *in situ*) pourrait expliquer la réduction de l'efficacité des traitements antibiotiques.

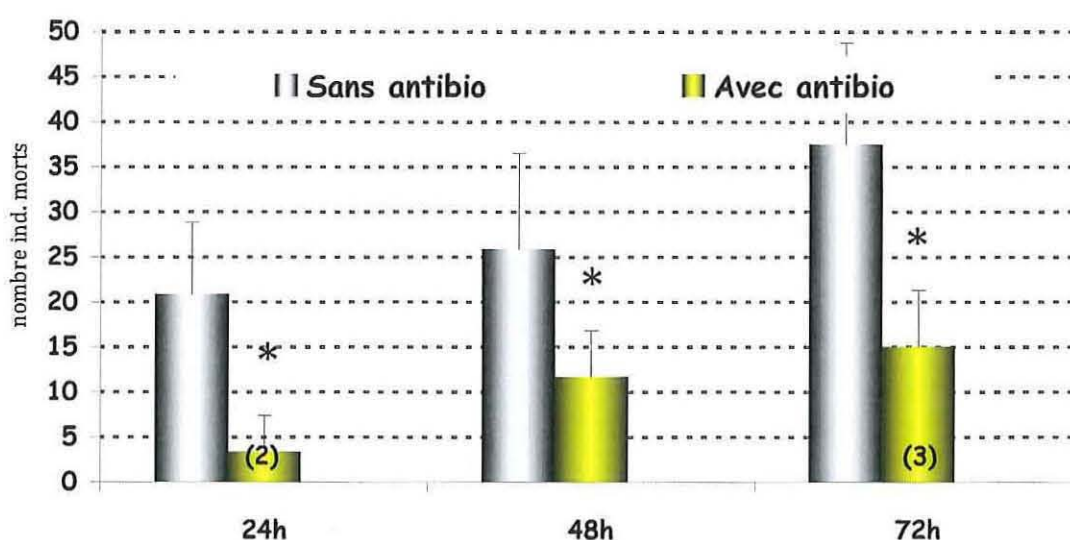


Fig. 22 : Évolution des mortalités cumulées observées en aquarium lors de la première expérimentation en fonction des traitements : absence d'antibiotique ou ajout d'antibiotique dans l'eau des aquariums. Les indications (2) et (3) signifient que des changements d'eau de mer avec de la nouvelle eau préalablement traitée aux UV ont été réalisés chez la totalité des aquariums, ainsi que de nouveaux traitements antibiotiques au temps correspondant (24h et 72h respectivement). * Les différences de mortalité entre animaux traités et non traités à l'antibiotique sont significatives $p < 0,01$ (Chi2).

Les résultats révèlent la nature bactérienne d'un agent causal des mortalités observées chez ces lots d'huîtres prélevées dans le bassin de Marennes-Oléron. Les mortalités résiduelles observées chez les animaux traités aux antibiotiques suggèrent soit une posologie non adéquate ou non optimale (3 administrations ont été réalisées à T0, 24h et 72h), soit une cause non exclusive suggérant l'implication d'un autre agent infectieux dans ces épisodes de mortalité insensible au traitement antibiotique. Au 3 juin les animaux échantillonnés *in situ* présentaient en effet une fréquence de détection de 58% pour l'ADN de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* avec une charge de 9×10^4

UG/mg et de 83% pour l'ADN du virus OsHV-1 avec une charge de 4×10^8 UG/mg (voir tableau 3).

➤ 2^{ème} expérimentation

Seul un lot d'huîtres diploïdes « OC » a pu être testé 8 jours après le déclenchement des mortalités (le 8 juin 2010), ne disposant plus d'un nombre suffisant d'animaux provenant d'autres lots suivis *in situ*. **Les traitements antibiotiques réduisent considérablement les mortalités dans les 6 bacs suivis** (graphique 23 ci-dessous). Il est intéressant de noter cependant que 2 des 6 bacs témoins suivis ne subissent pas de mortalités significatives, d'où l'importance des écarts types. Ces résultats semblent indiquer soit que les animaux sélectionnés n'étaient pas tous infectés lors du prélèvement soit que les individus survivants de l'épisode de mortalité (au 8 Juin 2010) ont une capacité à juguler naturellement leur infection. Quoi qu'il en soit, les traitements antibiotiques effectués présentent une réelle efficacité (environ 10% de mortalité cumulée à J10 versus 60% pour les bacs contrôles) en réduisant les mortalités de façon significative dès J3 ($p=0,019$).

