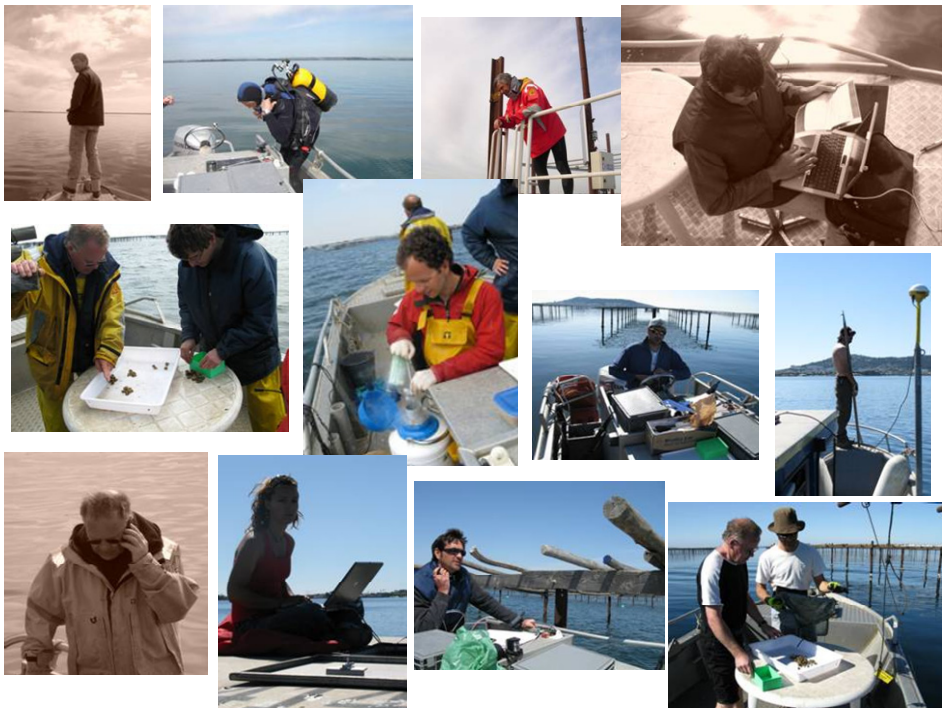
Département Océanographie, Dynamique des Ecosystèmes
UL- Laboratoire Environnement - Ressource du Languedoc Roussillon

Fabrice Pernet
Franck Lagarde
Ludovic Cesmat
Nicolas Jeannée
Jean Barret
Patrik Le Gall
Claudie Quéré
Annie Fiandrino
Marine Miguet
Hélène Boulet
Nicolas Keck
Emmanuelle Roque
D'Orbcastel

Septembre 2012 – RST/LER/LR 12-011

Facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans la lagune de Thau

Rapport final du projet de recherche sur l'impact des conditions d'élevage sur la survie de l'Huître creuse dans la lagune de Thau (ICES)



Facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans la lagune de Thau

Rapport final du projet de recherche sur l'impact des conditions d'élevage sur la survie de l'Huître creuse dans la lagune de Thau (ICES)

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : **Diffusion** : libre : ☑ restreinte : ☐ interdite : ☐	**date de publication : sept.-12** **nombre de pages : 58** **bibliographie : oui** **illustration(s) : 23 figures** **langue du rapport : française**
Titre de l'article : Mortalités massives de l'Huître creuse: causes et perspectives	
Contrat n° Rapport intermédiaire ☐ Rapport définitif ☑	
Auteur(s)	**Organisme / Direction / Service, laboratoire**
Pernet F, Lagarde F, Cesmat L, Barret J, Le Gall P, Fiandrino A, Miguet M, Roque D'Orbcastel E.	Ifremer / Océanographie Dynamique des Ecosystèmes / Unité Littorale / Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon, Bd jean Monnet, 34200 Sète
Jeannée N.	Geovariances, 49bis avenue Franklin Roosevelt, 77215 AVON Cedex
Quéré C.	UMR 6539 LEMAR Ifremer - Technopole de Brest-Iroise BP 70, 29280 Plouzané
Boulet H, Keck N.	Laboratoire Départemental Vétérinaire, Conseil Général de l'Hérault, 306 Rue Croix de Las Cazes, Montpellier
Cadre de la recherche : Action ICES	
Destinataires : France Agrimer, Région LR, Département 34, CRC Méditerranée, Ifremer.	

Ifremer

Résumé

Cette étude avait pour objectif principal de déterminer les facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des surmortalités d'huîtres creuses dans la lagune de Thau. Les facteurs étudiés étaient : la pathologie (détection d'ADN appartenant à l'Ostreid herpesvirus 1 OsHV-1 et au groupe bactérien *Vibrio splendidus*), l'état énergétique des huîtres (triglycérides, sucres totaux et acides gras comme marqueurs trophiques), les pratiques d'élevage et l'hydrodynamique. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons suivi la mortalité d'un lot d'huîtres sentinelles, âgé de moins d'un an, maintenu indemne de mortalité, dans lequel on ne détectait pas d'ADN appartenant à OsHV-1. Le lot a été déployé mi-mars 2011 sur 106 stations dans la lagune de Thau, où les pratiques culturales ont été qualifiées. Des échantillons d'huîtres ont été régulièrement prélevés pour les analyses en pathologie et les réserves énergétiques.

La surmortalité des huîtres a touché l'ensemble de la lagune de Thau, excepté deux sites éloignés des zones d'élevage. La mortalité cumulée finale a atteint plus de 80% des huîtres sentinelles sur la quasi-totalité des points de suivi, de sorte que ce paramètre est un descripteur peu pertinent car relativement invariable. Nous avons donc choisi d'analyser les fonctions de survie et le temps moyen de survie des huîtres sentinelles, deux paramètres qui tiennent compte de la cinétique de mortalité et pas uniquement de la mortalité cumulée finale. Le temps moyen de survie des huîtres sentinelles, qui a été calculé en jours écoulés depuis le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C, variait entre 8 jours et plus de 45 jours, en fonction de la localisation dans la lagune : il était de seulement 15.0 jours dans les zones d'élevage contre 27.8 jours hors des zones d'élevage. Par conséquent, le temps moyen de survie des huîtres était moindre lorsqu'elles étaient placées dans les zones d'élevage, suggérant que les animaux placés dans les zones d'élevage étaient à l'origine de l'épizootie qui a sévi dans la lagune de Thau en 2011.

Tous les évènements de mortalité constatés *in situ* coïncidaient avec la détection d'ADN viral de OsHV-1 en quantité importante dans les huîtres sentinelles. Ce résultat est donc en accord avec les résultats épidémiologiques de terrain et les expériences d'infection expérimentale et de cohabitation en laboratoire, de sorte qu'il est possible de dire que OsHV-1 est une cause prédominante de mortalité des huîtres. Toutefois, le temps moyen de survie était modulé par la quantité de triglycérides (TAG) dans les huîtres avant les mortalités et les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les huîtres en période de mortalité. Par conséquent, bien que OsHV-1 soit une cause prédominante de mortalité des huîtres, la teneur en réserves énergétiques et la détection de *V. splendidus* dans les huîtres sont des paramètres explicatifs importants de la dynamique spatio-temporelle des mortalités.

Du point de vue des pratiques culturales, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles variait en fonction des types d'élevage sur les concessions. Notamment, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées à l'élevage de moules était de 1.9 jours supérieur à celui des huîtres sentinelles placées dans des tables vides. Bien que la présence de moule n'ait pas empêché les mortalités de se produire, il est possible qu'elle ait ralenti le phénomène. A l'inverse, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au prégrossissement de naissain était de 2.4 jours inférieur à celui des huîtres sentinelles placées dans des tables vides: il semble que la présence de naissains sensibles aux agents infectieux en quantité importante ait accéléré le phénomène de mortalité. Enfin, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au grossissement d'huîtres était similaire à celui des huîtres sentinelles placées dans des concessions vides. Par conséquent, la présence d'huître en grossissement ne semble pas avoir d'effet sur la dynamique des mortalités. Alors que le type d'élevage avait un effet clair sur la cinétique de mortalité des huîtres, les autres facteurs testés, tels que les structures d'élevage, les densités d'élevage et l'origine des huîtres (sauvage vs. triploïde, 3n) n'avaient pas d'effet sur les paramètres de survie des huîtres sentinelles.

Enfin, les simulations de transport de particules à l'aide du modèle hydrodynamique MARS-3D ont montré que la localisation du point d'émission de la maladie influençait fortement le potentiel de dispersion de l'agent infectieux dans la lagune, reflétant le niveau de connectivité hydrodynamique des concessions. Toutefois, l'effet de la localisation du point d'émission de la maladie sur la dispersion de OsHV-1 variait en fonction des années de suivi, reflétant les différences de régime hydrodynamique. Par conséquent les caractéristiques d'une concession en terme de connectivité hydrodynamique varient entre les années, de sorte qu'il n'est pas possible de mettre en évidence des points « isolés » et des points « connectés » dans la lagune de façon stable. Le temps nécessaire pour observer 90% de diminution des quantités d'ADN virale (T_{90}) était le facteur le plus sensible sur le potentiel de dispersion de OsHV-1 dans l'environnement. Nos données suggèrent que la valeur de T_{90} pour OsHV-1 était vraisemblablement supérieure ou égale à 5 jours.

Mots-clés
Energétique, Environnement, Epidémiologie, Géostatistique, Herpesvirus OsHV-1, Huître creuse, Mortalité, Pathologie, *Vibrio splendidus*, Zootechnie, Hydrodynamique.

Sommaire

Fiche documentaire **3**

1. Introduction **10**
1.1. Contexte général 10
1.2. Typologie des mortalités d'huîtres en Méditerranée 10
1.3. Objectifs 12

2. Matériel et Méthode **13**
2.1. Les huîtres 13
2.2. Plan d'échantillonnage 13
2.2.1. Survie 14
2.2.2. Pathologie, réserves énergétiques et marqueurs trophiques 15
2.2.3. Pratiques culturales 15
2.2.4. Hydrodynamique 17
2.3. Analyses de laboratoire 18
2.3.1. Préparation des échantillons 18
2.3.2. Détection des agents infectieux 18
2.3.3. Réserves énergétiques et marqueurs trophiques 19
2.4. Statistiques 20

3. Résultats **21**
3.1. Survie 21
3.2. Pathologie 24
3.2.1. Fréquence de détection des agents infectieux 24
3.2.2. Relation entre la détection d'agents infectieux et la survie des huîtres 25
3.2.3. Concentration d'ADN détecté 27
3.2.4. Corrélation entre les quantités d'ADN détectées appartenant à OsHV-1 et *V. splendidus* et la survie des huîtres 29
3.3. Réserves énergétiques et marqueurs trophiques 30
3.3.1. Les triglycérides 31
3.3.2. Les sucres 32
3.3.3. Les marqueurs trophiques 33
3.3.4. Matrice de corrélation 35
3.4. L'environnement 38
3.4.1. Les pratiques culturales 38
3.4.2. Le régime hydrodynamique 42

4. Conclusions et perspectives **48**
4.1. Les facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités 48
4.2. Perspectives 51

5. Bibliographie **53**

Avertissement

Ce projet de recherche sur les mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans la lagune de Thau a été proposé aux instances professionnelles en novembre 2010 et couvre l'année 2011. Le Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon a assuré la réalisation de ce projet, en majeure partie financé par France Agrimer. Les autres financeurs étaient la Région Languedoc-Roussillon et le Conseil Général de l'Hérault.

Tous les résultats générés dans le cadre du projet de recherche ne sont pas présentés dans ce rapport. Notamment, l'analyse des pratiques culturales dans la lagune de Thau et les résultats concernant l'hydrodynamique ne sont pas exhaustifs. Concernant les pratiques culturales, un rapport complet est en préparation et sera mis en ligne sur le site Archimer de l'Ifremer fin 2012.

1. Introduction

1.1. Contexte général

Depuis la fin des années 70, des évènements épisodiques à grande échelle tels que des épidémies, des mortalités massives, des efflorescences d'algues toxiques et autres explosions de populations se sont produits dans l'environnement marin à des taux sans précédent historique [1-5]. Plusieurs espèces d'invertébrés d'importance économique et écologique sont affectées par des épisodes de mortalités massives [5]. Bien que le phénomène de mortalité massive soit en général associé à des agents infectieux, il reflète souvent des changements environnementaux et un équilibre énergétique défavorable chez l'animal. Un modèle d'interaction qui inclut l'animal, ses agents infectieux et l'environnement, a été développé pour expliquer les mortalités estivales d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en France dans le cadre du défi Morest, un programme de recherche multidisciplinaire mené par Ifremer en 2001-2006 [6].

Les mortalités massives d'huîtres *C. gigas* sont rapportées partout où cette espèce est cultivée : au Japon [7], aux USA [8-10], et en Europe de l'Ouest (Allemagne[11], Irlande [12], France [13]). Pendant l'été 2008, les mortalités d'huîtres âgées d'un an et moins se sont produites simultanément sur toutes les côtes françaises. Cet événement de mortalité représente la crise écologique la plus importante pour l'ostréiculture française depuis l'introduction de l'espèce à la fin des années 60. Les jeunes huîtres âgées d'un an ont été décimées à 40-100% selon les sites et les lots alors que les animaux plus âgés semblent avoir été moins affectés. Ces mortalités massives de naissain se sont reproduites en 2009 et en 2010 [14,15].

Les huîtres échantillonnées pendant des épisodes de mortalité en 2008 ont présentées des prévalences élevées de l'ostreid herpesvirus (OsHV-1) comparativement aux années précédentes [16]. Ces auteurs ont caractérisé un génotype d'OsHV-1 qui n'avait jamais été reporté et qui a été nommé OsHV-1 µVar. Ce génotype n'a été détecté que dans les isolats de 2008, suggérant qu'il s'agit d'un génotype émergent [16]. En plus de cette étude épidémiologique, des expériences de cohabitation en laboratoire montrent une relation causale entre les mortalités d'huîtres et l'infection par OsHV-1 µVar [17,18].

Par ailleurs, les bactéries du genre *Vibrio* spp. sont ubiquistes et fréquemment associées avec des épisodes de mortalité sévère d'huîtres creuses sur le terrain [19]. Plus particulièrement, certains isolats appartenant aux groupes de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* ont la capacité d'induire des mortalités importantes chez des huîtres initialement saines en conditions expérimentales [20,21].

1.2. Typologie des mortalités d'huîtres en Méditerranée

Les mortalités d'huîtres creuses dans la lagune de Thau touchent principalement les huîtres âgées de moins d'un an, quelles que soient l'origine et la ploïdie, lorsque la température de l'eau est comprise entre 17°C et 24°C [15 ,22]. Par rapport

aux années 2007 et 2008, la mortalité s'est intensifiée et le seuil thermique de déclenchement est abaissé de ~2°C. Les mortalités démarrent généralement début mai et cessent en octobre, avec une période d'interruption en été lorsque la température de l'eau franchit le seuil de 24°C.

Ces mortalités coïncident toujours avec la détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *Vibrio splendidus* dans le naissain d'huître, suggérant que ces agents infectieux sont impliqués dans le déclenchement du phénomène de mortalité d'huître creuse dans la lagune de Thau. Toutefois, *V. splendidus* n'est pas toujours associé avec des mortalités importantes d'huîtres creuses.

Alors que les mortalités touchent les huîtres cultivées dans les lagunes méditerranéennes, les huîtres maintenues en mer à 18m de profondeur au large de Marseillan demeurent indemnes [15,22]. Toutefois, les huîtres maintenues protégées du risque de mortalité en mer ouverte transférées dans l'étang de Thau en paniers australiens sont rapidement infectées par OsHV-1 et *V. splendidus*, et meurent à 80%. La mortalité des huîtres âgées de plus d'un an protégées du risque de mortalité en mer ouverte est similaire à celle des mêmes huîtres âgées de moins d'un an. Par conséquent, quelles que soient l'âge et la taille des huîtres à la date du transfert dans l'étang de Thau, elles restent sensibles aux mortalités. En revanche, les huîtres survivantes à la mortalité en 2009 survivent à plus de 90% en 2010. En conséquence, la survie d'un lot d'huître dépend de son parcours zootechnique (exposition ou non à la mortalité dans le passé) et non pas de l'âge ou de la taille [15].

Les mortalités varient en fonction des pratiques culturales [15]. Les huîtres maintenues protégées du risque de mortalité en mer ouverte transférées dans l'étang de Thau meurent à 80% en paniers australiens, alors que les mêmes individus collés sur cordes présentent des mortalités largement moindres (10%). De l'ADN appartenant à OsHV-1 est détecté dans les deux cas. Les facteurs discriminants sont (1) la fréquence de détection et la quantité d'ADN de *V. splendidus* qui sont plus élevées dans les huîtres maintenues en panier par rapport aux huîtres collées, et (2) les quantités de triglycérides et de sucres (réserves énergétiques) qui sont supérieures dans les huîtres sur corde comparativement aux animaux en paniers. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les pratiques culturales peuvent influencer la mortalité en modulant l'infection par *V. splendidus* et l'état énergétiques des huîtres.

Bien que nous ayons observé un effet significatif et important des pratiques culturales sur la mortalité des huîtres, il n'est pas possible à l'heure actuelle de préconiser une pratique plus qu'une autre. En effet, la faible mortalité des huîtres collées comparativement aux huîtres maintenues en panier constatée au mois de juin dans la zone de Marseillan est une observation ponctuelle qui ne saurait être généralisée à l'ensemble des secteurs conchylicoles de l'étang de Thau en tout temps de l'année. Les professionnels ont déclaré des mortalités importantes sur cordes fin avril début mai 2010 lorsque la température de l'eau dépassait 16°C.

L'effet des pratiques culturales sur la mortalité des huîtres est probablement masqué par l'effet dominant de la quantité d'agents infectieux dans l'environnement qui varie dans l'espace et dans le temps. L'effet des pratiques culturales sur la survie des huîtres ne serait détectable que lorsque la quantité d'agent infectieux serait sous un seuil permettant l'expression de ces effets. La question de l'effet des pratiques culturales sur la mortalité reste cependant cruciale puisqu'elles sont le seul facteur sur lequel professionnels et gestionnaires peuvent agir pour limiter l'épidémie et les mortalités d'huîtres qui sévissent chaque année.

Enfin, les mortalités varient en fonction du site de culture dans l'étang de Thau. Les huîtres maintenues protégées du risque de mortalité en mer ouverte et transférées dans l'étang de Thau meurent à 80% dans les concessions après seulement 10 jours alors que les individus déployés au large à ~200m de la zone conchylicole présentent 100% de survie au même moment. Les huîtres placées au large de la zone conchylicole présentent des fréquences de détection et des quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *V. splendidus* faibles comparées aux huîtres maintenues dans les concessions. L'analyse des courants suggère que les huîtres placées au large de la zone conchylicole n'ont pas été en contaminées par les huîtres cultivées dans la zone conchylicole. Ainsi, la contamination des huîtres par les agents infectieux et la mortalité qui en découle dépend de la localisation dans la lagune de Thau et plus précisément de l'hydrodynamique qui influence la connectivité entre les zones épargnées et les zones touchées par les mortalités. La suite des travaux proposés dans cette étude confirmera cette hypothèse : les huîtres placées au large subiront une forte mortalité et une infection par le virus herpès suite à un coup de vent à l'origine d'un déplacement rapide des masses d'eau du secteur conchylicole vers le large.

1.3. Objectifs

Le premier objectif consiste à déterminer la relation entre les pratiques culturales et la mortalité des huîtres. Bien que certaines pratiques culturales peuvent influencer les mortalités d'huîtres [15,23], les résultats obtenus sont souvent contradictoires, reflétant à la fois des effets d'interactions et des effets d'échelles spatiales non pris en compte dans les plans d'expériences [24].

