



*Liberté • Égalité • Fraternité*

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE



Ministère  
de l'Écologie,  
du Développement  
durable,  
des Transports  
et du Logement

# Effet de traitements thermiques sur la résistance du naissain d'huître creuse au phénomène de mortalité massive - THERMARES

Convention DPMA 2013 - IFREMER 2012/1/1210320/NYF

# **Effet de traitements thermiques sur la résistance du naissain d'huître creuse au phénomène de mortalité massive - THERMARES**

**Rapport scientifique final de l'étude THERMARES,  
Convention DPMA 2013 - IFREMER**

## sommaire

### Fiche documentaire

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> <b>Diffusion :</b> libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b> Adresse électronique :	<b>date de publication :</b> 30/03/2014 <b>nombre de pages :</b> 25 <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration(s) :</b> 10 figures et 2 tableaux <b>langue du rapport :</b> Français
<b>Titre de l'article</b> Effet de traitements thermiques sur la résistance du naissain d'huître creuse au phénomène de mortalité massive – THERMARES	
Contrat n°                      Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Fabrice PERNET Bruno PETTON David TAMAYO	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> Département Ressources Biologiques et Environnement Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins Laboratoire de Physiologie des Mollusques
<b>Encadrement(s) :</b>	
Cadre de la recherche : Action THERMARES - Convention DPMA-Ifremer 2013	
<b>Destinataire :</b> DPMA, Ifremer	

## Résumé

L'objectif de cette étude vise à déterminer l'effet de basses températures (10°C et 13°C) pendant des durées variables (0 et 80 jours) sur la survie du naissain d'huîtres creuses préalablement infecté suite à une exposition en rade de Brest pendant 5 ou 8 jours.

Le naissain d'huître creuse préalablement infecté par OsHV-1  $\mu$ var par exposition en milieu naturel pendant 5 d ou 8 d, puis transféré à basse température (10°C ou 13°C) pendant 5 à 80 d, présente des mortalités plus faibles et plus tardives que les animaux témoins en laboratoire. La réduction des mortalités observée dans le naissain exposé à basse température coïncide avec une diminution progressive des concentrations d'ADN appartenant à OsHV-1 dans les tissus, au point de devenir non-détecté ou non quantifiable après 6 à 41 d.

En revanche, lorsque ces animaux sont exposés à une augmentation de température à 21°C en laboratoire, le virus est réactivé et d'importantes mortalités sont constatées. Bien que ces mortalités soient souvent inférieures à celles des animaux témoins, le gain de survie est généralement faible et semble indépendant de la température (10°C ou 13°C) et de la durée d'exposition à basse température (5 à 80 d).

Enfin, lorsque les naissains sont réexposés en milieu naturel où la maladie sévit, des mortalités similaires à celles des groupes témoins sont constatées. Par conséquent, les huîtres naturellement exposées à OsHV-1, chez lesquelles le développement de la maladie est limité par une exposition plus ou moins longue à basses températures, demeurent sensibles à cet agent infectieux.

## Mots-clés

Huître creuse, Naissain, Mortalité massive, OsHV-1  $\mu$ var, Température

## Words keys

Pacific oyster, Mass mortality, OsHV-1  $\mu$ var, Spat, Temperature

## Table des matières

<b>Fiche documentaire .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>8</b>
2.1. Production de « naissains standardisés Ifremer » (NSI) .....	8
2.2. Protocole d'infection des huîtres <i>in natura</i> .....	9
2.3. Epreuve thermique en laboratoire.....	9
2.4. Plan expérimental .....	10
2.4.1. Infection en milieu naturel.....	10
2.4.2. Application des traitements « basses températures ».....	11
2.4.3. Transfert des huîtres à 21°C ou sur le terrain après traitements thermique .....	11
2.5. Paramètres suivis.....	12
2.5.1. Mortalité .....	12
2.5.2. Détection d'ADN d'OsHV-1.....	13
2.5.3. Croissance .....	13
2.5.4. Ingestion .....	13
2.5.5. Analyses biochimiques .....	14
2.5.6. Traitement des données .....	14
<b>3. Résultats principaux et discussion .....</b>	<b>14</b>
3.1. Evolution temporelle de la survie des huîtres exposées au milieu naturel .....	14
3.2. Effet de la durée d'exposition en milieu naturel sur la transmission de la maladie et les mortalités.....	15
3.3. Effet des traitements « basses températures » .....	17
3.3.1. Mortalité .....	17
3.3.2. OsHV-1 .....	19
3.4. Effet du transfert des huîtres à 21°C ou sur le terrain après traitement basse température .....	19
3.4.1. Mortalité .....	19
3.4.2. OsHV-1 .....	21
<b>4. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>22</b>
<b>5. Références.....</b>	<b>22</b>



# 1. Introduction

Avec plus de 22 000 emplois, et environ 80 000 tonnes de production annuelle, l'ostréiculture est l'activité aquacole majeure en France. Mais, cette activité est frappée, depuis 2008, par des crises de mortalités qui affectent particulièrement le naissain. Si la sélection d'huîtres génétiquement plus résistantes est une voie possible en cours d'exploration (projet SCORE), l'interprofession conchylicole souhaite explorer d'autres voies de sortie de crise.