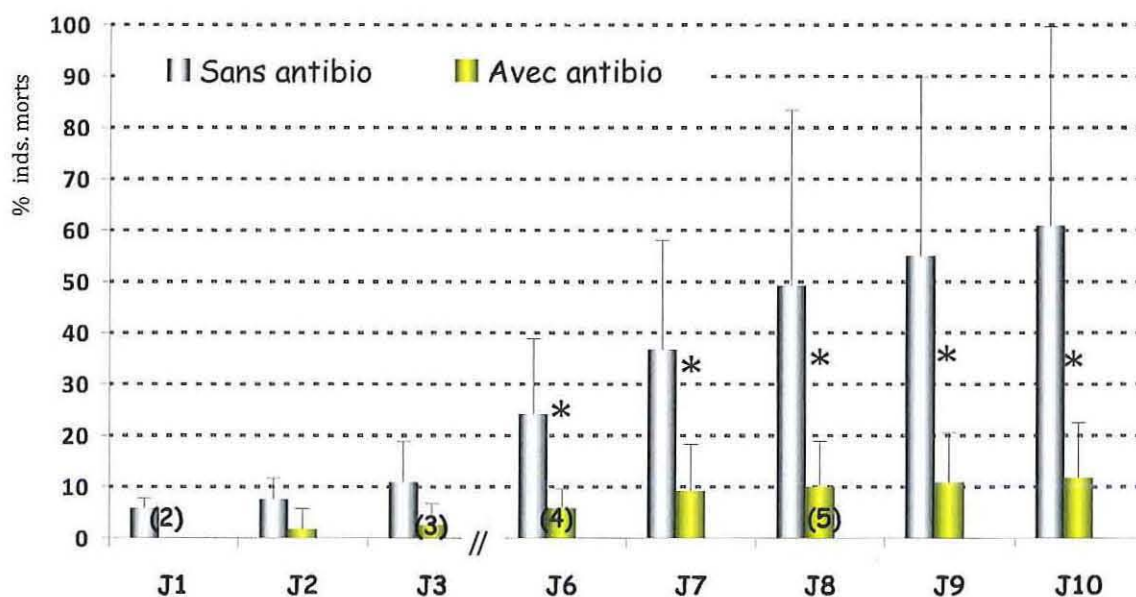


Fig. 23 : Évolution des mortalités cumulées observées en aquarium lors de la deuxième expérimentation en fonction des traitements : absence d'antibiotique ou ajout d'antibiotique dans l'eau des aquariums. Les indications (2) à (5) signifient que des changements d'eau de mer avec de la nouvelle eau préalablement traitée aux UV ont été réalisés chez la totalité des aquariums, ainsi que de nouveaux traitements antibiotiques au temps correspondant (J1 à J8 respectivement). * Les différences de mortalité entre animaux traités et non traités à l'antibiotique sont significatives $p < 0,01$ (Chi2).

- **Recherche et quantification d'agents infectieux chez l'huître creuse *C. gigas***

Des analyses diagnostiques en PCR quantitative ciblant le groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus* et OsHV-1 réalisées **sur 30 animaux survivants** récoltés au cours de la 2^{ème} expérimentation ont permis d'apporter des informations complémentaires (Figure 24). Les animaux prélevés ont été conservés à - 80°C puis transférés au laboratoire IDHESA qui a réalisé les analyses diagnostiques à un niveau individuel (1 huître prélevée = 1 analyse) à partir d'ADNs extraits d'un broyat total de l'animal.