Le second objectif consiste à établir la relation entre la détection d'agents infectieux et les mortalités d'huîtres. Bien que les études épidémiologiques et les expériences de laboratoire montrent une relation entre la détection d'ADN appartenant à OsHV-1 µVar et les mortalités d'huîtres [15-17], la corrélation entre ces deux variables doit être démontrée sur le terrain. D'autre part, l'implication possible des bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* comme variable explicative des mortalités d'huîtres doit être éclaircie.

Le troisième objectif consiste à examiner l'impact de l'état énergétique des huîtres comme variable explicative des mortalités, en lien avec les pratiques d'élevage. Notre hypothèse est que les pratiques d'élevage influencent l'état énergétique des

huîtres, affectant ainsi leur capacité à résister aux infections et donc, contribuent à moduler la mortalité.

Afin de répondre à ces objectifs, nous proposons une approche par corrélation à grande échelle plutôt qu'une approche expérimentale ponctuelle. Nous avons suivi la mortalité d'un lot d'huîtres âgées de moins d'un an, « présumé sain », c'est à dire maintenu indemne de mortalité et dans lequel on ne détecte pas d'ADN appartenant à OsHV-1. Ces huîtres « sentinelles » ont ensuite été déployées mi-mars 2011 sur une centaine de stations dans la lagune de Thau, où les pratiques culturales ont été qualifiées afin d'étudier la relation possible entre les pratiques culturales et la mortalité printanière des huîtres. Par ailleurs, des échantillons d'huîtres ont été régulièrement prélevés pour suivre la dynamique spatio-temporelle des agents infectieux (OsHV-1 et *V. splendidus*) et des réserves énergétiques.

Accessoirement, ce projet a permis de mettre à disposition les données de mortalité via des « bulletins mortalités » en temps réel, sur le site Internet du Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon de l'Ifremer. Une restitution publique réunissant professionnels, gestionnaires, élus, agents de l'état et médias a eu lieu le 18 janvier 2012 au MAPRAAT à Paris afin d'exposer, entre autres, les résultats marquants de ce projet de recherche et les principales recommandations qui en découlent [24]. Une restitution des résultats a également eu lieu dans la région Languedoc-Roussillon à Leucate le 4 avril 2012.

2. Matériel et Méthode

2.1. Les huîtres

Un lot de naissains d'huîtres creuses a été produit dans l'écloserie expérimentale du Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'Ifremer (LGP) en juillet 2010. Ce lot a été transféré en nurserie à la station expérimentale de Bouin en août 2010, puis au Laboratoire Environnement Ressource du Languedoc Roussillon de l'Ifremer à Sète le 15 mars 2011. Pendant tout ce temps, ce lot d'huîtres a été maintenu indemne de mortalité anormale. L'ADN appartenant à OSHV-1 n'a pas été détecté dans ces huîtres avant leur transfert en Méditerranée.

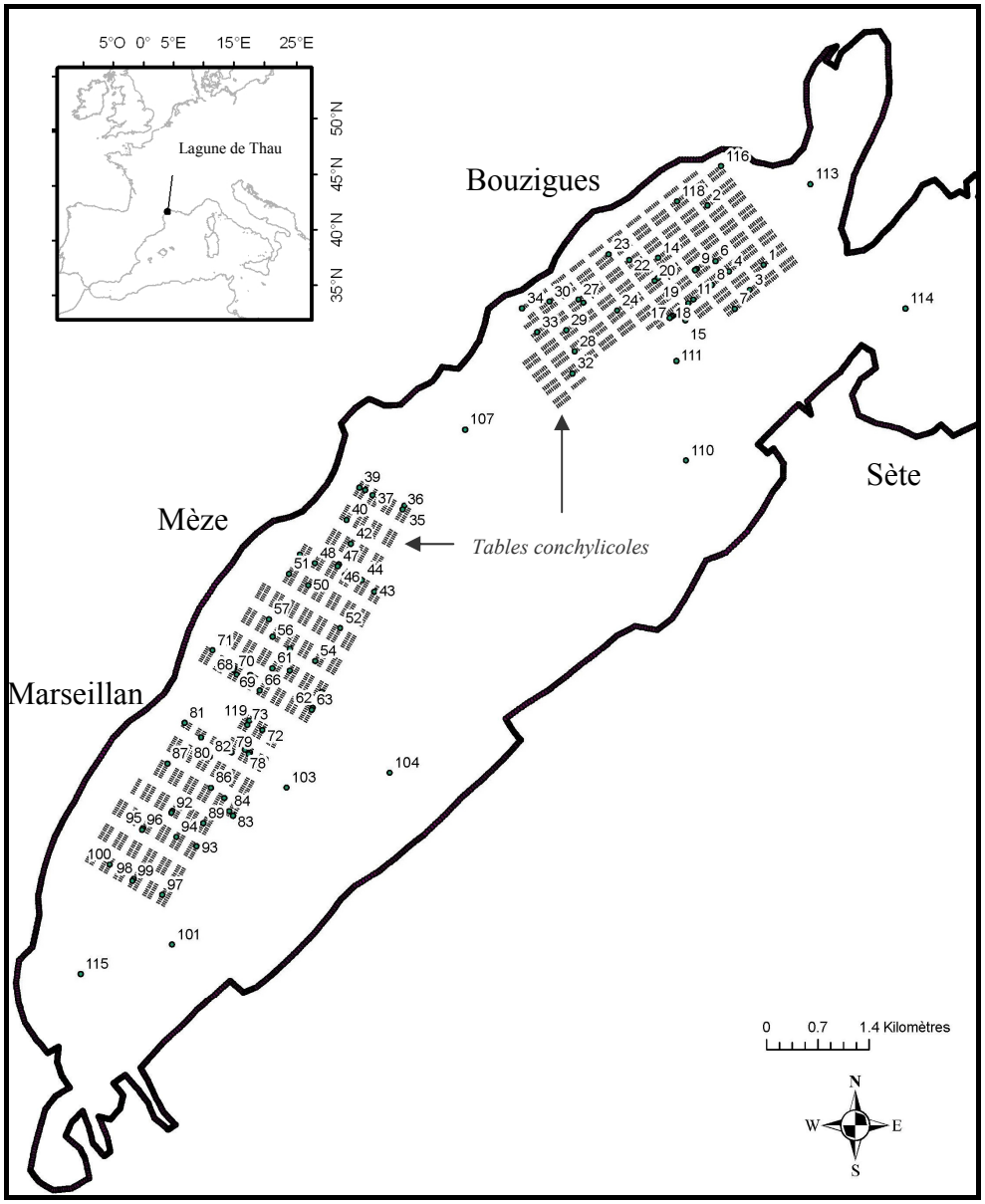
Ces animaux ont été repartis dans 106 paniers (perlnets), à raison de 150 individus par panier. A ce moment, le poids moyen des huîtres était de 0.7g et la longueur moyenne de coquille était de 10 mm.

2.2. Plan d'échantillonnage

Les 106 paniers d'huîtres ont été répartis dans les différents secteurs conchylicoles de la lagune de Thau (Bouzigues [n=35], Mèze [n=34] et Marseillan [n=29]) ainsi qu'à l'extérieur des zones d'élevage (n=8, Fig. 1). Chaque panier a été suspendu à 1 m de profondeur, soit à partir des tables conchylicoles dans les zones d'élevage, ou à partir de mouillages spécialement conçus en dehors des tables conchylicoles.

Chaque concessionnaire participant au projet (n=54) a été contacté individuellement par téléphone pour être informé des objectifs du projet et du protocole mis en place, et pour demander l'autorisation de suspendre les paniers d'huîtres expérimentaux et de visiter régulièrement le site d'élevage.

2.2.1. Survie



▲ **Figure 1.** Disposition des 106 paniers (points verts avec n° de 1 à 119) contenant chacun 150 huîtres, dans la lagune de Thau. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.

La survie des huîtres sentinelles a été évaluée en comptant les huîtres vivantes et mortes dans chacun des 106 paniers le 31 mars (état initial), puis le 06, 09, 13, 16, 19, 21, 24, 26, et 29 avril, 03, 06, 10, 13 et 20 mai. Les campagnes de comptage duraient 12h maximum avec 4 à 5 personnes embarquées sur un bateau Ifremer.

2.2.2. Pathologie, réserves énergétiques et marqueurs trophiques

Des prélèvements de 10 huîtres par panier ont été effectués pendant les campagnes de comptage des 06, 16 et 21 avril en vue d'analyses en pathologie (détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *V. splendidus*), des réserves énergétiques (triglycérides et sucres) et de marqueurs trophiques (acides gras). Ces huîtres ont été disséquées directement sur le bateau lors du déplacement entre deux stations, et immédiatement placées en sachet plastique (1 sachet par panier, chaque sachet contenant les 10 individus) et congelées dans l'azote liquide. De retour au laboratoire, ces échantillons ont été conservés à -80°C.

2.2.3. Pratiques culturales

Chaque concession où un panier d'huîtres sentinelles a été déployé était décrite selon plusieurs critères quantitatifs et qualitatifs. Parmi ces critères, nous avons pris en compte le pourcentage d'occupation globale de la concession par les mollusques bivalves (nombre de carré ou perche occupé(e) par rapport au nombre total), la densité d'occupation moyenne de la concession (nombre de fils par carré ou perche), le pourcentage d'occupation en fonction du type de culture (panier, lanterne, corde), du stade d'élevage (prégrossissement, grossissement, stockage/affinage), et des espèces cultivées (Tableau 1).

Les pratiques culturales en vigueur sur chaque concession où un panier d'huîtres a été déployé ont été caractérisées une première fois entre le 1er et le 4 avril 2011, avant les mortalités printanières, puis entre le 25 et le 28 mai 2011, à la fin du suivi mortalité, afin de tenir compte des éventuels mouvements de stocks. La caractérisation des pratiques culturales sur chaque concession a été saisie *in situ* sur ordinateur portable à l'aide du logiciel Terrasync©, qui est un outil d'acquisition de données géoréférencées associé au système de positionnement global (GPS) Trimble, « Pathfinder Power© ». La saisie cartographique se fait au travers de dictionnaires d'attributs permettant de saisir toute description attachée à un objet géographique. Le dictionnaire d'attribut est préparé avec le logiciel Pathfinder office©.

En complément des relevés des pratiques culturales sur le terrain par notre équipe, une enquête téléphonique a été réalisée début septembre 2011 auprès des 54 concessionnaires concernés par l'étude afin de connaître l'origine, la ploïdie, la provenance, l'âge et la date de mise en culture des animaux (Annexe I).

Tableau 1. Critères et attributs des tables conchylicoles définis en vue du diagnostic des pratiques culturales [voir **25 pour description détaillée des pratiques d'élevage et la terminologie**].

Critères	Attributs
1. Espèce en élevage	*Crassostrea gigas* *Mytilus galloprovincialis* *Crassostrea gigas et Mytilus galloprovincialis* *Ostrea edulis* Autre mélange
2. Stade d'élevage	Prégrossissement Grossissement Stockage Prégrossissement et grossissement Prégrossissement et stockage Grossissement et stockage Prégrossissement, grossissement et stockage Autre mélange, autre pratique
3. Densité de coquillage	Nombre de carré occupé par concession Nombre de carré occupé par concession pour *Crassostrea gigas* Nombre de carré occupé par concession pour *Mytilus galloprovincialis* Nombre de corde par perche Nombre de carré dédié au prégrossissement par concession Nombre de corde par perche dédié au prégrossissement Nombre de carré dédié au grossissement par concession Nombre de corde par perche dédié au grossissement Nombre de carré dédié au stockage par table Nombre de corde par perche dédié au stockage
4. Structure d'élevage	Tube Coupelle Coquille Pearlnet Collées < 35mm Collées > 35mm Pignes marseillaise moule Poche Casier australien Lanterne chinoise Mélange prégro. et grossissement sur table

2.2.4. Hydrodynamique

Nous avons utilisé le modèle hydrodynamique MARS-3D pour reproduire, en fonction des conditions météorologiques rencontrées durant la période des mortalités, la circulation des masses d'eau et des agents infectieux qu'elles sont susceptibles de transporter.

Le modèle numérique MARS-3D développé à l'Ifremer a été appliqué sur la lagune de Thau dans le cadre du chantier « Lagunes Méditerranéennes » du PNEC [26]. Ce modèle simule les variations de la surface libre et les champs de courant, de température, de salinité, ainsi que toute autre substance dissoute dans les trois dimensions du domaine [27]. La validation du modèle hydrodynamique sur la lagune de Thau [28,29] a permis de préciser les limites d'utilisation dans sa version actuelle. La confrontation des résultats de simulation à des mesures de courant *in situ* montre la capacité du modèle à reproduire le transport moyen sur la verticale (en intensité et direction) en dehors des zones conchylicoles. En revanche, l'abattement important de l'intensité des courants par les structures conchylicoles, mis en évidence par les mesures, n'est pas, à l'heure actuelle, reproductible par le modèle. En effet, aucun paramètre n'est saisi dans le modèle pour prendre en compte la présence des structures conchylicoles.

Dans le cadre de cette étude, nous avons caractérisé l'impact des structures conchylicoles à différentes échelles spatiales afin de déterminer les paramètres du modèle permettant de simuler l'abattement du courant dans les zones conchylicoles. Par la suite, nous avons utilisé le modèle numérique MARS-3D pour décrire le transport des agents infectieux à l'intérieur des concessions pendant le suivi des mortalités en 2011, mais également en 2009 et en 2010. Sur la lagune de Thau, la résolution spatiale du modèle est de 100 m. La grille de calcul a été réalisée à partir des données bathymétriques actualisées en 2010.

Dans le cadre du présent rapport, nous nous sommes limités à la description du transport des particules à l'intérieur des concessions pendant les périodes de mortalité. Nous avons utilisé le modèle physique MARS-3D appliqué à la lagune de Thau, implémenté avec un module « canopée » qui permet d'intégrer l'effet des concessions conchylicoles, pour simuler le transport des particules (agents infectieux) en fonction :

- de la localisation des foyers infectieux de départ (27 points sur les 3 zones d'élevage, voir annexe II),
- des années de suivi (2009, 2010 et 2011),
- du temps nécessaire pour diminuer de 90% la quantité d'agents infectieux dans le milieu (T_{90} = 1, 5, 25 jours, ou conservatif : pas de disparition dans le temps).

Les valeurs de T_{90} choisies sont cohérentes par rapport à d'autres valeurs connues pour des herpesvirus touchant l'anchois [30,31] ou le saumon d'élevage [32]. La

quantité initiale d'ADN appartenant à OsHV-1 à chaque point d'émission était de $1.3 \cdot 10^{15}$ copies (cp) d'ADN, correspondant à la quantité estimée émise par une concession de 1100 cordes de naissain en cours de mortalité (10^7 cp ADN mg^{-1} de tissu). Les simulations ont été initiées à partir du 4 mai 2009, 26 Avril 2010 et 13 avril 2011 lorsque les démarrages de mortalité ont été constatés [22].

Nous avons estimé les surfaces occupées par les concessions touchées aux seuils de 10^1, 10^2, ou 10^3 copies d'ADN OsHV-1 mL^{-1} pendant au moins 4 jours pour chaque combinaison de simulation (27 points d'émission × 3 années × 3 T_{90}). Les mortalités apparaissent lorsque les huîtres sont exposées pendant 4 jours à 10^2 copies d'ADN OsHV-1 mL^{-1} ou 2 jours à 10^3 copies d'ADN OsHV-1 mL^{-1} (Pépin comm. pers.).

Ces simulations ont permis d'évaluer la sensibilité du paramètre « surfaces touchées par les agents infectieux » aux points d'émission de la maladie et aux valeurs prises par le T_{90} en fonction des années de suivi. Plus concrètement, ce travail permet d'évaluer l'impact probable de l'introduction d'huîtres malades et la connectivité hydrodynamique dans la lagune de Thau.

Les simulations reproduisent la dispersion dans le milieu uniquement en tenant compte de l'advection, du mélange (dilution) et des processus biologiques de disparition de OsHV-1 (T_{90}). En revanche, ces simulations ne tiennent pas compte des processus d'amplification et de relais lorsque OsHV-1 infecte les animaux voisins.

2.3. Analyses de laboratoire

2.3.1. Préparation des échantillons

Les tissus des huîtres prélevées ont été réduits en poudre à l'aide du vibro-broyeur à bille MM400 (Retsch, Eragny sur Oise, France) sous azote liquide. Chaque poudre était constituée de l'ensemble des tissus provenant des dix individus prélevés par panier. Ces échantillons ont été réduits en poudre sous azote liquide en vue d'analyse de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *V. splendidus*. Ces poudres ont également été utilisées pour l'analyse des réserves énergétiques (triglycérides et sucres) et des marqueurs trophiques.

2.3.2. Détection des agents infectieux

Les analyses réalisées en pathologie concernent essentiellement la détection de l'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *Vibrio splendidus* par PCRq selon les méthodes publiées du Laboratoire de génétique et Pathologie de L'Ifremer, transférées au réseau de laboratoires agréés dont le Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Hérault (LDV34).

2.3.2.1. Recherche de l'herpès virus OsHV-1

La méthode analytique utilisée est basée sur une technique développée au Laboratoire de Génétique et Pathologie de L'Ifremer et publiée [23]. Elle consiste en une

amplification en temps réel basée sur la chimie SYBR green et l'utilisation du couple d'amorces DP-F/DP-R ciblant le gène de l'ADN polymérase du virus OsHV-1. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode. En cas de détection d'ADN viral d'OsHV-1, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être mesurée et associée. Elle renseigne sur l'implication ou non de l'agent infectieux en cas de mortalité. Les quantités d'ADN de OsHV-1 supérieures à 10^4 copies mg^{-1} de tissu frais sont le signe d'une réplication active du virus dans l'hôte et témoignent de son action dans le processus morbide.

2.3.2.2. Recherche de bactéries appartenant au groupe de *Vibrio splendidus*

La méthode analytique utilisée pour l'identification de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* est basée sur une technique de PCR Taqman quantitative développée au Laboratoire de Génétique et Pathologie et en cours de publication (Saulnier et al., en préparation). Cette méthode s'inspire en partie de la méthode de quantification par PCRq de *V. aestuarianus* [24]. Elle consiste en une amplification par PCR en temps réel d'ADN extrait à partir de tissus et utilisant le couple d'amorces et sonde Taqman (16S SpF2/16S SpR2 et 16S probe). Cette méthode détecte toutes les espèces appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus*. Ce groupe est actuellement représenté, en l'état actuel des connaissances, par huit espèces, génétiquement très proches: *V. lentus, V. cyclitrophicus, V. pomeroyi, V. tasmaniensis, V. splendidus, V. kanaloae, V. gigantis* et *V. crassostreae*.

2.3.3. Réserves énergétiques et marqueurs trophiques

Les sucres et les triglycérides sont les réserves énergétiques principales des mollusques bivalves. Ces variables sont donc des indicateurs de l'état énergétique des huîtres. Notre hypothèse est que les pratiques culturales environnantes peuvent influencer le contenu énergétique des huîtres cultivées et la mortalité qui en découle. Nous avons observé en 2010 que la condition physiologique des huîtres maintenues sur cordes, évaluée à l'aide de la teneur en sucre et en triglycéride, était de ~2 fois supérieures à celle des animaux de même origine maintenus en paniers australiens [15].
La composition en acides gras des lipides de réserves permet d'identifier le type de proies ingérées par l'animal, compte tenu que ces molécules sont peu modifiées lors de la fabrication de réserve et qu'elles sont caractéristiques de la source alimentaire (bactérie, phytoplancton, détritus) [33,34]. Par conséquent, la composition en acides gras des lipides neutres dans les huîtres pourrait révéler des informations intéressantes quant aux sources de nourriture utilisées par les huîtres.