Une étude récente montre que les huîtres préalablement infectées par le virus herpes OsHV-1  $\mu$ var, maintenues à 13°C pendant 40 jours, ont éliminé l'ADN viral de leurs tissus, ne présentaient aucune mortalité, et ne transmettaient pas la maladie aux huîtres saines placées en cohabitation (Petton et al. 2013). De plus, lorsque ces animaux acclimatés à 13°C ont été soumis à une augmentation brutale de la température à 20.6°C, en laboratoire, l'ADN d'OsHV-1 est demeuré non détecté, les huîtres n'ont pas présenté de mortalité, et la maladie n'a pas été transmise aux huîtres saines placées en cohabitation (Petton et al. 2013). Par conséquent, une exposition à 13°C pourrait offrir une voie de limitation des mortalités d'huîtres causées par le virus herpes OsHV-1  $\mu$ var.

Cependant, la survie de ces huîtres « rescapées » doit être évaluée sur le terrain en situation épizootique. L'hypothèse testée est que les huîtres préalablement exposées à la maladie puis à un choc froid seraient toujours sensibles à la maladie. Au contraire, l'hypothèse alternative est que le système immunitaire a été « amorcé », permettant ainsi à ces animaux de résister à la maladie. Bien que les invertébrés aient une réponse immunitaire qui diffère considérablement de l'immunité acquise des vertébrés, des études récentes indiquent que l'exposition passée à une infection mineure (non létale) peut procurer à un individu ou à ces descendants une immunité accrue (Little & Kraaijeveld 2004, Pope et al. 2011). Cet effet prophylactique appelé « immune priming » (amorce immunitaire) est proche de l'immunité acquise des vertébrés.

D'autre part, bien que l'expérience réalisée soit valide sur le plan statistique (réplication des traitements) et biologique (lots d'huîtres représentatifs), la reproductibilité des résultats doit être examinée. Une expérience menée en 2011 suggère que la mortalité des huîtres exposées à OsHV-1 sur le terrain est limitée à 13.4°C, mais non nulle (50% à 13.4°C vs. 90% à 21.9°C) (Petton et al. 2013).

Enfin, le protocole de passage au froid pour limiter les pertes doit être précisé (détermination du temps minimum nécessaire d'exposition à basse température et de la température seuil en deçà de laquelle OsHV-1 n'est plus détecté, en fonction de la sévérité de l'infection).

Dans le cadre de l'action THERMARES, nous proposons de (1) confirmer que le passage à basse température permet de limiter la mortalité des huîtres et la détection d'agents infectieux, (2) déterminer si les animaux qui ont résisté à la maladie suite au traitement thermique sont toujours sensibles au phénomène de mortalité massive sur le terrain, et (3) d'évaluer l'effet de la température et de la durée du traitement sur la survie et la détection d'agents infectieux.

Du point de vue pratique, nous avons réalisé en 2013 une expérience visant à examiner l'effet de l'application de basses températures (10°C et 13°C) pendant des durées variables (0 et 80 jours) sur la survie du naissain d'huîtres creuses préalablement infecté suite à une exposition en rade de Brest pendant 5 ou 8 jours afin d'obtenir différents

niveaux d'infection. Les naissains témoins appropriés ont été également étudiés (naissain non infectés initialement, naissain maintenu à 21°C [pas de choc froid], et naissain non transféré sur le terrain après le traitement thermique [pas d'infection secondaire]).

Du point de vue appliqué, l'action THERMARES est une première tentative de limitation des mortalités d'huîtres creuses par voie zootechnique. Du point de vue scientifique, les prélèvements réalisés au cours de l'expérience en vue d'analyses en pathologies, biochimie et immunité permettront d'examiner les fondements de la résistance des huîtres aux agents infectieux en fonction de la température.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Production de « naissains standardisés Ifremer » (NSI)

Afin d'appréhender correctement l'étude des mortalités d'huîtres creuses en milieu contrôlé, il est essentiel de disposer de matériel biologique sain, c'est à dire dont on peut certifier qu'il n'a jamais subi de mortalité anormale pouvant conduire à sélectionner des phénotypes ou des génotypes particuliers. Les huîtres survivantes à un épisode de mortalité sont en effet plus résistantes à une seconde infection (Dégremont 2011, Pernet et al. 2012, Dégremont et al. 2013). L'histoire de vie joue donc un rôle important sur la survie et il est important de fixer ce paramètre.