➤ **Résultats d'analyse des 30 animaux survivants récoltés**

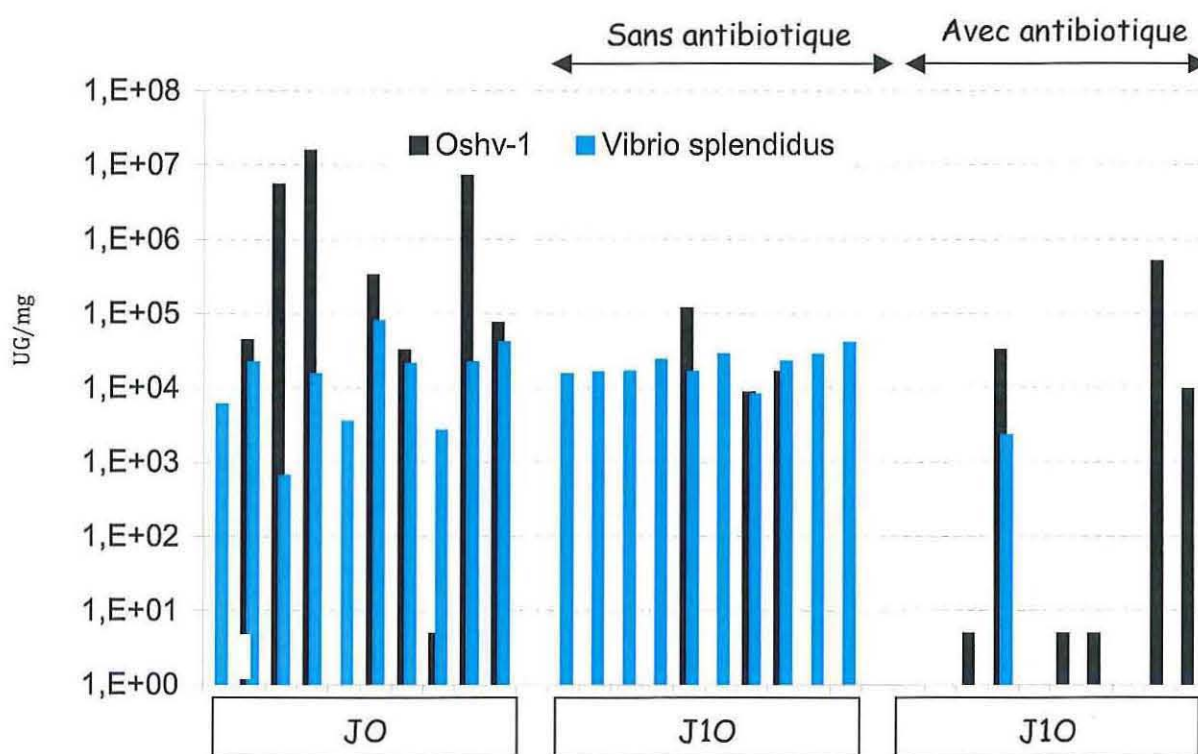


Fig. 24 : Analyse du portage individuel (charges bactérienne et virale) chez les animaux prélevés vivants à J0 et à J10 lors de l'essai antibiotique. Lorsque les résultats d'analyse ont révélé de faibles quantités, non quantifiables, d'ADN d'OsHV-1, une valeur de 5 copies d'OsHV-1 a été arbitrairement attribuée. Ces faibles niveaux de portage n'apportant pas la démonstration d'une infection en cours (réplication active du virus), les animaux correspondant n'ont pas été comptabilisés pour le calcul de la prévalence à OsHV-1.

Premier constat : En ce qui concerne les animaux n'ayant pas subi de traitement antibiotique, la totalité d'entre eux (10/10) présentent à J0 des taux élevés de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* ($0,67-29 \times 10^3$ équivalent CFU/mg de tissu) tandis que 7 d'entre eux (7/10) sont également porteurs d'OsHV-1 à des niveaux également élevés ($3,3-1600 \times 10^4$ copies par mg de tissu).

Dix jours (J10) après stabulation en aquarium, chez les animaux sans traitement antibiotique, 10/10 sont encore porteurs de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* à des taux élevés ($8,4-41 \times 10^3$) contre trois seulement pour l'herpès virus ($0,9-12 \times 10^4$).

Deuxième constat : En ce qui concerne les animaux traités à l'antibiotique, un seul (1/10) présente encore un taux élevé de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* ($2,4 \times 10^3$) contre 3/10 encore porteurs d'OsHV-1 ($1-51 \times 10^4$) à J10.

Sachant que le traitement antibiotique s'avère efficace pour contrer les mortalités avec une réduction des mortalités au dixième jour du traitement de 61% (en l'absence de traitement) à 11% et que les antibiotiques sont réputés pour n'agir que sur les bactéries et non sur les virus,

On peut donc avancer les conclusions suivantes :

- De J0 à J10 et en l'absence de traitement antibiotique, les bactéries du groupe polyphylétique de *V. splendidus* persistent à une prévalence similaire (10/10) chez les animaux survivants et à des taux élevés alors que l'infection virale touche moins d'individus ou en tue davantage, ce qui diminuerait sa prévalence chez les animaux après 10 jours d'infection.
- De J0 à J10 et en présence de l'antibiotique, la prévalence des animaux infectés par des bactéries du groupe *Vibrio splendidus* diminue considérablement (de 10/10 à 1/10) ce qui confirme l'efficacité de l'antibiotique utilisé contre ce type de vibriose. En revanche, l'infection virale reste à des taux et des prévalences similaires ou inchangés (de 3/10 sans antibiotique à J10 à 3/10 avec antibiotique à J10 contre une prévalence à J0 de 7/10), ce qui invalide l'hypothèse précédente selon laquelle la prévalence diminuerait du fait d'une mortalité supérieure des huîtres infectées induite par l'herpès virus.

Et formuler quelques remarques :

- La mortalité observée sur estran en pleine période de surmortalité (printemps 2010) peut être contrée par un traitement antibiotique, du moins dans les conditions où celui-ci a été évalué, *i.e. ex situ*, après transfert des animaux en aquarium et mise en place de conditions contrôlées (température notamment) incluant également la récupération et le traitement des effluents contenant l'antibiotique.
- Alors que les huîtres survivantes semblent être capables de limiter voire juguler au fil du temps leur infection virale avec ou sans antibiotique, elles sont incapables en revanche de diminuer leur portage en *Vibrio* bactéries appartenant au groupe en l'absence de traitement antibiotique.
- Les cas de co-infections bactéries du groupe *V. splendidus* - OsHV-1 chez des animaux prélevés vivants et non soumis à un traitement antibiotique diminuent avec le temps (de 7/10 en J0 à 3/10 en J10).

Des analyses diagnostiques en PCR quantitative ciblant le groupe polyphylétique de *V. splendidus* et OsHV-1, réalisées sur **35 animaux morts** récoltés au cours de la 2^{ème} expérimentation, ont permis d'apporter des informations complémentaires (Figure 25). Les animaux prélevés ont été conservés à - 80°C puis transférés au laboratoire IDHESA qui a réalisé les analyses diagnostiques à un niveau individuel (1 huître prélevée = 1 analyse) à partir d'ADNs extraits d'un broyat total de l'animal.