2.3.3.1. Sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés selon la méthode de Dubois [25]. Brièvement, un échantillon de poudre (~200 mg) est dilué dans 3 mL d'eau MilliQ. L'échantillon est dilué d'un facteur 10.0× ou moins selon la concentration initiale en sucre. Un aliquot de l'échantillon dilué (250 µl) est mélangé avec 500 µl d'une solution de Phénol (5%) puis 2.5 mL de H2SO4. Après 20 min, l'échantillon est placé dans un spectrophotomètre pour lecture de l'absorbance de l'échantillon à 490 nm et 600 nm. La densité optique (DO) est calculée selon la formule : DO=DO490-1.5×(DO600-0.003). La concentration en sucre est par la suite calculée à partir d'une gamme étalon et exprimée en % de la masse sèche de tissu d'huître.

2.3.3.2. Classes de lipides

Un échantillon de poudre (~300 mg) est dilué dans 3 mL de mélange de Folch (chloroforme/méthanol 2:1 v/v) stocké à -80°C dans des tubes en verre de 4 mL munis de bouchons à vis, à joint en téflon, sous atmosphère d'azote. Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch [26] puis déposés sur des Chromarods SIII (Iatron laboratories, Tokyo, Japon). Les classes de lipides sont séparées en immergeant la base des Chromarods SIII dans un système de solvant de polarité croissante tel que décrit dans Parrish [27]. Les classes de lipides sont quantifiées par un détecteur à ionisation de flamme (FID) d'un Iatroscan MK-VI (Iatron laboratories, Tokyo, Japon). Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons particulièrement aux triglycérides (TAG) qui constituent les réserves énergétiques des huîtres.

2.3.3.3. Acides gras

2.3.3.3..1 Séparation des lipides neutres (réserves) et polaires (membrane)

Un sous échantillon de 750 µl de l'échantillon de poudre utilisé pour le dosage des classes de lipides est prélevé, évaporé à sec sous azote gazeux puis repris trois fois dans 500 µl de $CHCl_3$–MeOH (98:2 v/v) pour être placé en tête de micro colonne de silice [30×5 mm i.d.; Kieselgel; 70–230 mesh (Merck, Lyon, France); brûlé à 450°C puis désactivé avec 5% d'eau MilliQ]. Les lipides neutres (réserves) sont élués avec 10 mL de $CHCl_3$–MeOH (98:2 v/v), puis les lipides polaires sont récupérés avec 20 mL de méthanol. Chaque fraction est recueillie dans un tube où l'on rajoute 2.3µg de C23:0 à 0.23µg/ml, puis est évaporée à sec sous azote ou sous vide.

2.3.3.3..2 Méthode de transesterification

Chaque fraction de chaque échantillon reçoit 1 mL de BF_3-MeOH (10%), est mélangée vigoureusement puis chauffée 10 min à 100°C tel que décrit dans Metcalfe et Schmitz [35]. Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits et analysés selon la méthode développée par Marty et al. [36]. Les EMAG sont analysés par chromatographie en phase gazeuse par injection directe dans une colonne capillaire de type DB-wax (30 m × 0.25 mm; 0.25 µm) et ionisation de flamme au laboratoire de physiologie des invertébrés à l'Ifremer de Brest.

2.4. Statistiques

Les cartographies de la mortalité cumulée, du temps moyen de survie, des agents infectieux (quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *V. splendidus*), des réserves énergétiques et des acides gras dans les huîtres à l'échelle de la lagune ont été calculées par krigeage basé sur le calcul, l'interprétation et la modélisation du variogramme expérimental. Les variogrammes modélisés dans ce projet intègrent une composante pépitique, une composante sphérique, et/ou une composante linéaire (non-stationnaire). L'estimation a été réalisée sur une grille de 50 x 50 m en voisinage unique, toutes les mesures étant utilisées pour l'estimation de chaque point cible. L'ensemble des calculs et modélisations a été réalisé à l'aide du logiciel Isatis 11.0, développé par la société Geovariances [37].

La survie a été analysée à l'aide de la procédure Lifetest du programme SAS (SAS 9.1.3). Les fonctions de survie ont été estimées selon Kaplan-Meier et

comparées entre les zones (Bouzigues, Mèze, Marseillan, hors zone d'élevage), les diagnostics (présence/absence d'ADN d'OsHV-1 et *V. splendidus*) et les pratiques culturales. Les statistiques utilisées sont fondées sur des tableaux de contingences construits sur l'ensemble des temps d'évènements de mortalité. Ce sont des statistiques de rang, la plus couramment utilisée étant la statistique dite du Log-rank. Dans ce rapport, nous nous sommes particulièrement intéressés au paramètre de temps moyen de survie des huîtres, calculé à partir du 6 avril 2012, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C (Annexe III).

L'effet du temps et de la zone sur l'ensemble des variables a été analysé à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées. Des modèles de régressions linéaires de type « stepwise » ont été utilisés afin d'examiner la relation possible entre le temps moyen de survie des huîtres et les variables quantitatives (concentrations en ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus*, quantités de réserves énergétiques et marqueurs trophiques).

3. Résultats

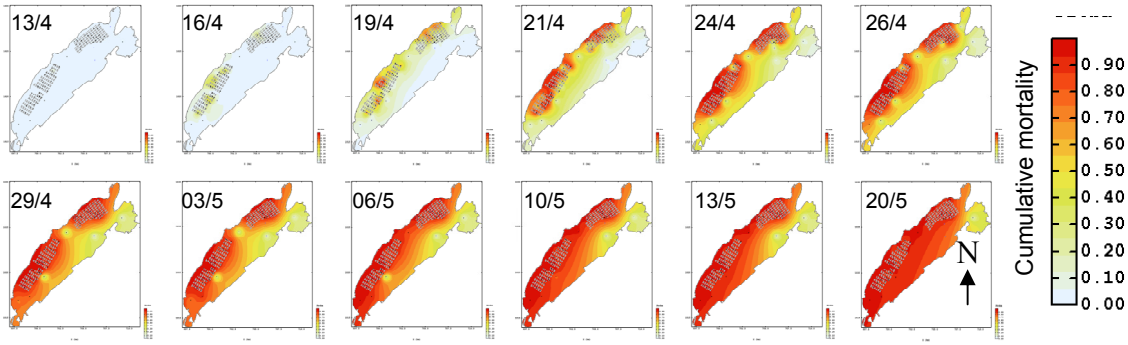
3.1. Survie

Les premières mortalités significatives (>15% des effectifs contenus dans les paniers) ont été constatées dans 1/106 panier, localisé dans la zone conchylicole de Mèze, le 13 avril, lorsque la température de l'eau était d'environ 17 °C (Fig. 2). Le 16 avril, les mortalités ont touché 20/106 paniers, majoritairement localisés dans les zones conchylicoles de Mèze (7/34) et Marseillan (10/29), alors que la zone de Bouzigues était moins touchée (3/35). Le 19 avril, 61/106 paniers ont été touchés dans les zones conchylicoles de Bouzigues (18/35), Mèze (23/34) et Marseillan (20/29). La moyenne des mortalités cumulées dans les paniers touchés était de 62%. Le 21 avril, les mortalités ont touché 88% des paniers déployés dans la lagune, et la mortalité cumulée moyenne était de 80%. Le 24 avril, les mortalités ont été constatées pour la première fois dans les huîtres placées dans un panier hors des zones d'élevage (panier n°115, Fig. 1). Dans les zones d'élevage, les mortalités ont progressé jusqu'à toucher 95/100 paniers, à hauteur de >90% de mortalité cumulée moyenne. Le 29 avril, les mortalités ont touché tous les paniers d'huîtres placés dans les zones d'élevage. Entre le 3 et le 20 mai, les mortalités se sont propagées hors des zones d'élevage, du SO de la lagune vers le NE (Fig. 2). Le 20 mai, seules les huîtres placées dans les paniers n°111 et 114 (Fig. 1), proches des entrées maritimes des canaux de Sète, ont été exemptes de mortalité (Fig. 2).

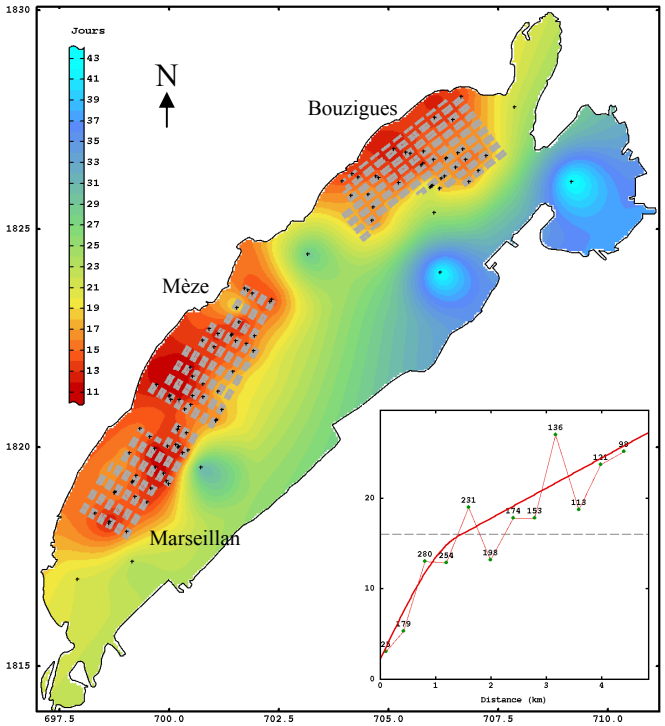
Les variogrammes calculés pour les différentes dates d'échantillonnage ont montré une évolution significative de la structure spatiale au cours de la période d'étude:

- Structure spatiale pépitique au début de la période (apparition sporadique et aléatoire des premières mortalités),

- Structuration de plus en plus marquée au cours du développement des zones infectées (cohérence spatiale de zones progressivement impactées),
- Déstructuration en fin de période (les mortalités atteignent quasiment partout 100%).



▲ **Figure 2.** Cartographie des mortalités cumulées du naissain d'huîtres creuses « sentinelles » *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011 en fonction du temps.

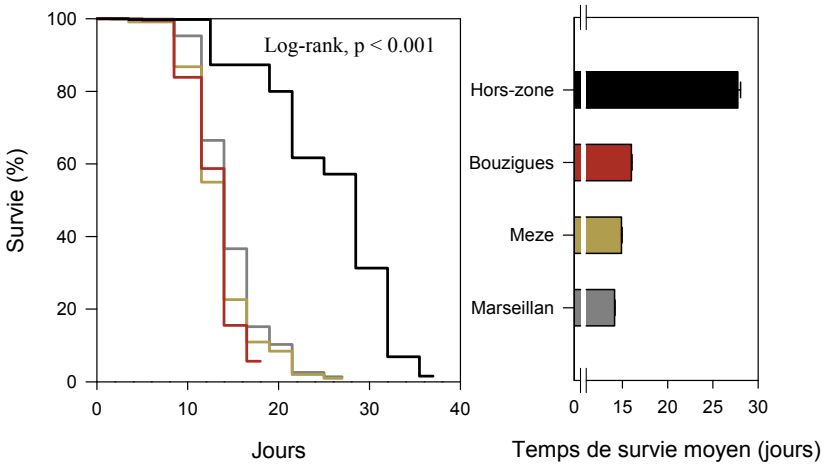


◄ **Figure 3.** Cartographie du temps moyen de survie des huîtres creuses *C. gigas* dans la lagune de Thau. Le temps moyen de survie a été calculé en jours écoulés depuis le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole. Le variogramme expérimental (trait fin) et le modèle de variogramme (trait épais) du temps moyen de survie sont présentés en bas à droite. Le nombre de paires de points utilisés pour le calcul du variogramme expérimental est indiqué en fonction de la distance.

Bien que la survie finale des huîtres était < 10% sur l'ensemble de la lagune de Thau (sauf sur deux sites épargnés), le temps moyen de survie des huîtres variait entre 8 jours (1er cas de mortalité) et plus de 45 jours dans le cas des sites épargnés où aucun événement de mortalité n'a été constaté pendant la durée du suivi.

Le modèle de variogramme des données de temps moyen de survie des huîtres est constitué d'une composante pépitique, d'une composante sphérique de portée ~1 km et d'une composante linéaire à grande échelle (Fig. 3). Ce variogramme montre que les temps moyen de survie des huîtres mesurés à des emplacements proches sont très similaires (illustration d'un effet de pépite relativement faible) et qu'ils divergent à mesure que la distance entre les points de mesure augmente (composante sphérique). Bien qu'il n'y ait pas de phase stationnaire dans ce modèle de variogramme, un point d'inflexion de la variance du temps moyen de survie est visible pour des couples de points distants de ~1 km.

Les courbes de survie et le temps moyen de survie des huîtres étaient différents entres les zones de Marseillan, Mèze, Bouzigues et hors zones d'élevage (Fig. 4). En moyenne, les huîtres placées à Mèze et Marseillan ont survécu seulement 14.5 jours, soit 1.5 jours de moins que les animaux déployés à Bouzigues, pour lesquels le temps moyen de survie était de 16.0 jours. Le temps moyen de survie des huîtres hors des zones d'élevage était nettement supérieur (27.8 jours) à celui des animaux placés dans les zones d'élevage (Fig. 4). Il n'y avait pas de site dans les zones conchylicoles où les huîtres ont été indemnes de mortalité.



▲ **Figure 4.** Fonction de survie (gauche) et temps moyen de survie (droite) de l'huître creuse *C. gigas* en fonction des zones d'élevage (Bouzigues, Mèze et Marseillan), et hors des zones d'élevage, dans la lagune de Thau. Le temps moyen de survie a été calculé en jours écoulés depuis le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C.

En conclusion :

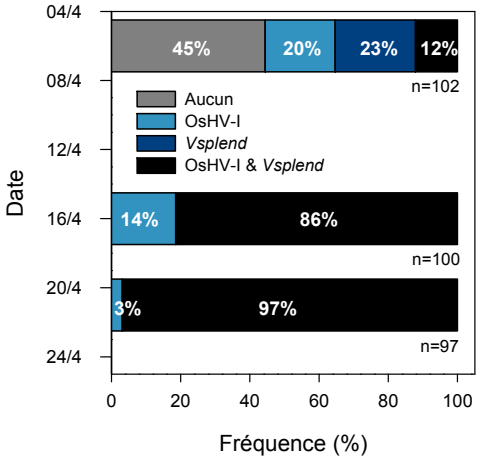
- La mortalité des huîtres « sentinelles », déployées sur 106 stations dans la lagune de Thau, était supérieure à 90% sur 104 stations : seules 2 stations ont été épargnées.
- Il n'y avait pas de site indemne de mortalité dans les zones d'élevage.
- Les mortalités d'huîtres se sont déclarées tout d'abord dans les zones d'élevage (Mèze et Marseillan, puis Bouzigues), et elles ont progressivement touché l'ensemble de la lagune, incluant les sites éloignés des élevages.

  Le temps moyen de survie des huîtres variait entre 8 et plus de 45 jours en fonction de la localisation dans la lagune : il était de seulement 15.0 jours dans les zones d'élevage contre 27.8 jours hors des zones d'élevage.

- La mortalité cumulée et le temps moyen de survie sont des variables structurées dans l'espace : ces variables prennent des valeurs qui sont similaires lorsque les points sont proches, des valeurs différentes lorsque les points sont éloignés. Cette structure spatiale est cohérente avec le caractère contagieux du phénomène de mortalité.

3.2. Pathologie

3.2.1. Fréquence de détection des agents infectieux



◄ **Figure 5.** Fréquence de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et au groupe bactérien *V. splendidus* dans les tissus d'huîtres creuses *C. gigas* le 06, 16 et 21 avril 2011. L'analyse porte sur 10 huîtres prélevées dans chaque panier repartis sur 106 points dans la lagune de Thau (les effectifs exacts sont indiqués sous les barres à droite).

Lorsque la température de l'eau avait atteint 16.0°C le 06 avril, les huîtres prélevées dans 45% des paniers étaient négatives au test de détection d'ADN appartenant à OSHV-1 et à *V. splendidus* (Fig. 5). En revanche, les huîtres échantillonnées dans 12% des paniers étaient positives à la fois à OsHV-1 et à *V. splendidus*. Les huîtres prélevées dans les unités expérimentales restantes étaient positives soit à OsHV-1 (20%), soit à *V. splendidus* (23%).

Le 16 avril, alors que les mortalités avaient démarré, la détection d'ADN appartenant à OSHV-1 était généralisée à l'ensemble des paniers d'huîtres. Dans 86% des cas, il y avait aussi détection d'ADN de *V. splendidus*.

Enfin, le 21 avril, lorsque les mortalités s'étaient généralisées à l'ensemble des zones d'élevage, les huîtres prélevées dans 97% des paniers déployés dans la lagune de Thau étaient positives au test de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus*.

La progression du phénomène de mortalité des huîtres dans le temps coïncide avec l'augmentation de la fréquence de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 dans un premier temps, puis à *V. splendidus* par la suite.

3.2.2. Relation entre la détection d'agents infectieux et la survie des huîtres

Afin d'étudier la relation entre la détection d'ADN appartenant à des agents potentiellement infectieux (OsHV-1 et *V. splendidus*) et la survie des huîtres, nous avons agrégé les données de diagnostic établies le 06, 16 et 21 avril en combinaisons. Par la suite, nous avons évalué le temps moyen de survie des huîtres en fonction de chaque combinaison (Tableau 2).

Tableau 2. Temps moyen de survie des huîtres *C. gigas* en fonction du diagnostic (détection d'ADN) OsHV-1 (O) et *V. splendidus* (V) le 06, 16 et 21 avril 2011. La fréquence indique le nombre de fois que chaque combinaison de diagnostic a été détectée par rapport au nombre total analysé (n = 88). Les données sont classées en ordre croissant par rapport au temps moyen de survie. Non détecté : nd.

Diagnostic			Survie	Fréquence
06/04 j_0	16/04 j_{10}	21/04 j_{15}	(jours)	(%)
O+V	O+V	O+V	14.1	9.1
O+V	O	O+V	14.5	1.1
O	O	O+V	14.9	3.4
nd	O+V	O+V	15.4	37.5
V	O	O+V	16.3	3.4
V	O+V	O+V	16.3	22.7
O	O+V	O+V	16.7	12.5
nd	O	O+V	17.4	8.0
nd	O+V	O	26.8	2.3

Parmi les 64 combinaisons de diagnostics théoriquement possibles (4 diagnostics × 3 dates de prélèvements, $4^3 = 64$), seules 9 combinaisons se sont effectivement réalisées (Tableau 2). La combinaison la plus fréquemment observée (37.5% des cas) concernaient des paniers contenant des huîtres négatives au test de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* le 06 avril, puis positives à ces

deux microorganismes le 16 et le 21 avril. Le temps moyen de survie des huîtres caractérisées par cette combinaison de diagnostics était de 15.4 jours après le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C.

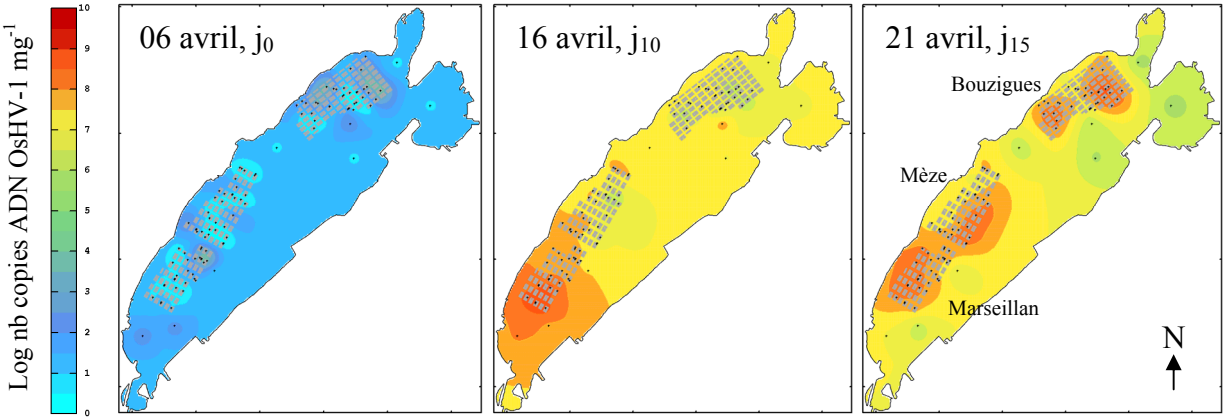
Par ailleurs, 35.2% des paniers contenaient des huîtres positives à OsHV-1 ou à *V. splendidus* le 06 avril (respectivement 12.5% et 22.7% des cas), puis positives à ces deux microorganismes le 16 et le 21 avril (Tableau 2). Le temps moyen de survie de ces animaux était alors de 16.3-16.7 jours.