D'autre part, afin de comparer les résultats d'expériences menées à différents moments ou la performance d'animaux d'âges différents à un moment donné, il faut pouvoir disposer de lots d'huîtres « standardisés », c'est à dire avec une variance inter lot (effets génétiques) minimisée grâce à l'utilisation d'un nombre important de géniteurs d'origine sauvage et la standardisation des conditions d'élevage en milieu contrôlé.

Les géniteurs utilisés pour la production de NSI étaient issus de la collecte naturelle du bassin d'Arcachon de l'année 2008. En 2009, ces géniteurs avaient subi au stade naissain une mortalité estimée à 70 % de la population initialement collectée. Cette mortalité de masse était associée à la présence de OsHV-1  $\mu$ Var. En février 2010, un lot de 2000 individus survivants était transféré dans une zone d'élevage de l'Aber Benoît (Finistère, France). Ce stock d'animaux servait de source unique pour assurer la production de NSI nécessaires aux expérimentations menées à Argenton depuis mars 2010. En janvier 2013, 60 individus prélevés aléatoirement dans ce stock ont été utilisés comme reproducteur. En vue de leur conditionnement en conditions contrôlées, les huîtres étaient nettoyées individuellement puis placées dans un bac de 500 L. La température de l'eau était maintenue à 17°C jusqu'à la ponte. Après 5 semaines d'alimentation, les gamètes de 40 individus étaient obtenus par lacération des gonades. Un nombre relativement élevé de géniteurs a été utilisé ( $n=40$ ) afin de minimiser la variance inter-lots (P. Boudry com. pers.). Les produits génitaux des 40 huîtres étaient mélangés dans un volume de 5 L à raison de 50 spermatozoïdes ovule<sup>-1</sup>.

L'embryogenèse se déroulait en bassin cylindro-conique de 150 L à une température de 21°C pendant 48h sans renouvellement d'eau. La densité initiale était de 200 oeufs mL<sup>-1</sup>. Un apport d'air continu (20 ml mn<sup>-1</sup>) maintenait l'homogénéité du milieu d'élevage. Les larves véligères étaient collectées sur une toile à plancton de 40 $\mu$ m, avant d'être transférées dans des tubes en méthacrylate translucide de 5 L. Chaque tube était

alimenté en eau de mer enrichie en phytoplancton par le fond, générant ainsi un courant ascendant. L'homogénéité du milieu était assurée par un bullage d'air continu. L'évacuation de l'eau s'effectuait par un trop-plein positionnée à proximité de la surface et après passage dans un filtre biseauté d'une longueur correspondant au 2/3 de la hauteur du tube. Les tubes étaient renouvelés en eau de mer de manière continue (100% h<sup>-1</sup>). La température de l'eau était maintenue à 25°C. La densité larvaire en début d'élevage était de 50 larves mL<sup>-1</sup>. La fin du cycle pélagique correspondait à la présence minimale de 50% de larves compétentes au sein de la population larvaire (stade ocellé) ou dès l'observation des premières pédivéligères. L'intégralité des larves survivantes étaient récoltées sur un tamis de 100 µm pour la phase de la métamorphose.

Les larves pédivéligères ont été placées en contact de la micro brisure dans des paniers avec un fond constitué d'une toile à plancton d'un maillage de 125 µm. Les paniers étaient placés dans des auges alimentées en continu avec de l'eau de mer enrichie en phytoplancton. Le taux horaire de renouvellement du milieu d'élevage était de 100%. Après 30 jours, le bilan de la fixation était effectué après un tri mécanique (sur tamis de 300 µm) qui permettait de regrouper les larves métamorphosées et d'enlever la micro brisure non utilisée. L'intégralité de la population de juvéniles était conservée en élevage. La durée de la phase post-larvaire était d'environ 75 jours à 25°C. Au total, 132500 naissains ont été utilisés pour cette expérience.