➤ *Résultats d'analyse des animaux morts récoltés*

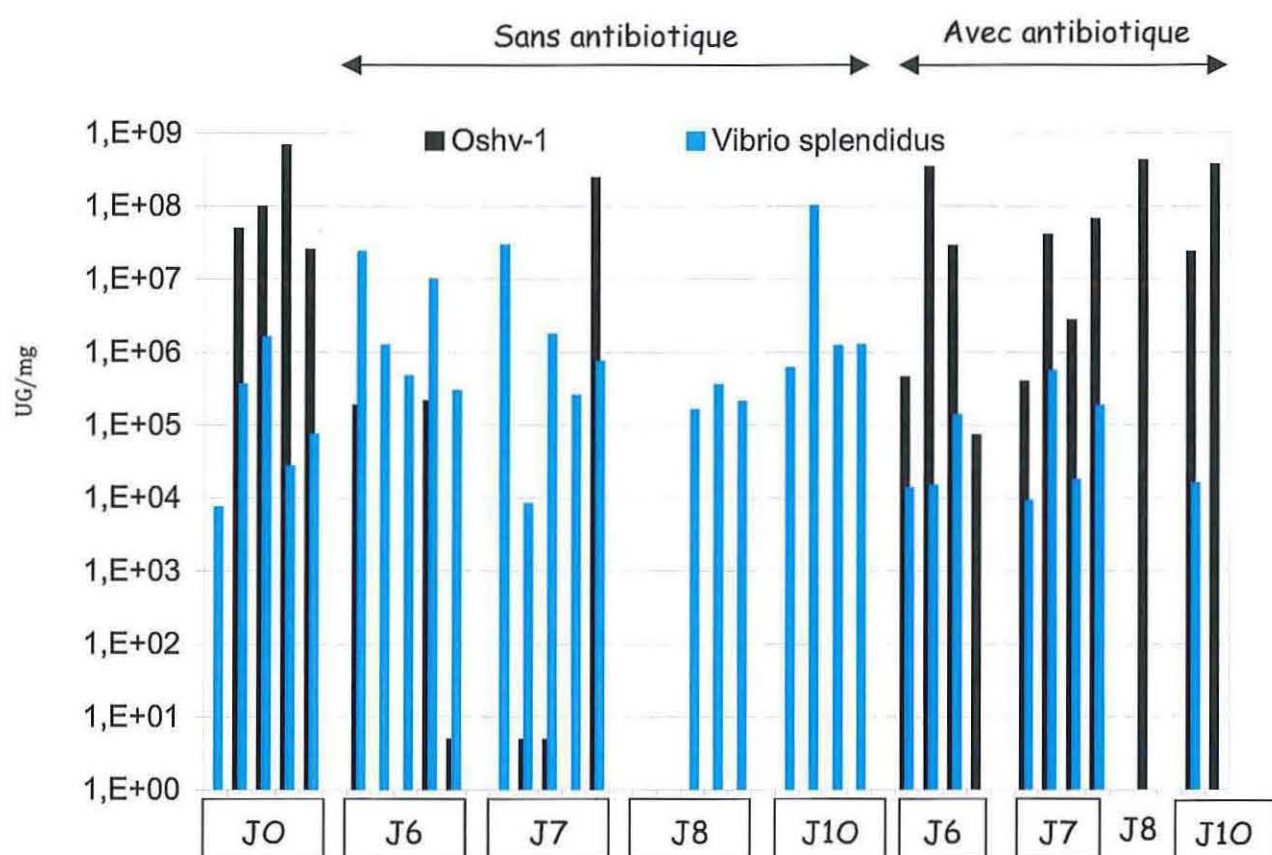


Fig. 25 : Analyse du portage (charge bactérienne et virale) chez les huîtres transférées vivantes du site d'Agnas et mortes progressivement lors du suivi en aquarium (de J0 à J10).

Premier constat : En ce qui concerne les animaux n'ayant pas subi de traitement antibiotique, la totalité d'entre eux (5/5) présentent à J0 des taux élevés de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* ($7,7-1630 \cdot 10^3$ équivalent CFU/mg de tissu) tandis que 4

d'entre eux (4/5) sont également porteurs d'OsHV-1 à des niveaux également très élevés (2600-70.000 10^4 copies par mg de tissu).

Les prélèvements intermédiaires réalisés de J6 à J10 révèlent progressivement : une persistance de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* (17/19) et une diminution de la prévalence à OsHV-1 (3/19) avec des taux d'infection qui varient de 8,5-104.000 10^3 pour le groupe *V. splendidus* à 22-25.000 10^4 pour OsHV-1. Ces niveaux d'infections bactérienne et/ou virale sont bien supérieures aux valeurs observées chez les animaux survivants analysés ce qui semble logique compte tenu du fait qu'il s'agit d'animaux morts, de moins de 16 heures cependant, du fait des relevés réguliers de mortalité effectués.

Deuxième constat : En ce qui concerne les animaux traités aux antibiotiques mais morts quand même de J6 à J10, 8/11 présentent encore des taux élevés de bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* (9,4-565 10^3) contre 11/11 porteurs d'OsHV-1 (7,3 – 43.000 10^4).

On peut donc avancer les conclusions suivantes :

- les mortalités observées entre J6-J10 en l'absence de traitement antibiotique sont majoritairement associées à une prévalence et charges bactériennes élevées, en effet la prévalence des infections à l'herpès virus est faible considérant les mêmes animaux.
- En revanche, chez les quelques huîtres mortes récoltées malgré le traitement antibiotique pratiqué, la prévalence des infections à *V. splendidus* et OsHV-1 est équivalente pour les temps J6 à J10. Contrairement aux huîtres ayant subi un traitement antibiotique et trouvées survivantes à J10 (Fig. 24) avec une prévalence faible en bactéries du groupe *V. splendidus* (1/10), le traitement antibiotique n'a pas permis à quelques animaux trouvés morts entre (J6-J10) de contrer leur infection bactérienne.