En général, le temps moyen de survie des huîtres variait en fonction des combinaisons de diagnostics. Les huîtres dont le temps moyen de survie est le plus court (14.1 jours) étaient diagnostiquées positives à OsHV-1 et à *V. splendidus* dès le 06 avril (9.2% des cas). En revanche, les huîtres dont le temps moyen de survie était le plus long étaient négatives à OsHV-1 et à *V. splendidus* le 06 avril, positive à ces deux microorganismes le 16 avril, puis positive à OsHV-1 seulement le 21 avril. Cette combinaison de diagnostique était rare (2.3% des cas) et concernait les huîtres placées dans des paniers hors zones conchylicoles ou en bordure (points n°17 et n°107).

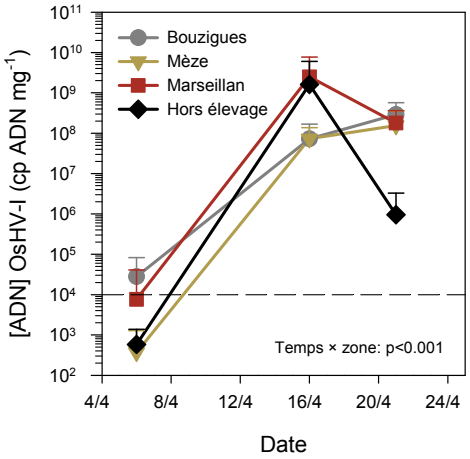
Par conséquent, il semble que l'infection précoce (06 avril) influence le temps moyen de survie des huîtres : la co-détection précoce d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* coïncide avec des temps moyens de survie faibles, alors que l'absence de détection coïncide avec des temps moyens de survie plus longs. Bien que les huîtres placées hors zones d'élevage, caractérisées par un temps moyen de survie de 26.8 jours, étaient positives au test de détection d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* le 16 avril, ces animaux ont éliminé l'ADN appartenant à *V. splendidus* de leur tissu le 21 avril. Il est possible que l'absence de mortalité limite la prolifération de *V. splendidus* qui est favorisée par l'utilisation de substrat d'individus morts. Réciproquement, l'absence de mortalité pourrait refléter la capacité des huîtres à surmonter une infection par *V. splendidus* qui aurait pu leur être fatale à court terme.

3.2.3. Concentration d'ADN détecté

3.2.3.1. OsHV-1



▲ **Figure 6.** Cartographie des quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 détectées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011 en fonction du temps. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.



◀ **Figure 7.** Quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 détectées dans les tissus du naissain d'huître creuse *C. gigas* le 06, 16 et 21 avril 2011 agrégées par zone dans la lagune de Thau (moyenne ± écart-type). La ligne de référence = 10^4 indique la concentration au delà de laquelle OsHV-1 est considéré comme impliqué dans le processus de mortalité.

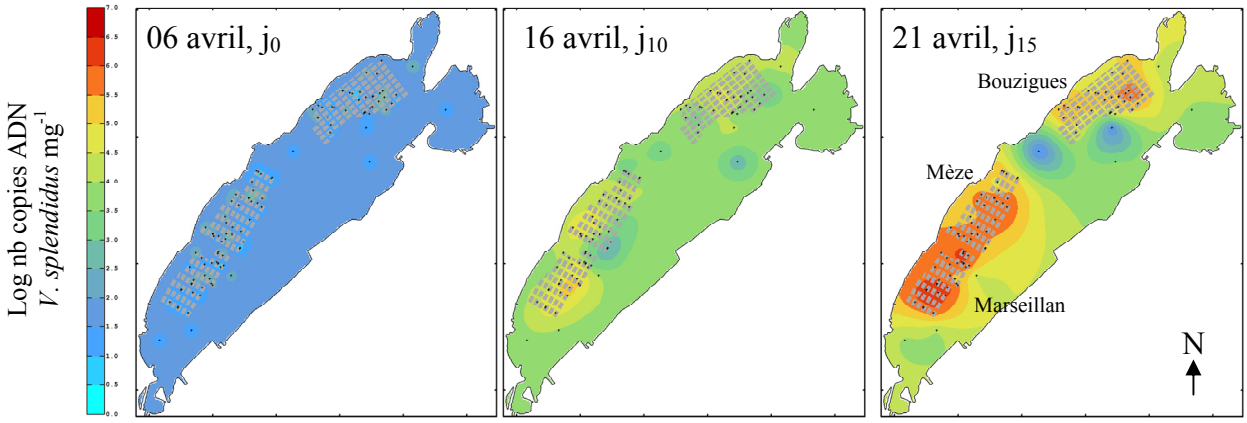
Le 06 avril, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C, les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 variaient entre 0 (c'est à dire non détecté au seuil de 10^2 copies d'ADN viral mg^{-1}) et $2.5 \cdot 10^5$ copies d'ADN mg^{-1} (Fig 6). En moyenne, la quantité d'ADN appartenant à OsHV-1 détectée dans les huîtres était de $1.2 \cdot 10^4$ copies d'ADN mg^{-1}.

Le 16 avril, alors que les mortalités avaient démarré et que la détection d'ADN appartenant à OsHV-1 était généralisée à l'ensemble des paniers d'huîtres sentinelles (Fig. 5), la quantité moyenne détectée a augmenté de façon marquée pour atteindre $9.0 \cdot 10^8$ copies d'ADN mg^{-1} (Fig. 6 et 7). Les quantités d'ADN viral détectées dans les huîtres étaient particulièrement élevées dans la zone SO de la lagune à Marseillan ($2.5 \cdot 10^9$ copies d'ADN mg^{-1}).

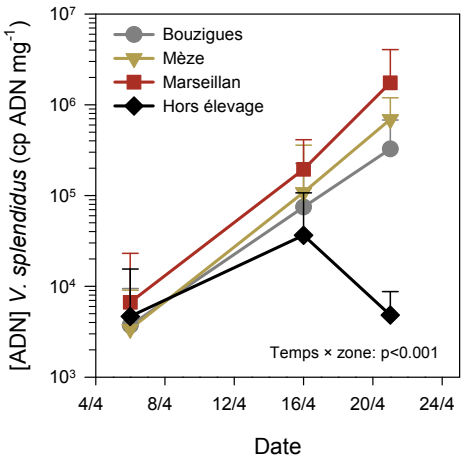
Enfin, le 21 avril, les quantités élevées d'ADN viral observées à Marseillan se sont généralisées aux autres zones d'élevage (Fig. 6) alors qu'elles ont diminué de façon

significative hors zones d'élevage, où la mortalité a eu lieu beaucoup plus tard ($9.6 \cdot 10^5$ copies d'ADN mg^{-1}, Fig. 7).

3.2.3.2. *Vibrio splendidus*



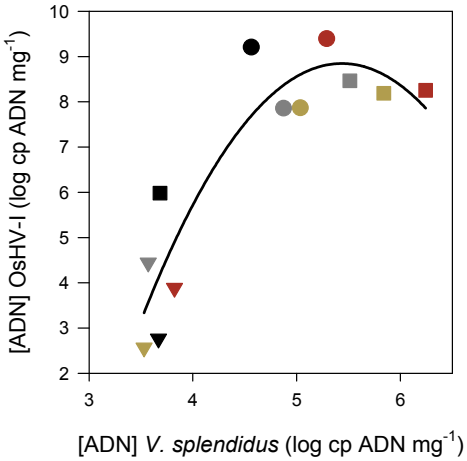
▲ **Figure 8.** Cartographie des quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011 en fonction du temps. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.



◀ **Figure 9.** Quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* le 06, 16 et 21 avril 2011 agrégées par zone dans la lagune de Thau (moyenne ± écart-type).

Le 06 avril, les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* étaient généralement faibles, variant entre 0 (c'est à dire non détecté au seuil de 10^2 copies d'ADN mg^{-1}) et $6.6 \cdot 10^4$ copies d'ADN mg^{-1} (Fig 8). En moyenne, la quantité d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectée dans les huîtres était de $4.5 \cdot 10^3$ copies d'ADN mg^{-1} (Fig. 9).
Le 16 avril, alors que les mortalités avaient démarré et que la détection d'ADN appartenant à *V. splendidus* était quasi-généralisée à l'ensemble des paniers d'huîtres (Fig. 5), la quantité moyenne détectée a augmenté pour atteindre $1.2 \cdot 10^5$ copies d'ADN mg^{-1} (Fig. 8 et 9). Les quantités d'ADN détectées dans les huîtres étaient particulièrement élevées dans les zones d'élevage ($1.2 \cdot 10^5$ copies d'ADN mg^{-1}) comparativement aux quantités détectées hors zone d'élevage ($3.7 \cdot 10^4$ copies d'ADN mg^{-1}).
Le 21 avril, les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* ont continué d'augmenter dans les huîtres placées dans les zones d'élevage, alors qu'elles ont diminué dans les animaux maintenus en dehors des zones d'élevage (Fig. 8 et 9).

3.2.3.3. Corrélation entre les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus*



◄ **Figure 10.** Quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 en fonction des quantités d'ADN de *V. splendidus* détectées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* le 06 (triangles), 16 (cercles) et 21 avril 2011 (carrés), dans les zones de Marseillan (rouge), Mèze (jaune), Bouzigues (gris) et hors zone d'élevage (noir).

Les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 étaient positivement corrélées avec les quantités d'ADN de *V. splendidus* détectées dans les naissains d'huîtres (Figure 10). La relation est quadratique, c'est à dire que les quantités d'ADN d'OsHV-1 détectées dans les huîtres augmentaient avec celles de *V. splendidus*, jusqu'à une valeur seuil au-delà de laquelle un plateau est atteint.

Il est possible que les bactéries utilisent le substrat d'individus morts pour croître, alors que le virus OsHV-1 utilise la machinerie cellulaire d'huîtres vivantes pour se répliquer. Dans ce cas, l'émergence des bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* serait plutôt une conséquence des mortalités d'huîtres causées par OsHV-1 plutôt qu'une cause directe. La détection d'ADN appartenant à *V. splendidus* demeure cependant un facteur aggravant, coïncidant notamment avec une réduction du temps moyen de survie des huîtres (voir section précédente).

3.2.4. Corrélation entre les quantités d'ADN détectées appartenant à OsHV-1 et *V. splendidus* et la survie des huîtres

Le temps moyen de survie des huîtres est négativement corrélé avec les quantités d'ADN détectées appartenant à OsHV-1 et *V. splendidus* le 16 et le 21 avril (Tableau 3). Les meilleurs coefficients de corrélation ont été obtenus entre le temps moyen de survie des huîtres et les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* le 21 avril, puis à OsHV-1 à la même date. Ces variables expliquent respectivement 28% et 20% de la variance observée du temps moyen de survie des huîtres dans la lagune de Thau.

Tableau 3. Coefficient de corrélation de Pearson et *p*-values entre le temps moyen de survie des huîtres et les quantités d'ADN détectées appartenant à OsHV-1 et *V. splendidus*.

	Date	r	*p*
OsHV-1	06/04	-0.117	0.248
	16/04	-0.317	**< 0.001**
	21/04	-0.451	**< 0.000**
V. splendidus	06/04	-0.122	0.226
	16/04	-0.350	**< 0.000**
	21/04	-0.533	**< 0.000**

En conclusion :

- La dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres coïncide avec la détection croissante d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus*, à la fois en fréquence (nombre de paniers touchés) et en quantité (nombre de copies d'ADN mg^{-1}).
- Tous les évènements de mortalité constatés *in situ* coïncident avec la détection d'ADN viral OsHV-1 en quantité importante : OsHV-1 est donc une cause prédominante de mortalité des huîtres.
- Le temps moyen de survie des huîtres varie en fonction de la détection d'ADN appartenant aux bactéries du groupe *V. splendidus* : il est restreint lorsqu'il y a détection précoce, il est accru lorsque l'ADN de *V. splendidus* est éliminé. *V. splendidus* module le temps de survie des huîtres.

3.3. Réserves énergétiques et marqueurs trophiques

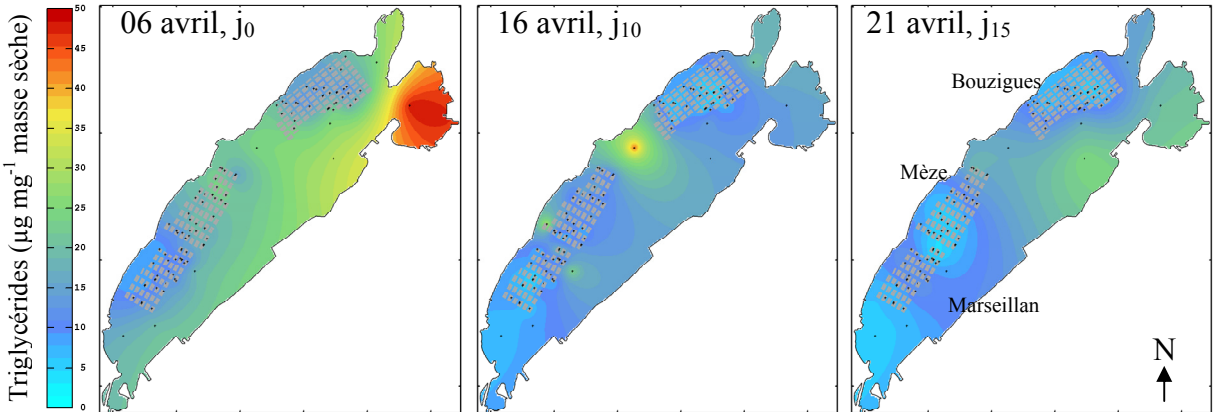
Les triglycérides (TAG) et les sucres totaux sont des indicateurs du niveau de réserves énergétiques des mollusques bivalves. Chez *C. gigas*, les lipides et les sucres suivent généralement des cycles saisonniers d'accumulation et d'utilisation en relation avec le cycle reproducteur [38-40]. Plus précisément, les sucres accumulés pendant l'hiver sont utilisés pendant la gamétogénèse au profit de la synthèse des lipides et des protéines au printemps. L'accumulation des sucres reprend après la ponte, moment où les niveaux sont généralement faibles.

La composition en acides gras des lipides de réserve permet d'identifier le type de nourriture ingéré par l'animal, compte tenu que ces molécules sont peu modifiées lors de la fabrication de réserve et qu'elles sont caractéristiques de la source alimentaire (bactéries, phytoplancton, détritus). Nous avons suivi la composition en acides gras des lipides des huîtres sentinelles afin d'identifier les sources principales de nourriture des huîtres en fonction du site d'élevage et du temps.

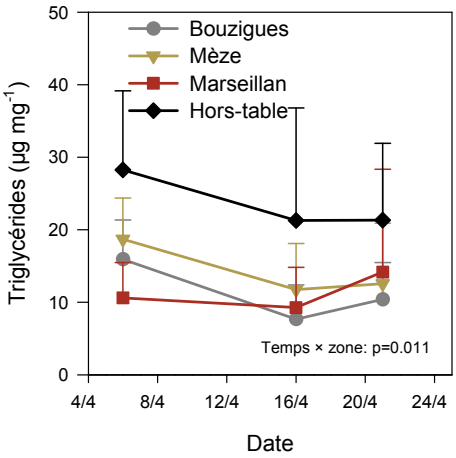
Ces données ont été mises en relation avec le temps moyen de survie des huîtres et la pathologie. L'hypothèse générale est que le temps moyen de survie des huîtres

était en partie modulé par la quantité de réserves énergétiques et la qualité de la nourriture reçue. Pour la première fois, cette étude montre la variance spatiale à haute résolution et à grande échelle des paramètres énergétiques et trophiques de l'huître creuse.

3.3.1. Les triglycérides



▲ **Figure 11.** Cartographie des quantités de triglycérides mesurées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011 en fonction du temps. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.



◀ **Figure 12.** Quantités de triglycérides mesurées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* le 06, 16 et 21 avril 2011 agrégées par zone dans la lagune de Thau (moyenne ± écart-type).

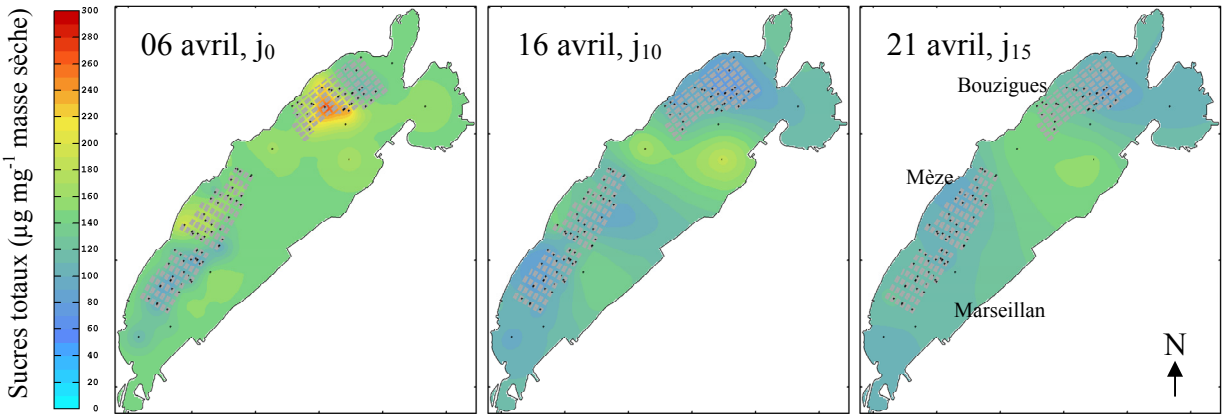
Le 06 avril, les quantités de triglycérides (TAG) contenues dans les huîtres étaient extrêmement variables entre les différentes stations, les valeurs minimales et maximales étant respectivement 2.2 µg mg^{-1} et 58.2 µg mg^{-1} (Fig. 11). Malgré cette variance importante, ces données étaient remarquablement structurées dans l'espace. Globalement, les TAG peuvent être classées de la façon suivante : Hors zone > Mèze, Bouzigues > Marseillan (Fig. 12).

Le 16 avril, alors que les mortalités avaient démarré, les TAG avaient diminué significativement de 37% à Mèze et de 52% à Bouzigues (Fig. 12), de sorte le classement devient : Hors-zone > Mèze, Marseillan, Bouzigues.

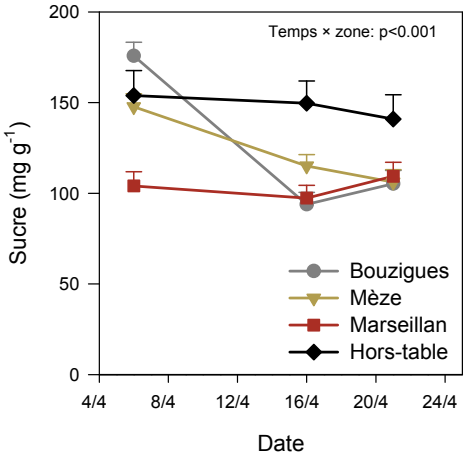
Le 21 avril, les TAG étaient comparables au 16 avril.