## 2.2. Protocole d'infection des huîtres *in natura*

Contrairement à la plupart des études précédentes où la maladie est induite par injection directe d'un ou plusieurs agents infectieux spécifiquement identifiés, nous avons utilisé une méthode plus intégrative d'infection d'huîtres NSI *via* une exposition en milieu naturel où les mortalités sont observées (Petton et al. 2013). Après quelques jours d'exposition aux conditions naturelles, ces huîtres NSI ont été ramenées sur le site expérimental d'Argenton pour une phase de « révélation ». A leur retour en laboratoire, les NSI *a priori* infectés étaient exempts de mortalité. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les huîtres sont naturellement infectées et la maladie contractée est bien celle qui génère les mortalités dans les zones d'élevage. Bien que OsHV-1 soit un facteur déclenchant majeur des mortalités d'huîtres creuses (Segarra et al. 2010, Jenkins et al. 2013, Petton et al. 2013), il demeure possible que d'autres agents infectieux interagissent. Notre méthode permet d'intégrer ces éventuelles interactions. En revanche, la réponse des huîtres infectées sur le terrain n'étant pas spécifique d'un agent infectieux, l'interprétation des résultats peut être limitée dans certains cas.

## 2.3. Epreuve thermique en laboratoire

Depuis l'émergence du phénomène de mortalités massives d'huîtres creuses, des méthodes officielles pour la détection d'OsHV-1 et de bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été transférées par l'Ifremer (LGP à La Tremblade, dans le cadre de ses missions de Laboratoire National de Référence) à un réseau de 9 laboratoires agréés et 13 laboratoires reconnus par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire. Ces méthodes officielles reposent sur la détection d'ADN appartenant à OsHV-1 (Pepin et al. 2008). 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  $\text{mg}^{-1}$  de tissu frais sont le signe d'une répllication active du virus dans l'hôte et témoignent de son action dans le processus morbide. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode située à environ  $10^2$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissu frais. Elle ne permet pas encore de détecter des individus porteurs « asymptotique » de la maladie.

Dans ce projet, nous utilisons une méthode simple de révélation de l'état pathologique du naissain d'huître creuse vis-à-vis de OsHV-1  $\mu\text{var}$  basée sur l'application d'un choc thermique (Petton et al. en préparation). Cette méthode repose sur les observations de terrain qui suggèrent qu'OsHV-1 est détecté dans les huîtres suite à une augmentation brutale de la température de l'eau au-dessus de  $16^\circ\text{C}$ .