Et formuler quelques remarques :

- les mortalités observées sont vraisemblablement dues aux infections bactériennes et peuvent impliquer également d'autres bactéries que celles appartenant au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus*, qui seraient Gram-en raison du spectre d'activité de l'antibiotique utilisé.
- Aucune des huîtres creuses analysée lors de cette étude n'a été trouvée infectée par l'agent infectieux *V. aestuarianus* en utilisant un test de détection et quantification par PCR en temps réel développé au LGP.
- Les résultats précédents suggèrent que les cas de co-infections à *V. splendidus* et OsHV-1 entraînant une issue fatale sont favorisés avec une prévalence passant de 3/19 à 8/11 lorsque l'infection bactérienne est retardée (du fait, dans le cas présent, de l'utilisation d'un antibiotique).

Perspectives

Il semblerait d'intérêt de poursuivre ces essais de traitement antibiotique, réalisés *ex situ*, sur des lots d'huîtres creuses d'origine géographique (i.e. récoltées sur différents sites) afin d'infirmier ou confirmer les résultats obtenus sur le site d'Agnas lors des

surmortalités 2010 et de savoir si on peut les généraliser à d'autres sites de production ostréicole confrontés au phénomène de surmortalités des huîtres creuses. Il serait également utile à l'avenir de pouvoir disposer d'un traitement antiviral efficace vis à vis de l'infection par OsHV-1 qui pourrait être utilisé de façon analogue à « l'essai antibiotique » mené dans le cadre de cette étude. Ces travaux permettraient de mieux comprendre la dynamique d'infection à OsHV-1 et aux bactéries pathogènes et de faciliter l'étude des liens de causalité entre mortalité et la détection/quantification des agents infectieux incriminés.

Un traitement préventif des huîtres aux antibiotiques, réalisé à titre expérimental uniquement, pourrait être également envisagé dans des installations protégées (expérimentations *ex situ*). Dans un deuxième temps, les lots d'huîtres récemment traités aux antibiotiques, en réalisant plusieurs séries de traitement du même lot d'huîtres, espacées dans le temps, seraient transférées à pas de temps régulier sur un site ostréicole tel que celui d'Agnas, afin d'infirmier ou confirmer, en période de survenue des surmortalités, l'efficacité du traitement antibiotique sur l'arrêt ou la diminution des mortalités observées *in situ*.

D'autres espèces bactériennes Gram- que celles appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* devraient être également recherchées, identifiées puis ciblées en cherchant à les quantifier lors de la survenue d'épisodes de mortalité afin d'évaluer leur incidence épidémiologique.

5. DISCUSSION - CONCLUSION

Les mortalités estivales de juvéniles d'huître *Crassostrea gigas* répondent à un schéma d'interactions multifactorielles complexes entre l'huître, son milieu et les organismes pathogènes (Samain *et al*, 2007). Depuis les épisodes de mortalité observés en 2008, il semble que la pression 'pathogène' soit devenue plus importante qu'auparavant, avec notamment une présence marquée d'agents infectieux comme *Vibrio splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. harveyi* et l'herpès virus OsHV-1 (REPAMO 2008, 2009). Cependant, la détection de ces agents infectieux est souvent réalisée au cours des épisodes de mortalités dans le cadre du réseau REPAMO (surveillance passive basée sur les déclarations des surmortalités), mais aucun suivi de leur dynamique ni de leur présence hors période de mortalité n'a été réalisé jusqu'à présent dans le bassin de Marennes-Oléron et c'est pourquoi nous avons conduit ce travail sur le site de d'Agnas.

Cette étude originale a permis de réaliser deux campagnes de suivi pour décrire la cinétique d'agents infectieux ciblés sur le naissain d'huître creuse au cœur du bassin de Marennes Oléron. Ces campagnes ont été menées du printemps à la fin de l'été en 2009 et 2010. Au cours de ces deux campagnes les lots de naissain suivis régulièrement et à pas de temps serré ont présenté de fortes mortalités et nous avons pu décrire *in situ* et au plus près, les cinétiques des agents infectieux avant, pendant et après la survenue des mortalités.

Chez le naissain et pour les deux campagnes menées, deux schémas de cinétique de détection sont observés selon l'agent infectieux concerné.

La cinétique des bactéries appartenant au groupe *Vibrio splendidus* montre qu'elles sont très fréquemment détectées chez le naissain vivant échantillonné, avec des niveaux de prévalence variables allant de 92 à 100% en 2009 et de 10 à 67 % en 2010, avant ou durant les périodes de mortalité. Les niveaux de charges bactériennes détectés dans les tissus n'augmentent pas ou peu durant les périodes de surmortalité (Fig. 14, 18, tableau 3).