Dans l'ensemble, les variations spatiales de TAG dans les huîtres semblent coïncider avec les variations du temps moyen de survie : les quantités de TAG dans les huîtres placées hors des zones d'élevage, où le temps moyen de survie des huîtres était de 27.8 jours, étaient en moyenne 2 fois supérieures à celles des huîtres maintenues dans les zones d'élevage, où le temps moyen de survie était de seulement 15.0 jours (voir section suivante pour les analyses de corrélation et de régression). Par ailleurs, les TAG diminuent dans les zones d'élevage lorsque les mortalités démarrent, témoignant de l'affaiblissement des huîtres au cours de la maladie. En général, à cette période, le contenu en TAG augmente dans les huîtres.

3.3.2. Les sucres



▲ **Figure 13.** Cartographie des quantités de sucres totaux mesurées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011 en fonction du temps. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.



◄ **Figure 14.** Quantités de sucres totaux mesurées dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* le 06, 16 et 21 avril 2011 agrégées par zone dans la lagune de Thau (moyenne ± écart-type).

Le 06 avril, les quantités de sucres contenues dans les huîtres étaient extrêmement variables entre les différentes stations, les valeurs minimales et maximales étant respectivement 44.8 µg mg^{-1} et 308.0 µg mg^{-1} (Fig. 13). Comme pour les TAG, malgré une variance importante, ces données étaient remarquablement structurées

dans l'espace. Globalement, les quantités de sucres contenues dans les huîtres peuvent être classées de la façon suivante : Hors zone, Mèze, Bouzigues > > Marseillan (Fig. 14). Les quantités de sucres totaux dans les huîtres étaient faiblement corrélées avec les TAG ($r = 0.380$, $p < 0.001$, modèle linéaire)

Le 16 avril, alors que les mortalités avaient démarré, les quantités de sucres avaient diminué significativement de 22% à Mèze et de 47% à Bouzigues (Fig. 14), de sorte le classement devient : Hors zone > Mèze, Marseillan, Bouzigues, tel qu'observé pour les TAG. A cette date, les quantités de sucres totaux dans les huîtres étaient fortement corrélées avec les TAG ($r = 0.780$, $p < 0.001$, modèle linéaire).

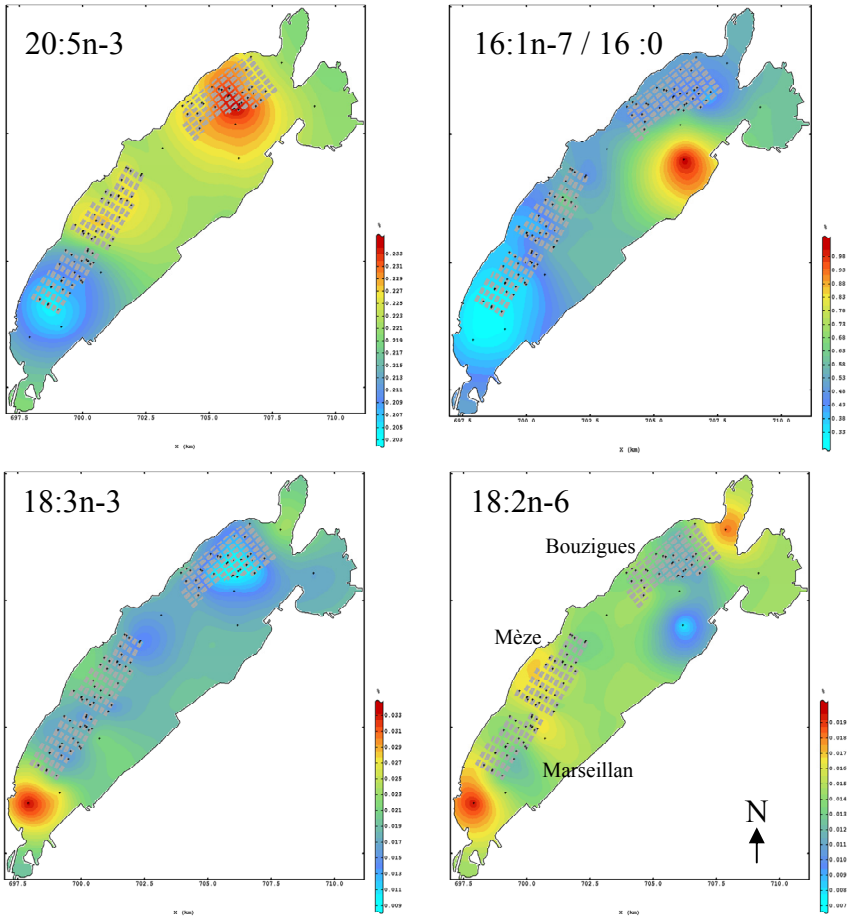
Le 21 avril, les quantités de triglycérides étaient comparables au 16 avril. A cette date, les quantités de sucres totaux dans les huîtres étaient également corrélées avec les TAG ($r = 0.610$, $p < 0.001$, modèle quadratique).

Bien que la cartographie initiale du 06 avril des quantités de sucres dans les huîtres était relativement différentes de celles des TAG, ces deux variables indiquent que les huîtres consommaient leurs réserves énergétiques lorsque les mortalités démarrent entre le 06 et le 16 avril, et que cette consommation était particulièrement marquée chez les huîtres placées dans les zones d'élevage où le temps de survie est moindre comparativement aux animaux maintenus hors des zones d'élevage.

3.3.3. Les marqueurs trophiques

Dans le cadre du présent rapport, l'analyse des acides gras comme marqueur trophique se limite aux indicateurs connus de l'abondance relative de diatomées (20:5n-3 et ratio de 16:1n-7 et 16:0) et de la matière organique d'origine terrigène (18:3n-3 et 18:2n-6) en date du 06 avril, avant le démarrage des mortalités.

La cartographie des teneurs en 20:5n-3 détectées dans les huîtres faisait état d'un gradient prononcé SO-NE, suggérant que les zones réputées moins productives du point vue conchylicole (Mèze et Marseillan) étaient moins riches en diatomées que la zone de Bouzigues et certains sites hors des zones d'élevage (Fig. 15). Ce résultat est en accord avec l'idée selon laquelle les diatomées soutiennent la croissance et la reproduction des huîtres dans la lagune de Thau [34]. Nos résultats confortent également l'idée que la composition taxonomique du phytoplancton varie en fonction de la position dans la lagune, avec des taxa d'origine marine (diatomées marines) prépondérants dans la partie NE du bassin [41]. Dans la partie SO, les diatomées marines sont toujours présentes mais on trouve également des flagellés fréquents en milieu lagunaire [34]. L'analyses de ces données agrégées par zone montre que 20:5n-3 à Bouzigues, Mèze > Hors zone, Marseillan.



▲ **Figure 15.** Cartographie des teneurs en acides gras (% et ratio) dans les tissus du naissain d'huîtres creuses *C. gigas* déployé sur 106 points dans la lagune de Thau en 2011. Les points noirs indiquent les points de mesure de survie. Les rectangles gris indiquent les zones d'élevage conchylicole.

Le ratio 16:1n-7/16:0, un autre indicateur de l'abondance relative des diatomées, était particulièrement faible dans les huîtres placées à Marseillan comparativement aux autres zones d'élevage (Fig. 15). En ce sens, cet indicateur est cohérent avec 20:5n-3. En revanche, les valeurs prises par le ratio 16:1n-7/16:0 étaient particulièrement élevées hors des zones d'élevage aux points 110 et 114 (voir Fig. 1), où les huîtres avaient survécu. Les quantités de TAG dans les huîtres étaient positivement corrélées avec le ratio de 16:1n-7 et 16:0 ($r = 0.481$, $p < 0.001$), suggérant que l'abondance relative des diatomées dans le régime alimentaire de l'huître est corrélée avec les quantités de TAG accumulées dans les tissus.

Finalement, les cartographies des teneurs en 18:2n-6 et 18:3n-6 faisaient également état de gradient spatiaux prononcés, généralement inverse à 20:5n-3 et 16:1n-7/16:0 respectivement. La somme de ces deux acides gras est généralement utilisée comme indicateur de la contribution de la matière organique d'origine terrigène. L'analyse de ces données agrégées par zone montre que Hors zone > Mèze, Marseillan > Bouzigues.

3.3.4. Matrice de corrélation

Le temps moyen de survie des huîtres était négativement corrélé avec les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* détectées dans les huîtres le 16 et le 21 avril (Tableau 4). Par ailleurs, le temps moyen de survie des huîtres était positivement corrélé avec les quantités de triglycérides et les valeurs de ratio 16:1n-7/16:0 le 06 avril.

Par conséquent, la présence d'agents infectieux en quantité importante influence négativement le temps de survie des huîtres, alors que la quantité de réserves énergétiques avant le démarrage des mortalités influence positivement le temps de survie.

Afin d'évaluer l'importance relative de chaque variable indépendante dans l'explication de la variance du temps moyen de survie des huîtres, un modèle de régression multiple de type « stepwise » a été utilisé (Tableau 5). Toutes les variables indépendantes corrélées avec le temps moyen de survie ont été intégrées au modèle. Ces variables étaient les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* détectées dans les huîtres le 16 et le 21 avril, les quantités de triglycérides et les valeurs de ratio 16:1n-7/16:0 le 06 avril, et les quantités de sucres le 16 avril.

Parmi les 7 variables d'entrée possibles, seules 4 d'entre elles ont été intégrées dans le modèle (Tableau 5). La première variable entrée dans le modèle était la quantité de triglycérides dans les huîtres le 06 avril. Cette variable explique 29% de la variance du temps moyen de survie des huîtres (Tableau 5). Les variables d'entrées 2 et 3 étaient les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les huîtres le 21 et le 16 avril. Ces variables ont permis d'expliquer 15% de variance supplémentaire. Finalement, la dernière variable entrée était les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 le 21 avril. Ces quatre variables expliquaient 49% de la variance du temps moyen de survie des huîtres dans la lagune de Thau.

En résumé, ces analyses suggèrent que le temps moyen de survie des huîtres était modulé en grande partie par la quantité de TAG dans les huîtres le 06 avril avant le démarrage des mortalités, et les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* le 16 et le 21 avril. Bien que OsHV-1, dont l'ADN a été détecté dans l'ensemble des huîtres déployées dans la lagune de Thau, soit une cause prédominante de mortalité, la teneur en réserves énergétiques et la montée en charge de *V. splendidus* dans les huîtres sont des paramètres explicatifs importants de la dynamique spatio-temporelle des mortalités.

Tableau 4. Coefficients de corrélation de Pearson. Les corrélations significatives (p<0.05) sont indiquées en gras.

Variables		Tps Survie moyen	OsHV-1			*V. splendidus*			Triglycérides			Sucre			20:5 (n-3)	16:1n-7/16:0	18:3 (n-3)	18:2 (n-6)
			06//04	16/04	21/04	06/04	16/04	21/04	06/04	16/04	21/04	06/04	16/04	21//04				
Tps Survie moyen		1.000																
OsHV-1	06/04	-0.117	1.000															
	16/04	**-0.317**	0.053	1.000														
	21/04	**-0.451**	-0.072	-0.142	1.000													
V. splendidus	06/04	-0.122	0.023	-0.020	0.040	1.000												
	16/04	**-0.350**	-0.001	**0.540**	**-0.213**	0.088	1.000											
	21/04	**-0.533**	0.000	0.084	**0.668**	0.058	0.002	1.000										
TAG	06/04	**0.520**	-0.197	-0.136	**-0.411**	0.028	-0.083	**-0.444**	1.000									
	16/04	0.152	0.045	0.093	**-0.490**	0.037	-0.058	**0.320**	**0.298**	1.000								
	21/04	0.118	-0.187	0.171	**-0.227**	0.030	0.003	**0.341**	**0.294**	**0.274**	1.000							
Sucre	06/04	0.120	-0.058	-0.178	-0.191	0.054	-0.048	**0.303**	**0.380**	0.086	0.056	1.000						
	16/04	**0.264**	-0.119	0.086	**-0.519**	0.042	-0.129	**0.191**	**0.354**	**0.780**	**0.316**	**0.199**	1.000					
	21/04	0.147	-0.178	0.167	-0.188	0.095	-0.123	**0.344**	**0.259**	**0.405**	**0.524**	0.166	**0.483**	1.000				
20:5n-3		0.038	**-0.200**	-0.189	0.088	0.195	-0.029	**0.480**	**0.397**	-0.095	0.056	**0.530**	-0.016	0.075	1.000			
16:1n-7 / 16:0		**0.411**	-0.104	**-0.213**	**-0.264**	-0.083	**-0.294**	0.172	**0.481**	0.111	**0.215**	**0.290**	**0.351**	0.116	**0.320**	1.000		
18:3n-3		0.221	0.017	**-0.314**	0.019	0.128	-0.128	-0.035	0.112	-0.097	-0.073	0.083	-0.119	**-0.216**	0.015	**0.200**	1.000	
18:2n-6		-0.181	0.088	0.225	-0.070	0.010	0.034	**0.278**	-0.042	**0.353**	-0.137	**-0.262**	0.088	-0.107	**-0.270**	-0.168	**-0.263**	1.000

Tableau 5. Résumé du modèle de régression multiple de type « stepwise » avec pour variable dépendante le temps moyen de survie des huîtres. Les variables indépendantes sont les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 et à *V. splendidus* détectées dans les huîtres le 16 et le 21 avril, les quantités de triglycérides et les valeurs de ratio 16:1n-7/16:0 le 06 avril, et les quantités de sucres le 16 avril.

N°	Paramètre	B	r^2	p
	Constante	33.362		< 0.001
1	TAG 06/04	0.346	0.296	< 0.001
2	*V. splendidus* 21/04	-0.186	0.382	0.085
3	*V. splendidus* 16/04	-0.318	0.447	0.000
4	OsHV-1 21/04	-0.267	0.488	0.015

En conclusion :

- Bien que les huîtres déployées dans la lagune de Thau sur les 106 stations provenaient du même lot initial, les teneurs en triglycérides (TAG), sucres et acides gras mesurées le 06 avril, soit seulement 24 jours après le déploiement et la constitution des paniers, étaient extrêmement variables entre les sites.
- Les quantités de TAG dans les huîtres placées hors des zones d'élevage, où le temps moyen de survie des huîtres était de 27.8 jours, étaient en moyenne 2× supérieures à celles des huîtres maintenues dans les zones d'élevage, où le temps moyen de survie était de seulement 15.0 jours.
- Lorsque les mortalités ont démarré entre le 06 et le 16 avril, les quantités de TAG et de sucres dans les huîtres ont diminué de ~40%, témoignant de l'affaiblissement des huîtres pendant cette période.
- Bien que OsHV-1 soit une cause prédominante de mortalité des huîtres, le temps moyen de survie était principalement modulé par la quantité de TAG dans les huîtres le 06 avril et les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les huîtres en période de mortalité.

  La baisse des teneurs en réserves énergétiques et la montée en charge de V. splendidus dans les huîtres sont des paramètres explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités.

- L'analyse des acides gras comme marqueurs trophiques suggère que l'abondance relative des diatomées dans le régime alimentaire de l'huître est corrélée avec les quantités de TAG accumulées dans les tissus et le temps moyen de survie.

  L'environnement trophique des huîtres jouerait un rôle indirect mais important dans la dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres.

3.4. L'environnement

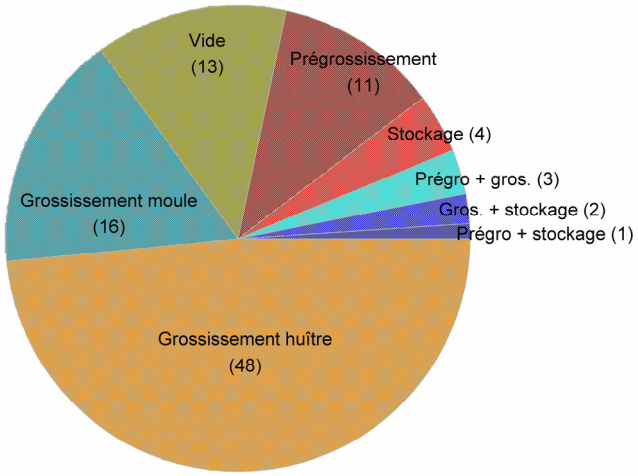
Nous avons vu jusqu'à présent que les mortalités d'huître dans la lagune de Thau en 2011 étaient quasi-généralisées à l'ensemble des sites, mais que le temps moyen de survie était assez variable. Bien que OsHV-1 soit une cause prédominante de mortalité, nous avons vu que la variance spatiale du temps moyen de survie de huître pouvait s'expliquer, en grande partie (49%), par la quantité de TAG dans les huîtres avant les mortalités et par les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les huîtres en période de mortalité. En revanche, 51% de la variance du temps moyen de survie reste à expliquer.

Les pratiques culturales ont été caractérisées début avril 2011 sur l'ensemble des sites situés dans les zones d'élevage où les paniers d'huîtres ont été déployés (n=97 concessions).

3.4.1. Les pratiques culturales

3.4.1.1. Les types d'élevage

Les différents types d'élevage sont le fruit de l'agrégation des variables « espèce en élevage » et « stade d'élevage » (Tableau 1). Dans 90% des cas, les concessions étaient dédiées à un seul type d'élevage, les mélanges étant plutôt rares (Figure 16). Le grossissement d'huîtres était majoritaire (48.5%), suivi de l'élevage de moules (16.5%) et du prégrossissement d'huîtres (11.3%). Seules 4.1% des concessions étaient dédiées au stockage d'huîtres. Au total, nous avons recensé 13.4% de concession entièrement vides.



◄ **Figure 16.** Répartition des types d'élevage recensés sur les concessions où les paniers d'huîtres « sentinelles » ont été déployés dans la lagune de Thau. Les fréquences de chaque catégorie sont indiquées entre parenthèses. Cette représentation repose sur un effectif total de 97 concessions.

Nous avons examiné les courbes de survie et le temps moyen de survie des huîtres en fonction du type d'élevage. Les mélanges, généralement peu représentés, ont été éliminés de l'analyse.

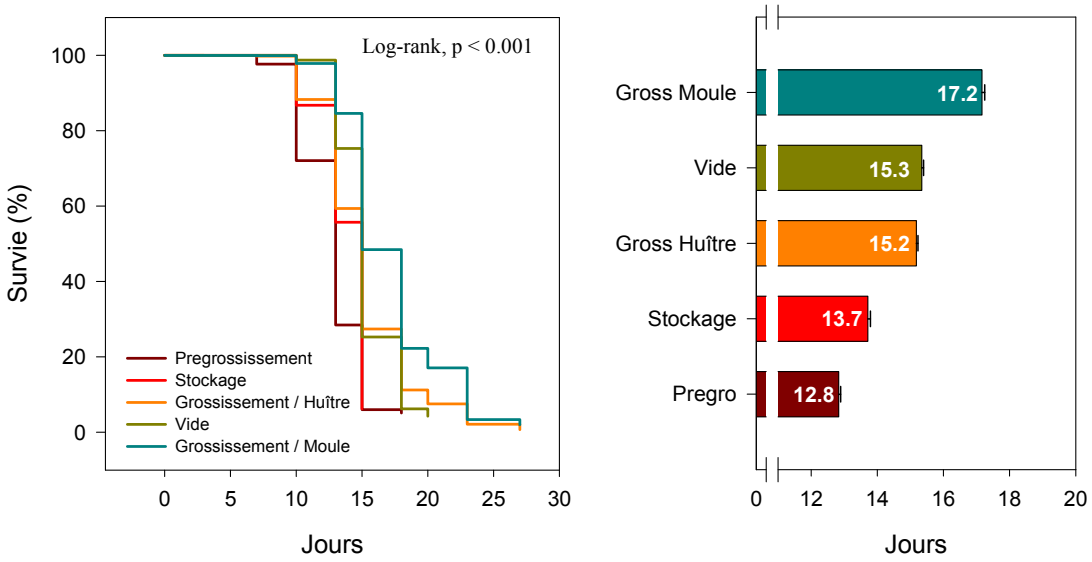
Les différents types élevage ont influencé significativement le temps moyen de survie des huîtres sentinelles (Figure 17). Les huîtres sentinelles déployées sur des concessions dédiées à l'élevage de moule présentaient un temps moyen de survie de 17.2 jours contre 15.3 jours dans les concessions vides où il n'y avait pas d'élevage. Par conséquent, la présence d'élevages de moules semble ralentir le phénomène de

mortalité. Ce résultat doit être nuancé par le fait que les concessions dédiées à l'élevage des moules suivies dans cette étude étaient situées principalement dans la zone d'élevage de Bouzigues. Le facteur « espèce en élevage » était donc partiellement confondu avec le facteur « zone d'élevage », de sorte qu'il n'est pas possible d'attribuer aux élevage de moules seuls la plus grande longévité des huîtres.