## 2.4. Plan expérimental

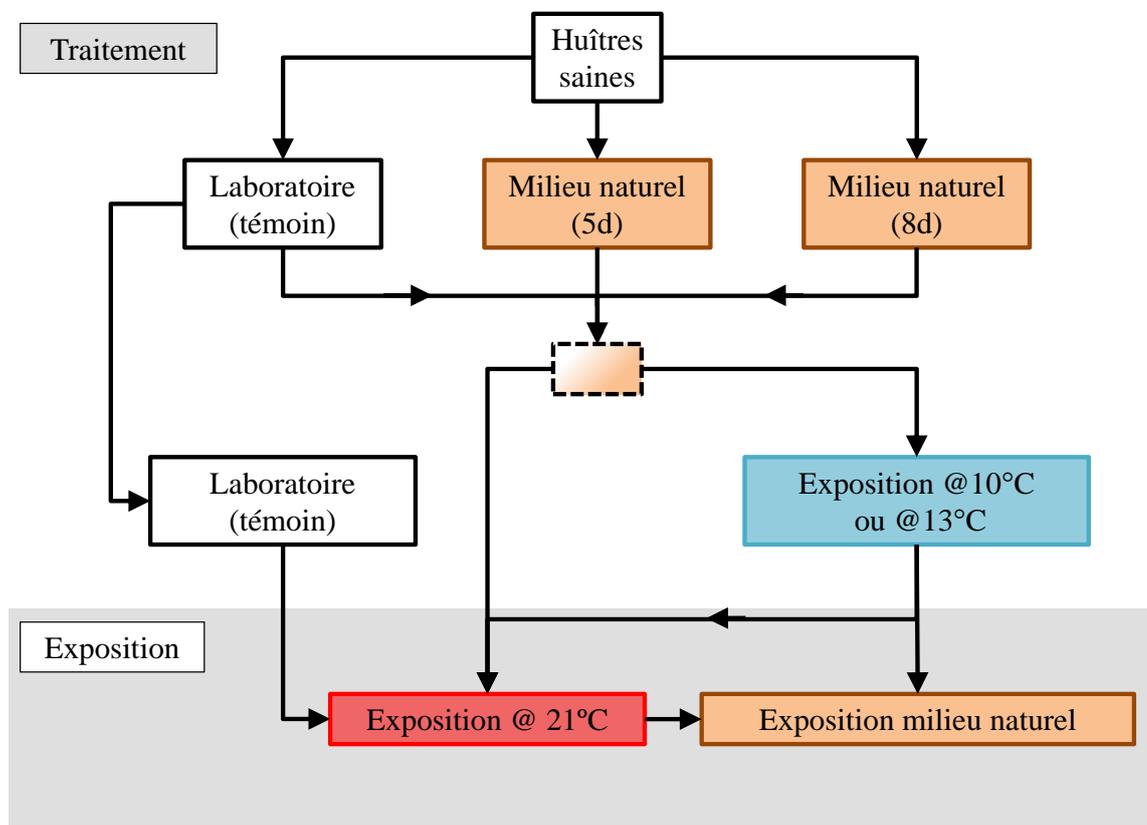


Figure 1. Description du plan expérimental du projet Thermares. d : *dia* jours.

### 2.4.1. Infection en milieu naturel

Approximativement 53000 individus provenant de la population d'huîtres standardisées Ifremer (NSI) ont été transférés le 4 juillet 2013 sur un site d'élevage situé dans la Rade de Brest à la Pointe du Château ( $48^\circ20'06.190''$  N,  $4^\circ19'06.370''$  W), où le phénomène de surmortalité du naissain était en cours (Observatoire Conchylicole 2013).

L'exposition en milieu naturel a duré 5 ou 8 jours (Figure 1). En parallèle, les animaux restants (79500 lots témoins) ont été maintenus en laboratoire à Argenton. A ce stade, la masse moyenne des huîtres était de 0.94 g pour un âge de 5 ½ mois.

Les animaux exposés au milieu naturel 5 d et 8 d ont été ramenés en milieu contrôlé à Argenton le 9 et le 12 juillet respectivement. A ce moment, aucune mortalité n'avait été constatée.

### 2.4.2. Application des traitements « basses températures »

Les huîtres NSI exposées au milieu naturel pendant 5 d ou 8 d de retour à Argenton, ainsi que les huîtres non exposées maintenues en laboratoire, ont été transférées dans des bassins de 500 L à basses températures (10°C ou 13°C) pendant 6, 21, 41, 61 ou 80 jours (Figure 2). Chaque combinaison de traitement (exposition [5 ou 8 jours] × température [10 ou 13°C]) correspondait à un bassin sans réplication. Un bac témoin de NSI non exposés était associé à chaque combinaison exposition × température (soit 8 bassins au total: 5 d vs 0 d à 10°C, 5 d vs 0 d à 13°C, 8 d vs 0 d à 10°C et 8 d vs 0 d à 13°C). Deux bassins supplémentaires ont servi au suivi des huîtres témoins à 21°C (NSI non exposées au milieu naturel). La mortalité des huîtres a été estimée dans chaque bassin lors des transferts à 21°C.



Figure 2. Bassin de 500 L utilisé pour l'exposition des naissains de *C. gigas* à basse température en conditions contrôlées de laboratoire.

### 2.4.3. Transfert des huîtres à 21°C ou sur le terrain après traitements thermique

Deux sous-échantillons des lots d'huîtres (150 animaux) (1) provenant directement du milieu naturel ou (2) après maintien pendant 6, 21, 41, 61 ou 80 jours à 10°C ou 13°C ont été transférées à 21°C en bassin rectangulaire de 23 L et suivies pendant 14-20 jours (Figure 3) ou directement sur le site d'élevage situé dans la rade de Brest à la pointe du Château (Figure 1).



Figure 3. Bassin de transfert des huîtres à 21°C

## 2.5. Paramètres suivis

### 2.5.1. Mortalité

La mortalité dans chaque combinaison de traitements a été évaluée en comptant les huîtres mortes dans les bassins de 500 L à 10°C et à 13°C, mais également dans les bassins de 23 L à 21°C ou dans les poches restées sur le terrain. Les individus morts ont été retirés. La mortalité cumulée est calculée de la façon suivante :

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

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

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

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

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

Cette formule permet de s'affranchir des individus prélevés.

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

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

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

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

La mortalité cumulée finale des huîtres après transfert à 21°C (ou sur le terrain) suite au traitement à basse température (10°C ou 13°C) a été calculé de la manière suivante :

$$m_{froid+21^\circ C} = m_{froid} + [m_{21^\circ C} - (m_{froid} \times m_{21^\circ C})]$$

Où  $m_{froid+21^\circ C}$  est la mortalité globale après transfert à 21°C et exposition au froid, et  $m_{froid}$  et  $m_{21^\circ C}$  correspondent aux mortalités observées pendant le traitement à basse température puis après transfert à 21°C (ou sur le terrain) respectivement.