La cinétique de détection de l'ADN viral d'OsHV-1 montre que le virus est détecté en moyenne dans 35 % des échantillons en 2009 avant mortalité puis dans 97% des échantillons au cours des mortalités. En 2010, la cinétique observée montre une tendance encore plus marquée avec -aucune détection- d'ADN viral hors période de mortalité et une prévalence moyenne de 84% durant l'épisode de mortalité (Fig. 16, 18, tableau 3). Les niveaux des charges virales détectées dans les tissus augmentent fortement durant les périodes de surmortalité passant en 2009 de $\sim 10^{+2}$ copies à $> 10^{+4}$ copies par mg de tissu et en 2010 de 0 copie à $> 10^{+8}$ copies par mg. Cette tendance observée sur les deux séries de données est en accord avec les données observées dans d'autres études de cinétiques des agents infectieux dans le naissain d'huître creuse sur estran (Blin, 2009 ; Dégremont, 2010). Ces auteurs montrent au cours de suivi de naissain ou juvénile que la détection des bactéries du groupe *Vibrio splendidus* est corrélée négativement ou n'est pas significativement corrélée aux épisodes de mortalités estivales des jeunes huîtres. Ils notent par ailleurs que la détection d'ADN viral et sa prévalence augmentent fortement avec l'apparition des mortalités et qu'il existe une corrélation positive significative entre la prévalence d'OsHV-1 et les niveaux de mortalité ainsi qu'entre le niveau des charges virales et la mortalité. Sauvage *et al.* 2009, avaient également observé en 2006 sur du naissain de *C. gigas* suivi quotidiennement et individuellement, une corrélation positive significative entre le niveau de prévalence pour OsHV-1 et les niveaux de mortalité.

D'autre part, au cours de notre étude, il a été possible d'étudier l'effet de traitement antibiotique *ex situ* en appliquant une antibiothérapie au naissain présentant des mortalités sur estran et rapporté au laboratoire. Ces essais ont permis de montrer que des bactéries du groupe *Vibrio splendidus*, entre autres, étaient impliquées dans la survenue des mortalités observées et que le traitement antibiotique pouvait réduire significativement le niveau de mortalité.

Le fait que le traitement antibiotique semble être moins efficace lors du premier essai *ex situ* que lors du deuxième, survenus 5 jours plus tard, pour réduire la mortalité, même si l'effet est statistiquement significatif, peut s'expliquer par deux hypothèses :

- soit le naissain est affecté lors du premier essai par une infection virale à OsHV-1, et à la faveur de l'affaiblissement du naissain, les bactéries du groupe *V. splendidus* notamment se sont développées, expliquant ainsi l'efficacité partielle des antibiotiques. Lors du deuxième essai, la morbidité due au virus s'est estompée et l'action des bactéries a pris le dessus.

- soit le naissain a été affecté par une infection bactérienne lors du premier essai mais il a été traité trop tardivement par rapport au déclenchement des mortalités pour stopper toutes les mortalités, ce qui n'est pas le cas du deuxième essai.

Sur la base des jeux de données disponibles à présent, il est hautement probable que dans le milieu, sur estran, les bactéries du groupe *V. splendidus* et le virus OsHV-1 puissent infecter le naissain à l'occasion d'un 'stress' ou un déséquilibre de l'environnement de l'huître (ex : Δ température) et que la maladie qui en résulte génère les surmortalités régulièrement observées au printemps et en été.

Selon J. F. Pepin, il est possible de proposer que le schéma infectieux qui a affecté le naissain soit lié dans une première phase au développement d'une infection virale à OsHV-1, et que suite à cette fragilisation, les bactéries du groupe *V. splendidus* agissent dans une deuxième phase. Cette hypothèse est soutenue par les données des cinétiques de détections observées *in situ* et par les données acquises lors des tests d'antibiothérapie où dans un premier essai la mortalité n'a pu être enrayée par le traitement, l'antibiotique n'agissant pas contre le virus.

Les données relatives à la détection d'OsHV-1 permettent d'avancer : que le virus est fortement corrélé au déclenchement des mortalités et qu'il apparaît au moins 3 jours avant les premières mortalités ; qu'il se réplique rapidement dans les huîtres infectées entraînant leur mort sous quelques jours ; que dans la mesure où les lots de naissain de 2010 étaient considérés comme initialement négatifs pour la détection d'OsHV-1 (n=100), on peut supposer qu'ils se sont contaminés par la filtration de l'eau de mer bien qu'il n'y ait pas eu de détection dans nos échantillons avant fin mai. Il est noté enfin qu'à la mise à l'eau sur site, les naissains étaient déjà porteurs de bactéries du groupe *V. splendidus*, constituées probablement par des souches non pathogènes constitutives de la flore bactérienne commensale endogène et que durant la période des mortalités suivie en 2010, 34% des échantillons étaient **co-infectés par OsHV-1 et *V. splendidus***.

En 2009 comme en 2010, les quelques **huîtres mortes** analysées sont positives pour la détection d'ADN de bactéries du groupe *V. splendidus* et d'OsHV-1 et présentent des charges virales très importantes ($> 10^{+6}$ copies/mg). La **bactérie *Vibrio aestuarianus*** n'a été détectée dans aucun des échantillons d'animaux vivants, ni dans l'eau de mer.