Par ailleurs, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles placées dans des concessions vides est similaire à celui des huîtres placées au voisinage d'huîtres en grossissement. Par conséquent, il semble que la présence d'huître en grossissement, n'a pas d'effet significatif sur la dynamique temporelle des mortalités.

Curieusement, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles placées dans des concessions dédiées au stockage est inférieur à celui des huîtres placées dans les concessions vides ou au voisinage d'huîtres en grossissement. Par conséquent, on pourrait conclure que la présence d'huître en stockage accélère le phénomène de mortalité. Toutefois, cette conclusion doit être tempérée par le faible effectif de cette catégorie (n=4 concessions dédiées au stockage). D'autre part, les concessions dédiées au stockage étaient situées en terre (points 23, 51 et 100, Fig. 1), où les conditions environnementales sont particulières.

Enfin, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles placées dans les concessions dédiées au prégrossissement de naissain d'huîtres étaient de seulement 12.8 jours. Ce résultat suggère que le prégrossissement accélère le phénomène de mortalité par rapport au grossissement ou à l'absence d'activité (table vide).



▲ **Figure 17.** Fonction de survie (gauche) et temps moyen de survie (droite) des huîtres « sentinelles » *C. gigas*, déployées sur 106 sites dans la lagune de Thau, en fonction des types d'élevage alentours.

3.4.1.2. Les structures d'élevage

L'effet potentiel des structures d'élevage sur la courbe de survie et le temps moyen de survie des huîtres sentinelles a été analysé séparément selon qu'il s'agit du prégrossissement de naissain ou du grossissement (demi-élevage).

Les structures d'élevage dédiées au prégrossissement sont les lanternes chinoises (5), les perlnets (4), les tubes (1) et les coquilles d'huîtres (1). Les temps moyens de survie des huîtres sentinelles placées au voisinage de ces structures étaient de 13.4 jours, 12.7 jours, 11.9 jours et 11.5 jours respectivement. Compte tenu des faibles effectifs dans les deux dernières catégories, seule la comparaison entre lanternes chinoises et perlnets peut être effectuée. Les différences observées de temps moyen de survies des huîtres sentinelles maintenues au voisinage de lanternes chinoises ou de perlnets (± 0.7 jours) n'étaient pas significatives.

Le grossissement d'huîtres dans la lagune de Thau se pratique généralement en paniers australiens ou collé sur corde. Dans le cadre de notre étude, nous avons observé dans une large majorité des huîtres collées sur cordes (41 cas / 47). Les casiers australiens ont été observés dans seulement 2 concessions. Les quatre concessions restantes étaient occupées par des huîtres en grossissement en paniers australiens et collées sur cordes, parfois en mélange avec des moules. Les effectifs obtenus dans chaque catégorie ne permettaient pas de comparer les courbes de survie et les temps moyen de survie en fonction des structures d'élevage.

3.4.1.3. Les densités d'élevage

L'effet potentiel de la densité d'élevage sur la courbe de survie et le temps moyen de survie des huîtres sentinelles a été analysé séparément selon qu'il s'agit de prégrossissement de naissain ou de grossissement (demi-élevage). Les densités d'élevage ont été évaluées en terme de % d'occupation des concessions et de nombre de cordes par concession.

Les concessions dédiées au prégrossissement (n = 11) présentaient un taux d'occupation moyen de 76% ± 31%, les taux d'occupation minimum et maximum étant de 15% et 100%. Il n'y avait pas de corrélation entre le temps moyen de survie des huîtres sentinelles et le taux d'occupation de la concession par les huîtres en prégrossissement (r^2 = 0.044, p = 0.474). Le nombre de cordes moyen par concession dédiées au prégrossissement était de 600 ± 369, avec un minimum de 60 et un maximum de 1100. Il n'y avait pas de corrélation entre le temps moyen de survie des huîtres sentinelles et le nombre de cordes par concession de grossissement (r^2 = 0.003, p = 0.843).

Les concessions dédiées au grossissement d'huîtres (n = 47) présentaient un taux d'occupation moyen de 69% ± 33%, les taux d'occupation minimum et maximum étant de 5% et 100%. Il n'y avait pas de corrélation entre le temps moyen de survie des huîtres sentinelles et le taux d'occupation de la concession par les huîtres en grossissement (r^2 = 0.004, p = 0.673). Le nombre de cordes moyen par concession dédiées au grossissement était de 716 ± 334, avec un minimum de 60 et un maximum de 1400. Il n'y avait pas de corrélation entre le temps moyen de survie des huîtres

sentinelles et le nombre de cordes par concession de grossissement (r^2 = 0.000, p = 0.963).

Par conséquent, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles ne semblait pas influencé par les densités en élevage alentours, et ce, quel que soit le stade d'élevage.

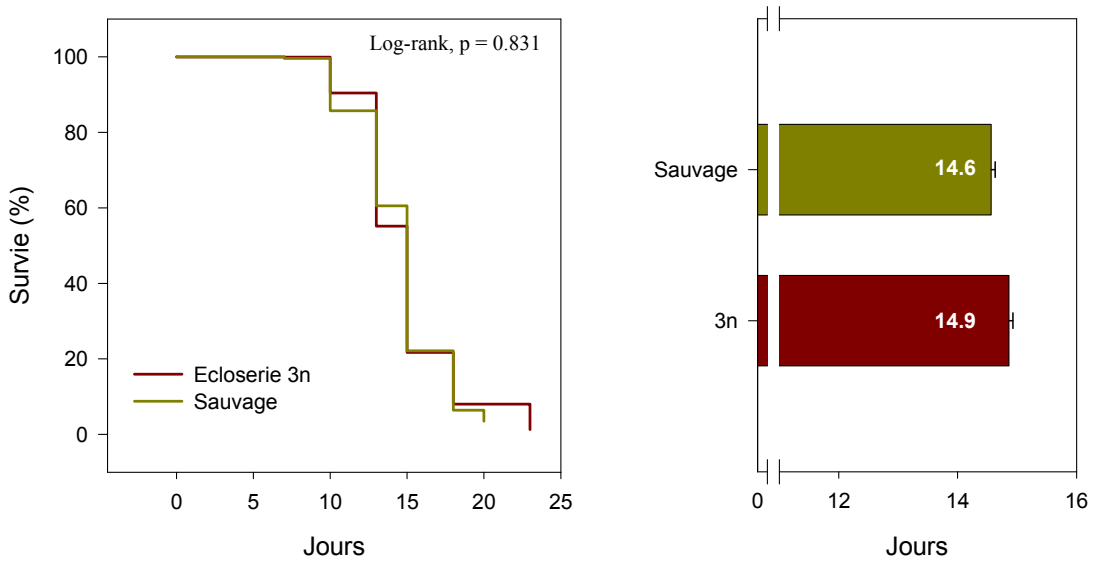
3.4.1.4. L'origine des huîtres

Les huîtres cultivées proviennent de la collecte de naissains sauvages ou de productions en écloseries. Les huîtres produites en écloserie sont diploïdes (2n) ou triploïdes (3n). Bien que plusieurs études montrent qu'il n'y a pas de différence de survie entre les huîtres 2n et 3n au printemps [15,42], nous avons cependant vérifié cette hypothèse dans le cadre de cette étude corrélative à grande échelle.

L'origine des huîtres est une information que nous avons recueillie à l'aide d'une enquête téléphonique menée auprès des conchyliculteurs chez lesquels un panier d'huîtres sentinelles a été déployé (Annexe I).

L'origine des huîtres cultivées a pu être ainsi déterminée sur 60 concessions sur un total de 98. Une concession pouvait contenir des huîtres provenant d'une seule origine (40 cas) ou de plusieurs origines (20 cas). Nous avons examiné les courbes de survie et le temps moyen de survie des huîtres sentinelles en fonction de l'origine des huîtres cultivées alentours. Les mélanges ont été éliminés de l'analyse.

Parmi les 40 concessions considérées dans l'analyse de survie, 5 d'entres elles étaient occupées par des huîtres d'écloserie 2n, 20 par des huîtres d'écloserie 3n, et 15 par des huîtres sauvages. Compte tenu du faible effectif de la catégorie « écloserie 2n », seules les huîtres sauvages et 3n ont été inclues dans l'analyse de survie (Figure 18).



▲ **Figure 18.** Fonction de survie (gauche) et temps moyen de survie (droite) des huîtres « sentinelles » *C. gigas*, déployé sur 106 sites dans la lagune de Thau, en fonction de l'origine des lots en élevage alentours. Le temps moyen de survie a été calculé en jours écoulés depuis le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C.

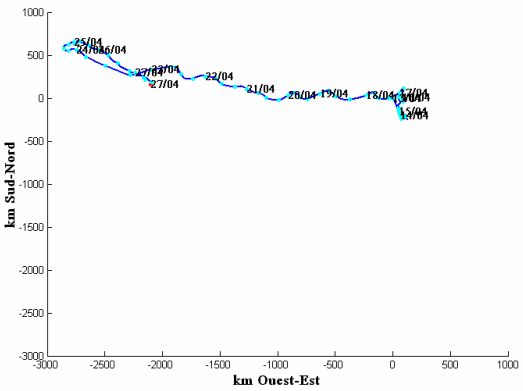
La fonction de survie et le temps moyen de survie des huîtres sentinelles déployées dans des concessions exclusivement occupées par des huîtres 3n était similaire à celui des huîtres sentinelles déployées dans des concessions exclusivement occupées par des huîtres sauvages (Fig. 18).

En conclusion :

- Le temps moyens de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées à l'élevage de moules est allongé de 1.9 jours par rapport au temps moyen de survie des huîtres sentinelles placées dans des tables vides. Bien que la présence de moules n'empêche pas les mortalités de se produire, il est possible qu'elle ralentisse légèrement le phénomène.
- A l'inverse, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au prégrossissement de naissain est raccourci de 2.4 jours par rapport au temps moyen de survie des huîtres sentinelles placées dans des tables vides. Bien que les mortalités ne démarraient pas nécessairement des concessions dédiées au prégrossissement, il semble que la présence de naissains sensibles aux agents infectieux, en quantité importante, amplifie le phénomène de mortalité.
- Le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au grossissement d'huîtres (demi-élevage) est similaire à celui des huîtres sentinelles placées dans des concessions vides. Par conséquent, la présence d'huître en grossissement ne semble pas avoir d'effet sur la dynamique des mortalités.
- Les structures d'élevage, les densités d'élevage et l'origine des huîtres (sauvage vs. 3n) n'ont pas d'effet sur les paramètres de survie des huîtres sentinelles.

3.4.2. Le régime hydrodynamique

3.4.2.1. Caractérisation du régime hydrodynamique



◄ **Figure 19.** Hodographe des vents pendant les 15 jours suivants le démarrage des mortalités le 13 avril 2011 dans la lagune de Thau.

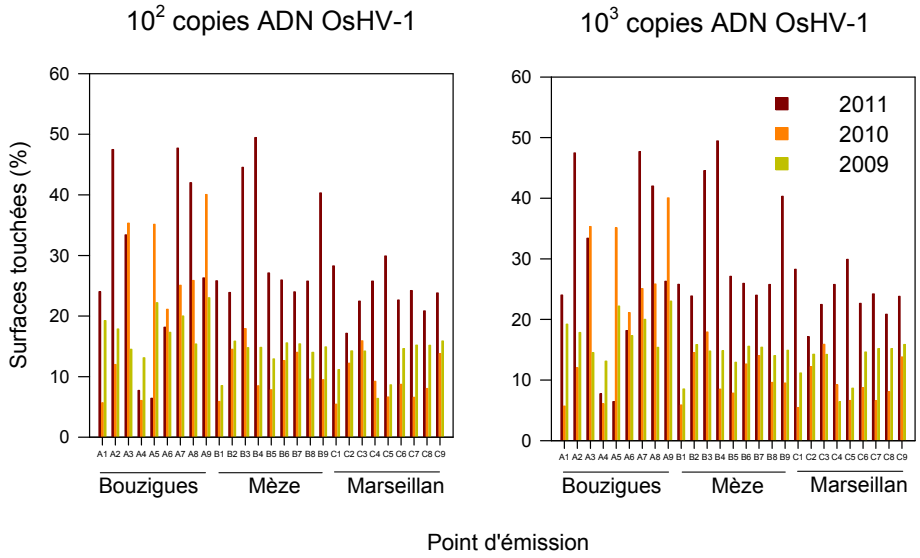
Pendant la période de démarrage des mortalités entre le 13 et le 16 avril 2011, les vents et les courants qui en résultent étaient faibles (Fig. 19). A partir du 17 avril, le vent d'Est souffle pendant plus de 10 jours,

favorisant ainsi la diffusion des agents infectieux dans la lagune.

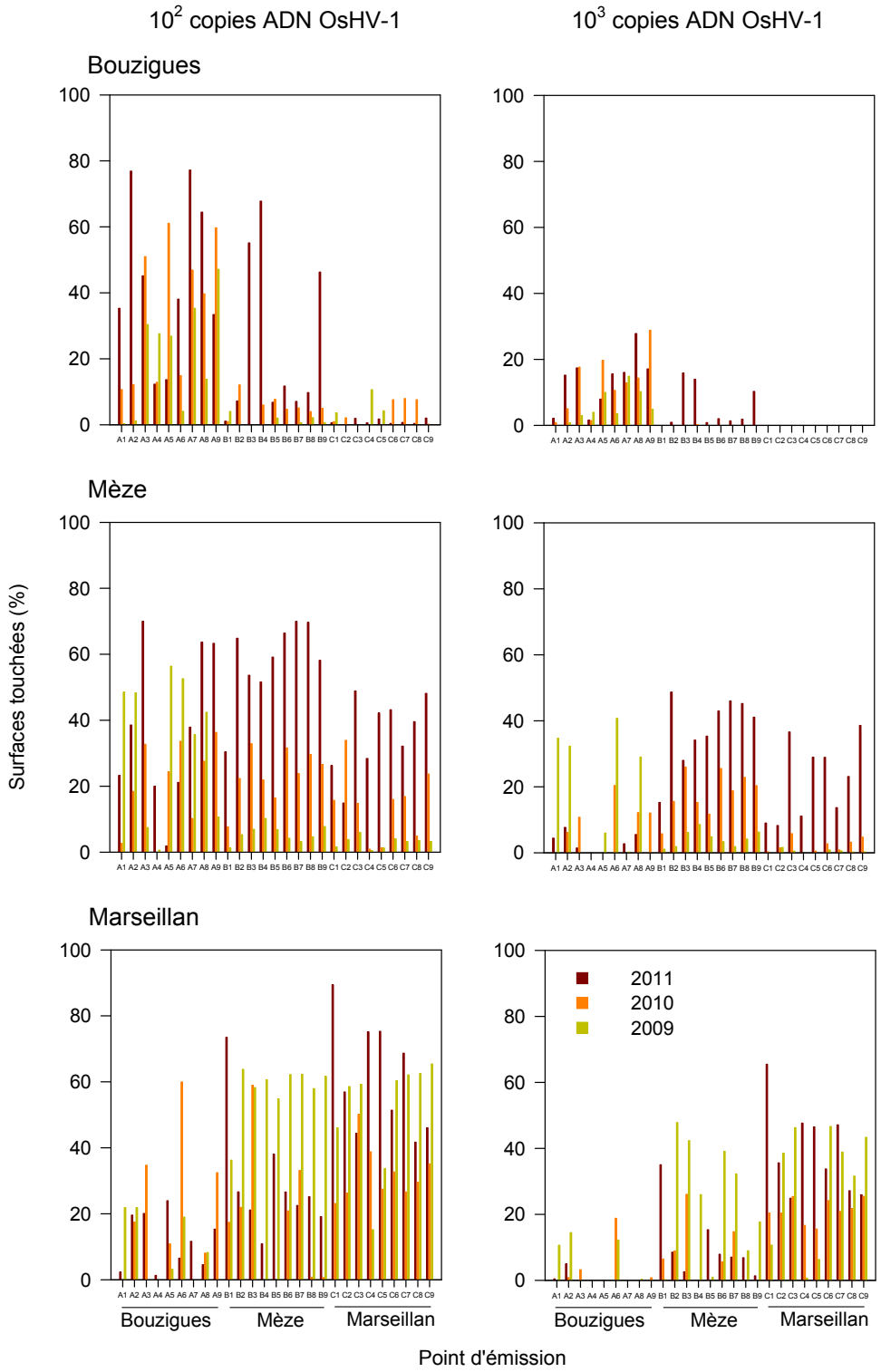
La situation en 2009 et en 2010 était assez contrastée par rapport à 2011 (données non montrées). Ces années étaient caractérisées par des épisodes de vents de NO pendant les mortalités d'huîtres creuses, favorisant l'exportation des particules (agents infectieux) hors zone d'élevage. Les sorties de modèles numériques de transport des agents infectieux devraient être impactées par l'année d'étude (voir section suivante).

3.4.2.2. Effet de la localisation des points d'émission de particules virales OsHV-1 sur la dispersion

La localisation du point d'émission de particules de OsHV-1 a un effet important sur sa dispersion, mesurée en terme de surfaces touchées par OsHV-1 aux seuils de 10^2 et 10^3 copies d'ADN mL^{-1}. En fonction du point d'émission de la maladie, les surfaces touchées par OsHV-1 variaient entre 5-50% et 0-20% de la surface d'occupation des concessions, aux seuils de 10^2 et 10^3 copies d'ADN mL^{-1} respectivement. Par exemple, en 2011, lorsque les mortalités démarraient à Bouzigues aux points 2 et 7 où à Mèze aux points 3 et 4, ~50% des surfaces occupées par les concessions étaient touchées par OsHV-1 au seuil de 10^2 cp d'ADN viral (Fig. 20). A l'inverse, lorsque les mortalités démarraient à Bouzigues aux points 4 et 5, moins de 8% des surfaces occupées par les concessions étaient touchées par OsHV-1 au seuil de 10^2 cp d'ADN mL^{-1}. Ce résultat suggère que certaines concessions sont plus connectées que d'autres du point de vue hydrodynamique, de sorte que la présence d'animaux malades sur ces sites aura un impact plus important. En revanche, l'impact des points d'émission de la maladie sur les surfaces touchées par OsHV-1 varie en fonction des années, reflétant ainsi les différences inter annuelles de régime hydrodynamique (Fig. 20). Notamment, il semble que le régime hydrodynamique en 2011 a favorisé la dispersion de particules de OsHV-1 par rapport à 2009 et 2010 où les surfaces touchées étaient généralement moindres.