## 2.5.2. Détection d'ADN d'OsHV-1

Les analyses de détection d'ADN viral appartenant à OsHV-1 ont été réalisées sur des échantillons d'huîtres entières (groupe de 5 individus par bassin). Les prélèvements ont été effectués

- 1) à l'arrivée des animaux à Argenton après exposition dans le milieu naturel pendant 5 ou 8 jours,
- 2) pendant l'exposition à basses températures après 6, 21, 41, 61 jours, après le transfert des huîtres à 21°C (après 3-4 jours d'exposition à 21°C et à la fin),
- 3) sur les NSI témoins maintenus à 21°C en laboratoire pendant toute la durée de l'expérience aux jours 6, 21, 41, 61.

Les animaux entiers ont été conservés à -20°C puis envoyés au laboratoire IDHESA Bretagne Océane pour analyses.

La méthode analytique utilisée est basée sur une technique publiée (Pepin et al. 2008). Elle consiste en une amplification en temps réel basée sur la chimie SYBR green et l'utilisation du couple d'amorces DP-F/DP-R ciblant le gène de l'ADN polymérase d'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 d'OsHV-1, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être mesurée et associée. Elle renseigne sur l'implication ou non de l'agent infectieux en cas de mortalité. Les charges virales supérieures à  $10^4$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissu frais (ou  $10^7$  copies  $\text{g}^{-1}$ ) sont le signe d'une répllication active du virus dans l'hôte ce qui témoigne de son action dans le processus morbide.

## 2.5.3. Croissance

Pendant le traitement à basse température, la masse totale de 30 individus prélevés dans chaque bassin a été mesurée après 6, 21, 41, 61 et 80 jours d'exposition à basses températures. Le taux de croissance est la pente de la régression qui lie la masse moyenne et le temps (en jours).

La croissance des animaux maintenus à 21°C en laboratoire pendant toute la durée de l'expérience (témoin) est la différence entre la masse moyenne totale de 30 individus prélevés à la fin et au début de l'expérience, pondérée par le temps (en jours).

Finalement, le % de chair a été calculé à partir des 30 individus prélevés pour les analyses biochimiques (voir section 2.5.5). La masse totale humide et la masse de coquille ont été mesurées et la masse de tissus a été estimée par différence.

## 2.5.4. Ingestion

La concentration de phytoplancton a été maintenue à  $1500\mu\text{m}^3$  en sortie de chaque bassin pendant toute la durée de l'expérience. La concentration de phytoplancton a été mesurée à l'aide d'un compteur de particules électronique (Beckman, Multisizer Z3) à l'entrée et à la sortie de chaque bassin. La consommation de phytoplancton par les huîtres a été calculée de la manière suivante :

Ingestion ( $\mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$ ) = ([entrée]-[sortie])  $\times$  débit

Où [entrée] et [sortie] sont les concentrations de phytoplancton à l'entrée et à la sortie du bassin exprimé en  $\mu\text{m}^3 \text{L}^{-1}$ , le débit est exprimée en  $\text{L d}^{-1}$ .

### 2.5.5. Analyses biochimiques

Les huîtres NSI exposées au milieu naturel pendant 5 et 8 jours ainsi que les témoins NSI non-exposés ont été prélevés pendant l'application des traitements basses températures ( $10^\circ\text{C}$  et  $13^\circ\text{C}$ ) après 6, 21, 41, 61 et 80 jours. Ces animaux ont été disséqués et conservés individuellement à  $-80^\circ\text{C}$  avant d'être réduit en poudre à l'aide du vibro-broyeur à bille MM200 (Retsch, Eragny sur Oise, France) sous azote liquide à  $-196^\circ\text{C}$ . Les analyses biochimiques sont en cours au laboratoire et ne seront pas présentées dans ce rapport. Nous analysons les réserves énergétiques des huîtres (sucres totaux et triglycérides), l'activité de certaines enzymes clés du métabolisme énergétique (citrate synthase, hexokinase, pyruvate-kinase...) et les profils d'expression protéiques. Ces analyses nous permettront de mettre en évidence les processus physiologiques de l'acclimatation à basses température en lien avec l'expression ou l'inhibition de la maladie (Tamayo et al. soumis).

### 2.5.6. Traitement des données

Dans le présent rapport, les différences entre les moyennes observées sur les différents paramètres entre les traitements ont été comparées par analyse de variance (ANOVA) à un ou deux facteurs selon les cas après avoir vérifié la normalité des résidus (Kolmogorov-Smirnov) et l'homogénéité des variances (test de Bartlett). Lorsque nécessaire, les données exprimées en % ont subi une transformation arc sinus. Des analyses statistiques complémentaires (analyse de risque, modèle de Cox) sont en cours avec un consultant externe (G. Daigle, Université Laval, Québec, Canada).