Les prélèvements de moules permettent la détection quasi systématique de bactéries du groupe *V. splendidus* avec une charge moyenne élevée ($\sim 10^{+5}$ copies/mg) mais aussi d'ADN viral sur quelques individus sans que les charges virales associées soient signe d'une répllication active ($< 10^{+2}$ copies/mg). Comme observé lors de la campagne 2009, les moules peuvent être assimilées à « des porteurs asymptomatiques » du virus herpès sans en être affectées. Ces animaux filtreurs peuvent aussi réaliser un portage passif d'ADN viral ou de particules au travers l'eau de mer qu'ils filtrent. Il est possible que les moules soient des 'porteurs sains' du virus herpès, elles pourraient agir comme espèces vectrices. Cependant, le rôle des moules dans la propagation de l'infection par le virus herpès et les mortalités d'huîtres creuses est à étudier. En particulier, des approches en hybridation *in situ* ciblant OsHV-1 dans les moules seraient nécessaires pour préciser son tropisme au niveau cellulaire. Il apparaît enfin que les moules échantillonnées présentent des prévalences pour des bactéries du groupe *Vibrio splendidus* supérieures à celles du naissain avec des charges associées également plus fortes sans n'avoir jamais présenté de mortalité. Ceci peut être à lier au fait que les bactéries de ce groupe polyphylétique peuvent faire partie de la flore normale des invertébrés marins et ne sont pas toutes virulentes.

Les prélèvements d'eau de mer n'ont permis la détection d'ADN viral que pour deux dates (T8 et T9) sur les 11 analysées en 2010, dont le prélèvement qui précédait de quatre jours les premières mortalités, à la différence de la campagne 2009, par contre l'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* a été détecté ($\sim 10^{+5}$ copies/mL) pour 4

dates sur les 12 testées, sans qu'il y ait une corrélation avec l'épisode de mortalité (voir tableau 3). L'eau de mer paraît agir comme un vecteur mécanique des ces agents.

Les prélèvements de sédiment (eau interstitielle) réalisés en 2009 ont permis la détection d'ADN de bactéries du groupe *V. splendidus* dans 50% des échantillons mais pas de d'ADN viral.

Les prélèvements de balanes réalisés en 2010 ont permis la détection d'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* pour les cinq dates analysées, sur 54% des individus avec une charge moyenne $<10+^3$ copies/ng d'ADN total. Pour la première fois de l'ADN viral d'OsHV-1 a été recherché dans les balanes sur 9 points de prélèvement (90 échantillons testés). Les échantillons testés ont présenté un signal positif pour 5 dates, 3 hors périodes de mortalité et 2 au cours du pic de mortalité. La fréquence de détection pour ces dates varie de 20% à 50% (voir tableau 3) avec des charges virales très faibles et non quantifiables (<10 copies ADN OsHV-1/ng d'ADN). Là encore, ces animaux filtreurs (crustacés Cirripèdes) peuvent réaliser un portage passif d'ADN viral ou de particules au travers l'eau de mer qu'ils filtrent.

Pour préciser ce point relatif au 'portage passif' potentiel par les moules ou les balanes, il faudrait pouvoir disposer de matériel fixé pour l'histologie afin de permettre des recherches d'ADN viral par hybridation *in situ* sur des coupes de tissu.

En conclusion, un suivi régulier et individuel en période à risque (printemps-été) a permis d'établir pour la première fois la cinétique de mortalité de naissains d'huîtres creuses ainsi que la cinétique de détection de bactéries du groupe *V. splendidus* et de l'agent infectieux OsHV-1 au sein de ces animaux mais aussi d'autres compartiments de l'élevage. Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence de l'ADN viral d'OsHV-1 chez la moule mais également de confirmer sa détection possible dans l'eau de mer en dehors ou au cours des épisodes de mortalité. Ces données d'écologie microbienne, couplées à des mesures de paramètres environnementaux (voir les données températures et salinités d'Agnes dans les bulletins du LEPR/PC Bulldozer 2009-2010), semblent indispensables à une meilleure connaissance des conditions favorisant les épisodes de mortalité de naissains d'huîtres creuses, afin, *in fine*, d'être en mesure d'en limiter l'impact par des mesures de gestion adaptées.

A la lumière de ces premiers travaux il semble également que des analyses sur des animaux testés en individuel soient indispensables eu égard à la grande variabilité des niveaux d'infection à vibrions pathogènes et OsHV-1. De même, le faible pas de temps entre deux prélèvements consécutifs est un élément indispensable du fait d'évolutions qualitatives et quantitatives très rapides en ce qui concerne les vibrions pathogènes et OsHV-1. Si la bactériologie classique permet de mettre en évidence des genres ou espèces bactériennes autres que *V. splendidus* et/ou *V. aestuarianus* potentiellement impliqués dans certains épisodes de mortalité d'huître creuse, il semble à la lumière de ces travaux indispensable de traiter « en frais » les échantillons et de ne pas procéder à leur cryoconservation car en l'état actuel des connaissances ce traitement ne présente pas toutes les garanties en terme de cultivabilité ultérieure des bactéries. L'approche alternative mise en œuvre en 2010, basée sur la détection biomoléculaire de l'ADN bactérien directement à partir des ADN totaux extraits de l'animal a permis d'obtenir

des informations sur la fréquences de détection globalement proches de celles obtenues sur le naissain en 2009 : absence de détection de *Vibrio aestuarianus*, détection de l'ADN de bactéries du groupe *Vibrio splendidus* pour tous les échantillons testés.

De plus, de nouveaux outils de détection ciblant spécifiquement les souches virulentes du groupe *V. splendidus*, et non plus toutes les souches, semblent nécessaires pour différencier les variations de la flore endogène de l'huître de l'apparition de souches pathogènes.