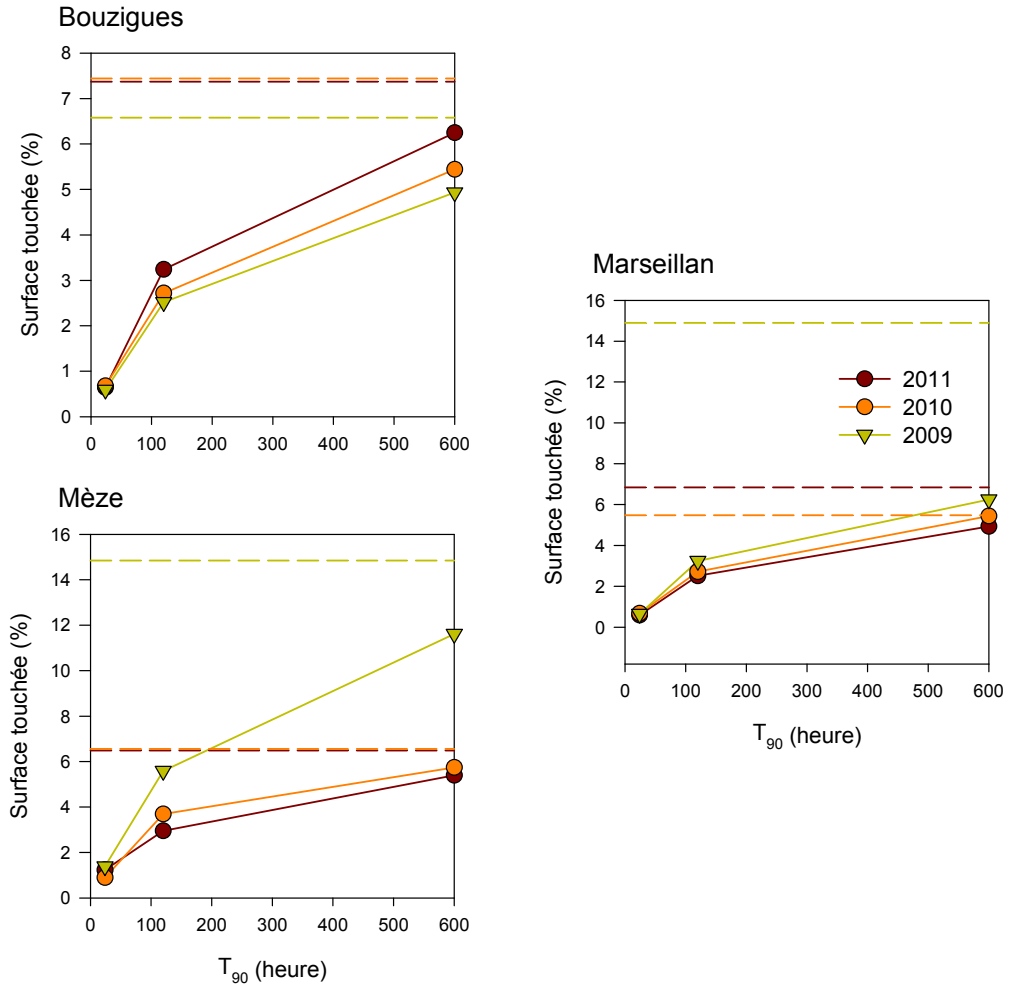
▲ **Figure 20.** Surfaces de concession touchées (% par rapport au total) par OsHV-1 aux seuils de 10^2 et 10^3 copies d'ADN mL^{-1} pendant au moins 4 jours, en fonction du point d'émission de la maladie (voir annexe II pour la localisation des points d'émission). A : Bouzigues, B : Mèze, C : Marseillan.



▲ **Figure 21.** Surfaces de concessions touchées à Bouzigues (haut), Mèze (milieu) et Marseillan (bas, % par rapport au total par zone) par OsHV-1 aux seuils de 10^2 et 10^3 copies d'ADN mL^{-1} pendant au moins 4 jours, en fonction du point d'émission de la maladie (voir annexe II pour la localisation des points d'émission). A : Bouzigues, B : Mèze, C : Marseillan.

Nous avons également mesuré l'effet de la localisation des points d'émission de OsHV-1 sur sa dispersion au sein de chaque zone conchylicole (Fig. 21). D'une manière générale, une zone conchylicole est davantage touchée par OsHV-1 lorsque le point d'émission est au sein même de la zone. Cependant, une zone conchylicole peut être touchée par OsHV-1 alors que le point d'émission est situé à l'extérieur de la zone. Par exemple, plus de 30 % de la zone conchylicole de Mèze était touchée par OsHV-1 au seuil de 10^3 copies d'ADN mL^{-1} lorsque les points d'émission du virus étaient situés dans la zone de Marseillan en 2011 (points 3, 5, 6, 8 ou 9) ou dans la zone de Bouzigues en 2009 (points 1, 2 ou 6, Fig. 21). Par ailleurs, la zone de Bouzigues était généralement moins touchée par OsHV-1 lorsque les points d'émission étaient situés dans les zones de Mèze et Marseillan, quelle que soit l'année d'étude. Au contraire, la zone de Mèze, qui est centrale, était généralement la plus touchée par OsHV-1 que les autres zones, quelle que soit la localisation des points d'émission.

3.4.2.3. Effet de la valeur de T_{90} sur la dispersion de OsHV-1



▲ **Figure 22.** Surfaces de concessions touchées (% par rapport au total) par OsHV-1 au seuil de 10^3 copies d'ADN mL^{-1} pendant au moins 4 jours, en fonction de la valeur de T_{90}, pour chaque zone d'émission de la maladie. Les lignes pointillées indiquent les surfaces touchées par OsHV-1 lorsque $T_{90} = \infty$.

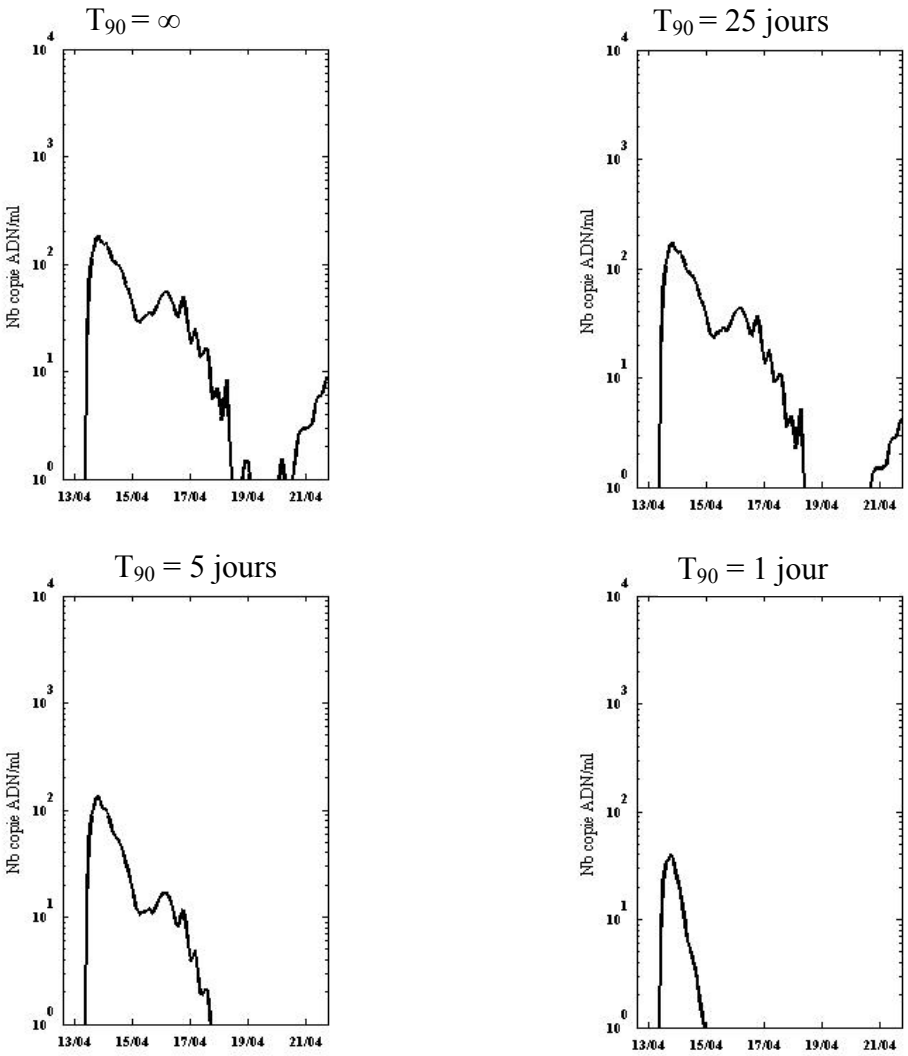
Quelles que soient l'année d'étude et la localisation du point d'émission de OsHV-1, les surfaces conchylicoles touchées par OsHV-1 au seuil de 10^3 copies d'ADN mL^{-1} augmentent avec les valeurs de T_{90} (Fig. 22). Par exemple, lorsque T_{90} = 1 jour, la surface touchée par OsHV-1 au seuil de 10^3 copies d'ADN mL^{-1} est < 2%, quelles que soient le point d'émission et l'année, contre 15% lorsque $T_{90} = \infty$ dans les zones de Mèze et Marseillan.

3.4.2.4. Estimation de la valeur de T_{90}

Nous avons examiné les quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 dans la colonne d'eau prédit par le modèle hydrodynamique au point 115, situé au large de la zone d'élevage de Marseillan (Fig. 1) pour des valeurs de T_{90} de 1, 5, 25 jours et $+\infty$. Le point 115 a été choisi car il est éloigné des zones d'élevage et les mortalités d'huîtres surviennent rapidement (le 24 avril 2011) par rapport aux autres points hors zone d'élevage. Les points d'émission de OsHV-1 testés étaient situés en bordure SO de la zone de Marseillan (C1, C2, C7 et C6, annexe II). Seul le point d'émission localisé en C2, correspondant dans notre étude de terrain aux points 98, 99 et 100, peut contaminer le point 115. Des émissions de OsHV-1 à partir des autres points situés en bordure de zone de Marseillan ne touchent pas le point 115 au seuil de 10^2 copies d'ADN mL^{-1}, présumé nécessaire au déclenchement des mortalités (Pépin comm. pers.), quelle que soit la valeur de T_{90}.

Les quantités d'ADN OsHV-1 dans la colonne d'eau au point 115, avec un point d'émission en C2 le 13 avril, en fonction des valeurs de T_{90} sont présentées figure 23. Lorsque T_{90} = 24h, les quantités d'ADN OsHV-1 au point 115 sont inférieures à 10^2 copies d'ADN mL^{-1} et l'ADN est détecté sur une période inférieure à 48h. En revanche, lorsque T_{90} = 5 jours, les quantités d'ADN OsHV-1 au point 115 le 15 avril sont supérieures à 10^2 copies d'ADN mL^{-1}. Toutefois, la durée du pic d'ADN est assez courte, la détection étant positive pendant 3 jours à un seuil compris entre 10^1 et 10^2 copies d'ADN mL^{-1}. En supposant que le seuil létal d'exposition à OsHV-1 est d'au moins 4 jours à 10^2 copies d'ADN viral mL^{-1}, ces simulations suggèrent que la valeur de T_{90} > 5 jours pour expliquer la mortalité observée au point 115.

Cet ordre de grandeur de la valeur de T_{90} est cohérent avec la littérature scientifique. La valeur de T_{90} utilisée pour modéliser la transmission de l'herpesvirus chez l'anchois est de 4 jours [31]. Salama et al. [32] montrent que des valeurs de T_{90} comprises entre 8 et 65 jours expliquent bien la dynamique de transmission de virus de poisson entre les fermes.



▲ **Figure 23.** Quantités d'ADN appartenant à OsHV-1 dans la colonne d'eau au point 115 (Fig. 1) à Marseillan prédites par le modèle hydrodynamique en considérant un point d'émission en C2 le 13 avril 2011 (coin NO de la zone de Marseillan, annexe II) en fonction des valeurs de T_{90}.

En conclusion :

- La localisation du point d'émission de la maladie influence fortement le potentiel de dispersion de l'agent infectieux dans la lagune, reflétant le niveau de connectivité hydrodynamique des concessions.
- L'effet de la localisation du point d'émission de la maladie sur la dispersion de l'agent infectieux varie en fonction des années de suivi, reflétant les différences inter annuelles de régime hydrodynamique.

  En 2011, les zones de Mèze et Marseillan étaient relativement indépendantes de la zone de Bouzigues du point de vue hydrodynamique.

  La configuration hydrodynamique en 2011, dominée par des régimes de vent de SE, aurait favorisé la dispersion de OsHV-1 dans les zones d'élevage de Mèze et Marseillan, comparativement à 2009-10 où des régimes de vents de NO auraient favorisé la dispersion hors des zones d'élevage.
- Le temps nécessaire pour observer 90% de diminution des quantités d'ADN virale (T_{90}) est le facteur le plus sensible sur les surfaces touchées et la dispersion de l'agent pathogène dans l'environnement.
- Compte tenu de la vitesse des courants simulés et de la cinétique de contamination et de mortalité des huîtres entre la zone d'élevage de Marseillan et le point n°115 situé au large, la valeur de T_{90} est vraisemblablement supérieure ou égale à 5 jours.

4. Conclusions et perspectives

4.1. Les facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités

Pour la première fois, cette étude montre qu'il existe une structure spatiale et temporelle dans la façon dont les mortalités se propagent dans la lagune de Thau. Autrement dit, les mortalités d'huîtres creuses ne sont pas un phénomène qui apparaît de façon aléatoire et inexpliquée. Toutefois, pour mettre en évidence la structure spatiale et temporelle du phénomène, il fallait pouvoir comparer la survie d'un même lot d'huître déployé sur l'ensemble de la zone d'élevage. Comparativement à une approche épidémiologique plus classique qui consisterait à examiner les déclarations de mortalité remplies par les conchyliculteurs, le suivi d'un lot d'huîtres « sentinelles » permet de s'affranchir des effets confondus associés aux caractéristiques des lots mis en élevage qui varient en fonction des concessions. Le déploiement d'animaux sentinelles pour documenter la distribution géographique des agents infectieux a été utilisé dans le cadre du

« Mussel Watch », un programme de suivi des agents infectieux dans les moules mené par la NOAA aux Etats-Unis [43]. Autrement, cette méthode d'investigation est assez peu répandue en épidémiologie marine.

Cette étude montre que le phénomène de surmortalité des huîtres touche l'ensemble de la lagune de Thau, excepté deux sites éloignés des zones d'élevage proches des entrées maritimes. Par conséquent, la mortalité cumulée finale atteint >90% des huîtres sentinelles sur la quasi-totalité des points de suivi, de sorte que ce paramètre est un descripteur peu pertinent car relativement invariable. Nous avons donc choisi d'analyser les fonctions de survie et le temps moyen de survie, deux paramètres qui tiennent compte de la cinétique de mortalité et pas seulement de la mortalité cumulée finale des huîtres sentinelles.

Le temps moyen de survie des huîtres sentinelles, qui a été calculé en jours écoulés depuis le 6 avril 2011, date à laquelle la température de l'eau a atteint 16°C, variait entre 8 et plus de 45 jours (pas de constat de mortalité) en fonction de la localisation dans la lagune : il était de seulement 15.0 jours dans les zones d'élevage contre 27.8 jours en moyenne hors des zones d'élevage. Par conséquent, cette étude montre clairement que le temps moyen de survie des huîtres était moindre lorsqu'elles étaient placées dans les zones d'élevage. Ce résultat suggère que les animaux placés dans les zones d'élevage étaient à l'origine de l'épizootie qui a sévi dans la lagune de Thau en 2011.

Tous les évènements de mortalité constatés *in situ* coïncidaient avec la détection d'ADN viral de OsHV-1 en quantité importante dans les huîtres sentinelles. Ce résultat est donc en accord avec les résultats épidémiologiques de terrain [16] et les expériences d'infection expérimentale et de cohabitation en laboratoire [17,18], de sorte qu'il est possible de dire que OsHV-1 est une cause prédominante de mortalité des huîtres.

Bien que OsHV-1 soit une cause prédominante de mortalité des huîtres, notre étude montre que la détection d'ADN appartenant au groupe bactérien *V. splendidus* modulait le temps de survie des huîtres sentinelles. En effet, la dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres creuses coïncidait avec la détection croissante d'ADN appartenant à *V. splendidus*, à la fois en fréquence (nombre de paniers touchés) et en quantité (nombre de copies d'ADN mg^{-1}). Le temps moyen de survie des huîtres était plus court lorsqu'il y avait détection précoce d'ADN de *V. splendidus*, alors qu'il était plus long lorsque l'ADN de *V. splendidus* n'était plus détecté.

Bien que les huîtres sentinelles déployées dans la lagune de Thau sur les 106 stations provenaient du même lot initial, les teneurs en triglycérides (TAG), sucres et acides gras mesurées le 06 avril, soit seulement 24 jours après le déploiement et la constitution des paniers, étaient extrêmement variables entre les sites. Les quantités de TAG dans les huîtres placées hors des zones d'élevage, où le temps moyen de survie des huîtres était de 27.8 jours, étaient en moyenne 2 fois supérieures à celles des huîtres maintenues dans les zones d'élevage, où le temps moyen de survie était de seulement 15.0 jours. Lorsque les mortalités ont démarré

entre le 06 et le 16 avril, les quantités de TAG et de sucres dans les huîtres sentinelles ont diminué d'environ 40%, témoignant de l'affaiblissement des huîtres pendant cette période.

Aussi, bien que OsHV-1 soit une cause prédominante de mortalité des huîtres, le temps moyen de survie était modulé par la quantité de TAG dans les huîtres le 06 avril et les quantités d'ADN appartenant à *V. splendidus* détectées dans les huîtres en période de mortalité. Ce résultat est en accord avec notre étude précédente dans laquelle les facteurs discriminants entre les huîtres maintenues en paniers australiens et collés sur cordes, qui présentent respectivement 80% et 10% de mortalité, sont (1) la fréquence de détection et la quantité d'ADN de *V. splendidus* qui sont plus élevées dans les huîtres maintenues en panier par rapport aux huîtres collées, et (2) les quantités de triglycérides et de sucres qui sont supérieures dans les huîtres sur corde comparativement aux animaux en paniers [15]. Dans ces deux cas, de l'ADN appartenant à OsHV-1 a été détecté en quantité importante. Par conséquent, la teneur en réserves énergétiques et la détection de *V. splendidus* dans les huîtres sont des paramètres explicatifs importants de la dynamique spatio-temporelle des mortalités.

L'analyse des acides gras comme marqueurs trophiques suggère que l'abondance relative des diatomées dans le régime alimentaire des huîtres sentinelles est corrélée avec les quantités de TAG accumulées dans les tissus et le temps moyen de survie. Pour la première fois, notre étude suggère que l'environnement trophique des huîtres jouerait un rôle indirect mais important dans la dynamique spatio-temporelle des mortalités.

Du point de vue des pratiques culturales, notre étude montre que le temps moyen de survie des huîtres sentinelles variait en fonction des types d'élevage sur les concessions. Par exemple, nous avons vu que le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées à l'élevage de moules était de 1.9 jours supérieur à celui des huîtres sentinelles placées dans des tables vides. Bien que la présence de moules n'ait pas empêché les mortalités de se produire, il est possible qu'elle ait ralentie le phénomène. A l'inverse, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au prégrossissement de naissain était de 2.4 jours inférieur à celui des huîtres sentinelles placées dans des tables vides. Bien que les mortalités ne démarraient pas nécessairement des concessions dédiées au prégrossissement, il semble que la présence de naissains sensibles aux agents infectieux en quantités importantes ait accéléré le phénomène de mortalité. Enfin, le temps moyen de survie des huîtres sentinelles maintenues dans des concessions dédiées au grossissement d'huître (demi-élevage) était similaire à celui des huîtres sentinelles placées dans des concessions vides. Par conséquent, la présence d'huître en grossissement ne semble pas avoir d'effet sur la dynamique des mortalités. Alors que le type d'élevage avait un effet clair sur la cinétique de mortalité des huîtres, les autres facteurs testés, tels que les structures d'élevage, les densités d'élevage et l'origine des huîtres (sauvage vs. 3n) n'avaient pas d'effet sur les paramètres de survie des huîtres sentinelles.