## 3. Résultats principaux<sup>1</sup> et discussion

### 3.1. Evolution temporelle de la survie des huîtres exposées au milieu naturel

Les naissains d'huîtres standardisés (NSI) ont été exposés au milieu naturel pendant 5 jours, dans une zone d'élevage de la rade de Brest, à plusieurs moments au cours de l'été 2013, puis ramené au laboratoire Ifremer à Argenton en milieu contrôlé à  $21^\circ\text{C}$  pour suivre la survie (Figure 4).

La survie cumulée finale des huîtres exposées au milieu naturel pendant 5 jours et ramenées à  $21^\circ\text{C}$  en laboratoire suit une fonction polynomiale de rang 3 (cubique), indiquant qu'il y avait 3 phases dans le développement de la maladie en milieu naturel:

1. une période caractérisée par des survies très faibles (10% entre le 5 et le 9 juillet),

<sup>1</sup> Seuls les résultats de mortalité et d'OsHV-1 sont présentés de manière non-exhaustive dans ce rapport. Les résultats secondaires de croissance, ingestion et biochimie (analyses en cours) ne sont pas fournies.

2. un plateau pendant lequel les survies demeurent faibles (15-20%, 9 juillet - 28 août),
3. une période où la survie des huîtres augmente de façon marquée (>90%).

Ces résultats suggèrent que le pouvoir pathogène ou invasif de l'agent infectieux varie en fonction du temps : il est le plus fort en début d'été et diminue à partir de la fin du mois d'août. Bien que l'effet du pouvoir pathogène ou invasif soit confondu avec l'âge des huîtres qui augmente à chaque déploiement sur le terrain, l'effet de l'âge sur la survie est probablement négligeable dans notre étude. Le gain de survie en fonction de l'âge étant de seulement 3-4% par mois (Petton et al. en preparation) et l'expérience durant moins de 3 mois, les différences d'âge entre les déploiements n'expliqueraient que 9 à 12% de gain de survie. Par conséquent, l'âge seul n'explique pas les différences de survie de 10 à 90%.

La survie des NSI après seulement 5 jours d'exposition en milieu naturel est particulièrement faible comparé aux années précédentes. En effet, les lots de NSI déployés à la pointe du Château en rade de Brest fin mai et début juillet 2011 pendant 5 ou 6 jours présentent 60 à 100% de survie de retour en laboratoire à 21°C. Plus généralement, les lots de NSI exposés en milieu naturel entre 2010 et 2012 présentent au moins 25 à 30% de survie (Petton communication personnel), et les premières mortalités sont rapportées après 9 à 30 jours d'exposition sur le terrain (contre 5 jours d'exposition seulement dans le cas de notre étude). Il semble donc que la survie du naissain en Rade de Brest aient été particulièrement faible pendant l'été 2013.

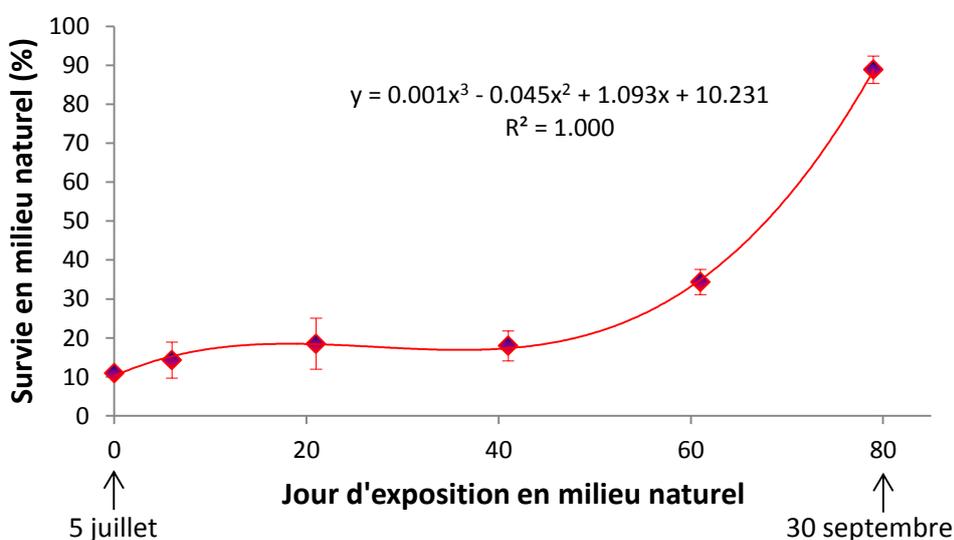


Figure 4. Survie cumulée finale des huîtres exposées au milieu naturel pendant 5 jours et ramenées en milieu contrôlé à 21°C, en fonction de la date d'exposition.