Au-delà de l'aspect cinétique des agents infectieux, nos données permettent d'aborder également la question des **facteurs favorisant les surmortalités de naissain**. Sur l'estran, l'hydrodynamisme et un paramètre physico-chimique comme la température interagissent très probablement et apparaissent comme des facteurs de risques. Nous avons ainsi pu observer au cours de nos suivis pour la détection des agents infectieux dans l'eau de mer, que l'eau et les courants sont des vecteurs passifs et mécaniques qui ont participé directement ou indirectement à la contamination puis à l'infection du naissain.

Ainsi, notre étude a permis de montrer que de l'ADN viral pouvait être détecté dans l'eau de mer hors période de mortalité, de même que les bactéries du groupe *V. splendidus*. Dans les Pertuis Charentais, en période de fortes mortalités des naissains d'huître dans les zones d'élevage, il est probable que le virus herpès OsHV-1 parcourt des distances plus ou moins grandes en fonction de la vitesse des courants soit via les larves planctoniques infectées (été) soit en dehors de son hôte (sous forme libre ou adsorbé à la matière particulaire (Pepin et al., 2009), tout en conservant sa virulence quelques temps.

Le rôle de la température de l'eau dans le déclenchement des mortalités de naissain sur estran associée à une rapide progression au-delà de 16°C paraît être un facteur déterminant dans l'apparition des premières mortalités liées à l'infection virale comme cela est également observé dans les suivis menés par l'Observatoire Conchylicole (2009-2010). Le rôle de ce facteur et d'un seuil thermique permettant l'expression de l'herpès virose de l'huître a été démontré expérimentalement au Laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade (Pepin, 2010, *Com. Pers.*).

L'ensemble des données acquises au cours de cette étude renforce le lien de causalité entre les mortalités observées chez le naissain et les infections révélées au travers de la cinétique de détection du virus OsHV-1 et des bactéries du groupe *Vibrio splendidus*.

En terme de perspectives, il apparaît un net besoin de mieux caractériser les isolats du groupe *Vibrio splendidus* au cours des suivis, du fait d'une grande diversité de souches dans le groupe qui masque peut être un type particulier à identifier (essais par la technique VNTR en cours de développement, étude de facteurs de virulence, etc.).

Finalement, cette étude pourra participer et servir à la définition de nouvelles études (épidémiologie, facteurs de risque...) telles que :

- projet BIVALIFE (Controlling infectious diseases in oysters and mussels in Europe, 2011-2014, en cours)
- projet appel ANR GIGASUR : Surmortalité huître creuse (resoumis).

Nous proposons en 2011 de poursuivre une étude relative à la cinétique des agents infectieux (groupe *V. splendidus* et OsHV-1) en relation avec la mortalité à partir d'un lot d'huîtres issu de captage naturel (naissain de Fouras 2010) qui sera positionné sur le site d'Agnas. Cette nouvelle étude est mise en œuvre et financée dans le cadre du projet européen FP7. BIVALIFE.

6. BIBLIOGRAPHIE

Blin J-L (2009). Suivi de la dynamique des mortalités de juvéniles d'huîtres et de l'évolution des pathogènes associés. SMEL / CE- prod / 2009 – 04. P25.

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., (2010). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317: 94-98.

Garcia C, Thebault A, Degremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, Chollet B, Francois C, Joly J-P, Ferrand S, Kerdudou N, Renault T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research*, 42 (73), 11 p.

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.

Pepin J. F., Segarra A., Faury N., Schikorski D., Cobret L. & T. Renault, (2009). Summer mortality in 2008 and Ostreid Herpesvirus investigation. Annual meeting of National Reference Laboratories for Mollusc Diseases, La Tremblade, France, 16th and 19th March 2009. (Communication orale)

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/>

Observatoire :

http://wwwz.ifremer.fr/observatoire-conchylicole/synthese-nationale_2009/synthese_mortalite
http://wwwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole/Resultats-nationaux/Resultats-nationaux-2010
http://www.ifremer.fr/lerpc/reseaux/bulldoser/bulldoser_2010.htm

REPAMO:

Bilan 2009 du réseau Repamo. Cyrille François, Jean-Pierre Joly, Céline Garcia, Laurence Miossec, Denis Saulnier, Jean-François Pépin, Isabelle Arzul, Emmanuel Omnes, Delphine Tourbiez, Nicole Faury, Philippe Haffner, Bruno Chollet, Maeva Robert, Laetitia Cobret, Tristan Renault. (2010) p50.

Bilan 2010 du réseau Repamo. Benjamin Guichard, Cyrille François, Jean-Pierre Joly, Céline Garcia, Laurence Miossec, Denis Saulnier, Jean-François

Pepin, Isabelle Arzul, Emmanuel Omnes, Delphine Tourbiez, Nicole Faury, Philippe Haffner, Bruno Chollet, Maeva Robert, Laetitia Cobret, Tristan Renault. (2011) p22.

Samain J.F., McCombie H., 2007. Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/Quae, 332p

Samain J-F, McCombie H (2008) Summer Mortality of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*, The Morest Project. Ed. Quae.

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.

Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C. (2010). A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity. *Microbial Ecology*, 59(4), 787-798.