Notre approche corrélative à grande échelle a permis d'évaluer l'effet de nombreux paramètres d'élevage, en « grandeur nature », à un coût relativement faible. En revanche, cette approche ne permet pas d'extraire des relations de causes à effets, et plusieurs facteurs sont souvent confondus entre eux. Par exemple, bien que la présence d'élevages de moules semble ralentir le phénomène de mortalité, ce résultat doit être tempéré par le fait que les concessions dédiées à l'élevage des moules suivies dans cette étude étaient situées principalement dans la zone d'élevage de Bouzigues. Le facteur « espèce en élevage » était donc partiellement confondu avec le facteur « zone d'élevage », de sorte qu'il n'est pas possible d'attribuer aux élevages de moules seuls la plus grande longévité des huîtres. Finalement, cette approche, qui repose sur un tirage aléatoire des concessions, ne nous a pas permis d'observer un certain nombre de pratiques culturales en effectifs suffisants pour pouvoir tester leur effet sur la survie des huîtres sentinelles. C'est le cas par exemple des cultures d'huîtres en paniers australiens que nous n'avons observé que sur 2 concessions, et qu'il aurait été intéressant de comparer avec les cultures d'huîtres collées, largement majoritaires (41 concessions).

Enfin, les simulations de transport de OsHV-1 à l'aide du modèle hydrodynamique MARS-3D ont montré que la localisation du point d'émission de la maladie influençait fortement le potentiel de dispersion de l'agent infectieux dans la lagune, reflétant le niveau de connectivité hydrodynamique des concessions. Toutefois, l'effet de la localisation du point d'émission de la maladie sur la dispersion de l'agent infectieux variait en fonction des années de suivi, reflétant les différences inter annuelles de régime hydrodynamique. Par conséquent les caractéristiques d'une concession en terme de connectivité hydrodynamique varient entre les années, de sorte qu'il n'est pas possible de mettre en évidence des points « isolés » et des points « connectés » : ces caractéristiques changent en fonction du régime hydrodynamique. Le temps nécessaire pour observer 90% de diminution des quantités d'ADN viral (T_{90}) était le facteur le plus sensible sur le potentiel de dispersion de OsHV-1 dans l'environnement. Compte tenu de la vitesse des courants simulés et de la cinétique de contamination et de mortalité des huîtres entre la zone d'élevage de Marseillan et le point n°115 situé au large, la valeur de T_{90} était vraisemblablement supérieure ou égale à 5 jours.

4.2. Perspectives

Les changements climatiques globaux ont amplifié depuis les années 1970 les phénomènes de maladies épidémiques, de surmortalités de coquillages, d'efflorescences d'algues toxiques et d'autres types de proliférations. La conchyliculture en particulier est vulnérable à une augmentation de la fréquence des maladies causée par le réchauffement climatique. En France l'enjeu est de taille pour l'ostréiculture, qui représente la première industrie aquacole du pays. L'industrie ostréicole, qui repose sur l'exploitation de l'huître du Pacifique *C. gigas*, traverse en effet la crise la plus grave de son histoire depuis l'introduction

de cette espèce dans les années 1970. Depuis 2008, le taux de mortalité d'huîtres âgées d'un an est extrêmement élevé sur l'ensemble du littoral Français. La présence d'un génotype particulier de l'Ostreid herpesvirus et de vibrions est généralement liée aux surmortalités. Ce phénomène est une source d'inquiétude majeure pour l'avenir de l'ensemble des acteurs de la filière ostréicole : éleveurs, producteurs, associations et autorités publiques.

Bien que cette étude apporte les premiers éléments de réponse quant aux facteurs explicatifs de la dynamique spatio-temporelle des mortalités d'huîtres creuses, de nombreux facteurs environnementaux tels que la température, la quantité et la qualité de la matière organique particulaire, et la turbidité ne sont pas pris en compte. Ces facteurs jouent pourtant un rôle important dans la dynamique spatio-temporelle de plusieurs maladies en milieu aquatique [44,45].

En lien avec la présente étude, le projet GIGASSAT va mettre en place un programme de recherche intégrée et participative afin d'étudier les impacts socio-économiques et environnementaux du changement global sur l'industrie ostréicole. Le projet GIGASSAT propose, entre autres, d'observer, d'analyser et d'aider à gérer les écosystèmes ostréicoles en étudiant les effets du changement global sur la santé et la physiologie des huîtres, ainsi que sur l'état écologique et économique de leurs écosystèmes de production. L'acquisition de nouvelles connaissances et compétences se fera de manière transversale et collaborative, et permettra d'élargir l'éventail des solutions nécessaires à la viabilité et à la durabilité de l'ostréiculture.

Dans le projet GIGASSAT, nous allons entre autres analyser, par des expériences de laboratoire et de terrain, les effets des paramètres environnementaux sur la propagation des maladies et des mortalités, afin de modéliser et prédire la transmission des maladies et la propagation des mortalités, évaluer les mesures de contrôle des épidémies, et finalement proposer des solutions pour améliorer l'état économique et écologique d'une industrie ostréicole vulnérable au changement global. Ce projet financé par l'ANR Agrobiosphère durera 42 mois à partir de fin 2012, et réunira 10 partenaires et 6 collaborateurs issus d'institutions de recherche publique et d'entreprises privées.

Le projet GIGASSAT repose en partie sur les méthodologies et les acquis de la présente étude qui montre que même si les mortalités d'huîtres résultent de l'action d'agents infectieux, la dynamique spatio-temporelle s'explique par d'autres facteurs tels que l'état énergétique des huîtres et la qualité trophique du milieu. A défaut de soigner les huîtres, la connaissance de ces facteurs, limitants ou aggravants, pourrait permettre d'établir des mesures de gestion en vue de limiter les pertes.

5. Bibliographie

[1] Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., & Vasta, G.R., Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. Science 285 (5433), 1505-1510 (1999).

[2] Hayes, M.L., Bonaventura, J., Mitchell, T.P., Prospero, J.M., Shinn, E.A., Van Dolah, F., & Barber, R.T., How are climate and marine biological outbreaks functionally linked? Hydrobiologia 460 (1), 213-220 (2001).

[3] Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., & Samuel, M.D., Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science 296 (5576), 2158-2162 (2002).

[4] Lafferty, K.D., Porter, J.W., & Ford, S.E., Are diseases increasing in the ocean? Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 35, 31-54 (2004).

[5] Mydlarz, L.D., Jones, L.E., & Harvell, C.D., Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 37, 251-288 (2006).

[6] Samain, J.-F. & McCombie, H., Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the Morest project (2008).

[7] Mori, K., Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 53 (4), 361-369 (1979).

[8] Perdue, J.A., Beattie, J.H., & Chew, K.K., Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostre gigas*) in Washington state. J. Shellfish Res. 1 (1), 9-16 (1981).

[9] Cheney, D.P., MacDonald, B.F., & Elston, R.A., Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J. Shellfish Res. 19, 353-359 (2000).

[10] Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M., & Reece, K.S., Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Dis. Aquat. Org. 63 (1), 33-41 (2005).

[11] Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., & Kolodzey, H., Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. J. Fish Dis. 31 (8), 621-630 (2008).

[12] Malham, S.K., Cotter, E., O'Keeffe, S., Lynch, S., Culloty, S.C., King, J.W., Latchford, J.W., & Beaumont, A.R., Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. Aquaculture 287 (1-2), 128-138 (2009).

[13] Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurie, J., Fleury, P.G., & Le Coz, F., Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. Aquaculture 271 (1-4), 384-400 (2007).

[14] Bedier, E., Observatoire national Conchylicole. Rapport 2009, (2010).

[15] Pernet, F., Barret, J., Gall, P.L., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.-F., & Keck, N., Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon (feature article). Aquaculture Env. Interact. 2 (3) (2012).

[16] Segarra, A., Pepin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., & Renault, T., Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. Virus Res. 153 (1), 92-99 (2010).

[17] Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J.F., Saulnier, D., Tourbiez, D., & Renault, T., Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. Virus Res. 155 (1), 28-34 (2011).

[18] Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., & Pepin, J.F., Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Vet. Res. 42 (2011).

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

[20] De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S., & Boudry, P., Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to Vibrio infection in relation to their reproductive status. J. Invertebr. Pathol. 106 (2), 179-191 (2011).

[21] De Decker, S. & Saulnier, D., Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. Fish Shellfish Immunol. 30 (2), 691-699 (2011).

[22] Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Lagarde, F., Fiandrino, A., Huvet, A., Corporeau, C., Boudry, P., Quere, C., Degremont, L., Pepin, J.-F., Saulnier, D., Boulet, H., & Keck, N., Mortalités massives de l'Huître creuse: causes et perspectives, (2011).

[23] Soletchnik, P., Mazurie, J., Allain, G., Bedier, E., Benabdelmouna, A., Blin, J.-L., Bouquet, A.-L., Cochet, H.l.n., Degremont, L., Gaussem, F., Gervasoni, E., Glize, P., Petton, B., Roussel, P.-Y., & Pernet, F., Les pratiques culturales peuvent-elles permettre de réuire la surmortalité du naissain d'huîtres creuses? Récapitulatif des essais d'élevage et expérimentations zootechniques menés sur le territoire français entre 2008 et 2010, (2011).

[24] Baud, J.-P., Bedier, E., Beliaeff, B., Boudry, P., Pernet, F., & Renault, T. Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses Crassostrea gigas - journée d'information et d'échanges du 18 janvier 2012 in *Journée d'information et d'échanges*, edited by Ifremer (Paris, 2012), pp. 58.

[25] Gangnery, A., Etude et modélisation de la dynamique des populations de bivalves en élevage (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*) dans le bassin de Thau (Méditerranée, France) et des ascidies solitaires associées Université Montpellier II, (2003).

[26] Lazure, P., Etude de la dynamique de l'étang de Thau par modèle numérique tridimensionnel. Vie et Milieu (42), 137-145 (1992).

[27] Lazure, P. & Dumas, F., An external-internal mode coupling for a 3D hydrodynamical model for applications at regional scale (MARS). Adv Water Resour 31 (2), 233-250 (2008).

[28] OMEGA_THAU, Phase 1 - Etape 3. Calibration et validation du modèle hydrodynamique MARS-3D couple au module d'entérobactéries sur la lagune de Thau. Partie 2 : épisodes pluvieux de novembre 2008 et de février 2009, (2010).

[29] Fiandrino, A., Cesmat, L., Dumas, F., Jouan, M., & Laanaia, N., presented at the European Conference on Coastal Lagoon Research, Montpellier, France, 2009 (unpublished).

[30] Murray, A.G., O'Callaghan, M., & Jones, B., Simple models of massive epidemics of herpesvirus in Australian (and New Zealand) pilchards. Environment International 27 (2-3), 243-248 (2001).

[31] Murray, A.G., O'Callaghan, M., & Jones, B., A model of transmission of a viral epidemic among schools within a shoal of pilchards. Ecological Modelling 144 (2-3), 245-259 (2001).

[32] Salama, N.K.G. & Murray, A.G., Farm size as a factor in hydrodynamic transmission of pathogens in aquaculture fish production. Aquaculture Env. Interact. 2, 61-74 (2011).

[33] Dalsgaard, J., St. John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., & Hagen, W., Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Adv. Mar. Biol. 46, 225-340 (2003).

[34] Pernet, F., Malet, N., Pastoureaud, A., Vaquer, A., Quéré, C., & Dubroca, L., Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. J. Sea Res. 68 (0), 20-32 (2012).

[35] Metcalfe, L.D. & Schmitz, A.A., The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 33 (3), 363-364 (1961).

[36] Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., & Samain, J.-F., Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163, 221-234 (1992).

[37] Géovariances, ISATIS Technical References, 9th Edition, Geovariances. (Fontainebleau, 2008).

[38] Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M., Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 125 (3), 359-369 (2000).

[39] Soletchnik, P., Faury, N., & Goulletquer, P., Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). Aquaculture 252 (2-4), 328-338 (2006).

[40] Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., & Samain, J.F., Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. Aquaculture 254 (1-4), 571-582 (2006).

[41] Legendre, P., Troussellier, M., Jarry, V., & Fortin, M.J., Design for simultaneous sampling of ecological variables - from concepts to numerical solutions. Oikos 55 (1), 30-42 (1989).

[42] Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., & Boudry, P., Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. Mar. Ecol. Prog. Ser. 401, 129-146 (2010).

[43] Kim, Y. & Powell, E.N., Distribution of parasites and pathologies in sentinel bivalves: NOAA status and Trends "Mussel Watch" Program. J. Shellfish Res. 26 (4), 1115-1151 (2007).

[44] Ford, T.E., Colwell, R.R., Rose, J.B., Morse, S.S., Rogers, D.J., & Yates, T.L., Using Satellite Images of Environmental Changes to Predict Infectious Disease Outbreaks. Emerg. Infect. Dis. 15 (9) (2009).

[45] Hoegh-Guldberg, O. & Bruno, J.F., The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. Science 328 (5985), 1523-1528 (2010).

Annexe I. Questionnaire adressé aux conchyliculteurs participant au projet en vue de connaître l'origine des animaux cultivés sur chaque concession. Chaque concessionnaire a été contacté au téléphone afin de remplir ensemble le questionnaire.

Question 1
La concession sur laquelle était déployé un lot d'huître « sentinelle » était occupée par:
un lot unique ❑ un mélange de lots ❑

Question 2
Connaissez vous l'origine du lot ou des lots de la concession étudiée ?
Oui ❑ non ❑

Si oui, pouvez vous caractériser la nature des lots:
Lot 1 :
- ❑ Captage naturel bassin, année : ……...
- ❑ Ecloserie 2n, nom :……..... , âge/taille, date de mise à l'eau
- ❑ Ecloserie 3n, nom :…… ,âge/taille, date de mise à l'eau

Lot 2 :
- ❑ Captage naturel bassin : ……..
- ❑ Ecloserie 2n, nom :……...
- ❑ Ecloserie 3n, nom :……

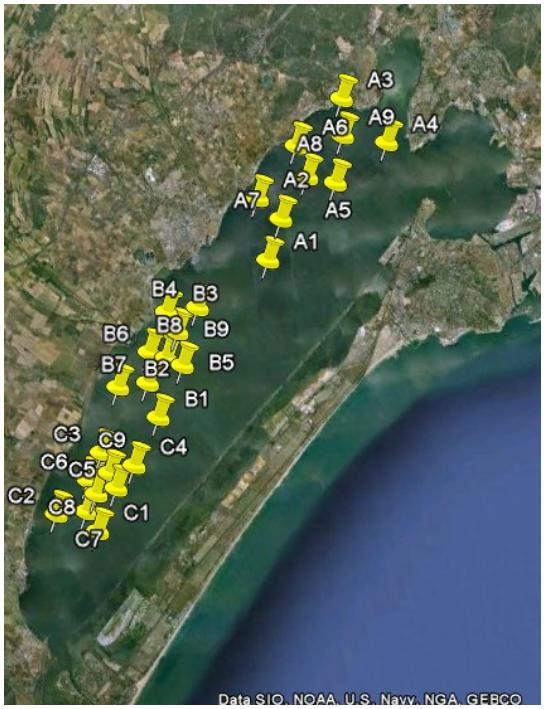
Lot 3 :
- ❑ Captage naturel bassin : ……..
- ❑ Ecloserie 2n, nom :……...
- ❑ Ecloserie 3n, nom :……

Lot 4 :
- ❑ Captage naturel bassin : ……..
- ❑ Ecloserie 2n, nom :……...
- ❑ Ecloserie 3n, nom :……

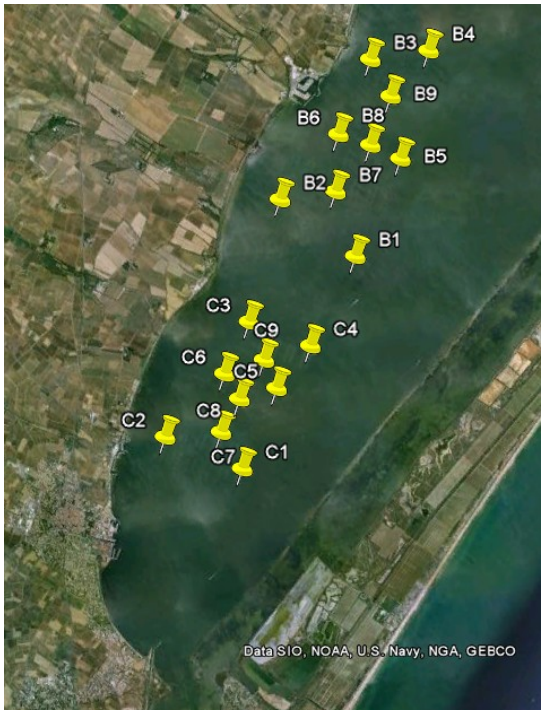
Lot 5 :
- ❑ Captage naturel bassin : ……..
- ❑ Ecloserie 2n, nom :……...
- ❑ Ecloserie 3n, nom :……

Annexe II. Cartographie des 27 points à partir desquels les mortalités et les émissions de OsHV-1 ont été initiées dans les simulations numériques de transport d'agents infectieux dans la lagune de Thau (a, d). Les figures b et c indiquent les positions des points dans les zones de Marseillan et Mèze (b) et Bouzigues (c) plus précisément.

(a)

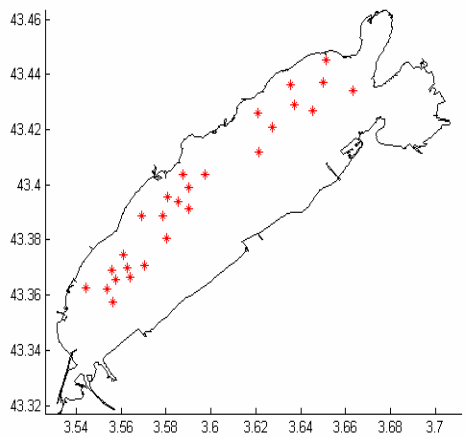
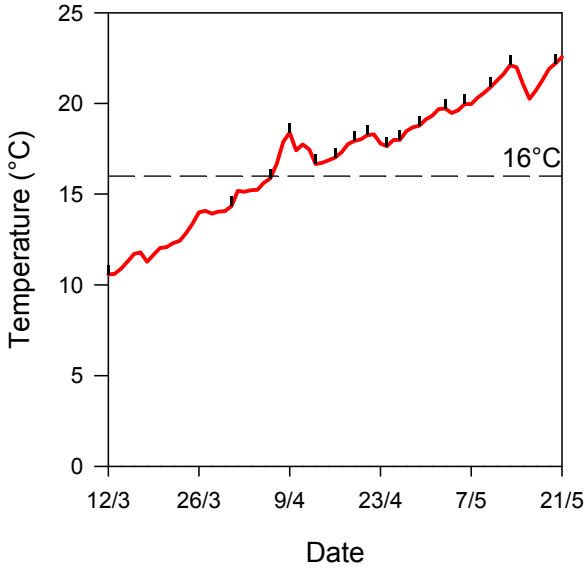


(b)



(c)

(d)



Annexe III. Température de l'eau enregistrée sur la concession Ifremer localisée dans la zone d'élevage de Marseillan (point 119, Fig. 1) pendant toute la durée de l'étude en 2011. Les marques noires indiquent les campagnes de comptage et de prélèvements d'huîtres creuses sur le terrain.