### 3.2. Effet de la durée d'exposition en milieu naturel sur la transmission de la maladie et les mortalités

Les NSI exposés en milieu naturel pendant 5 ou 8 jours début juillet (cf. section 2.4.1.) ont été ramenés au laboratoire Ifremer d'Argenton et placés en cohabitation avec des NSI témoins restés à Argenton. Les huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 et 8 jours ont transmis la maladie aux huîtres saines placées en cohabitation qui ont révélé d'importantes mortalités associées à la détection d'OsHV-1  $\mu$ var. Toutefois, les

mortalités induites étaient moins variables dans le cas de cohabitation avec les animaux exposés 8 jours en milieu naturel comparativement à 5 jours (Figure 5).

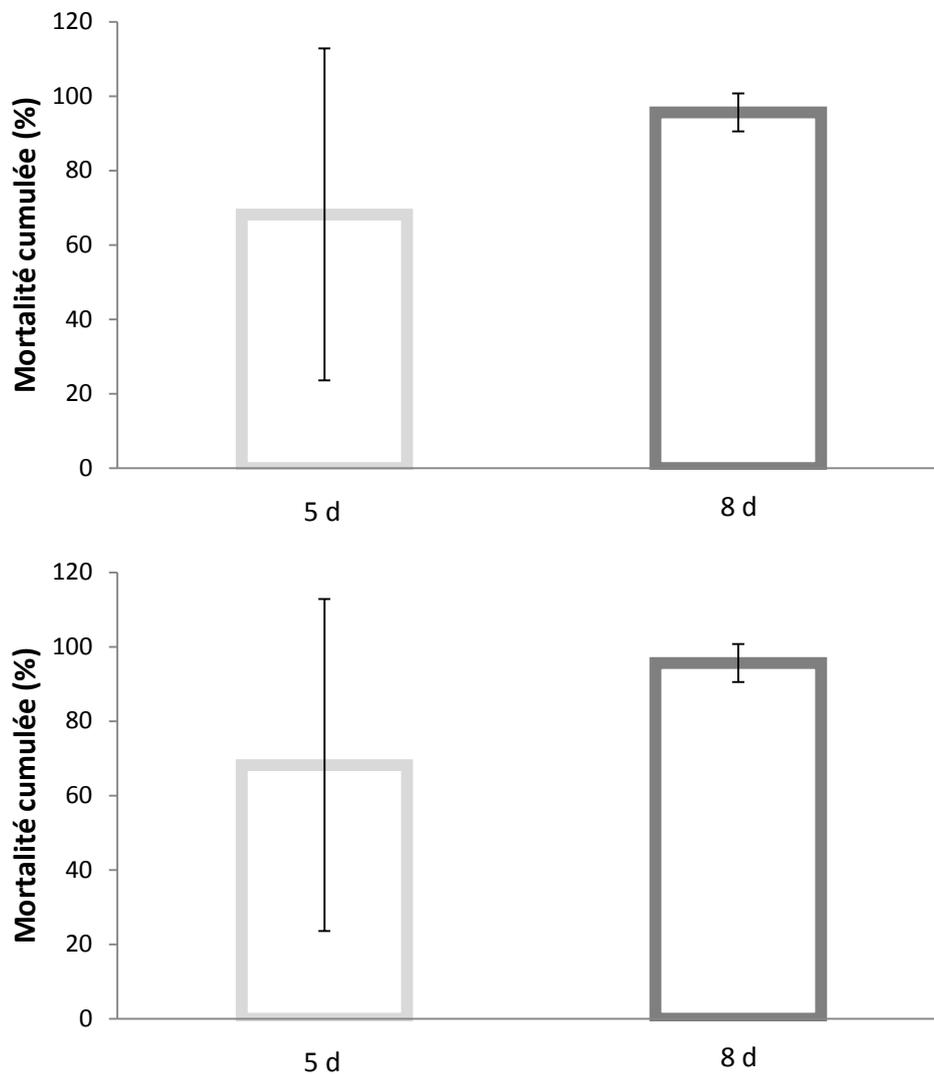


Figure 5. Mortalité cumulée finale des huîtres saines placées en cohabitation en milieu contrôlé à 21°C avec les animaux exposés au milieu naturel pendant 5 d ou 8 d.

### 3.3. Effet des traitements « basses températures »

#### 3.3.1. Mortalité

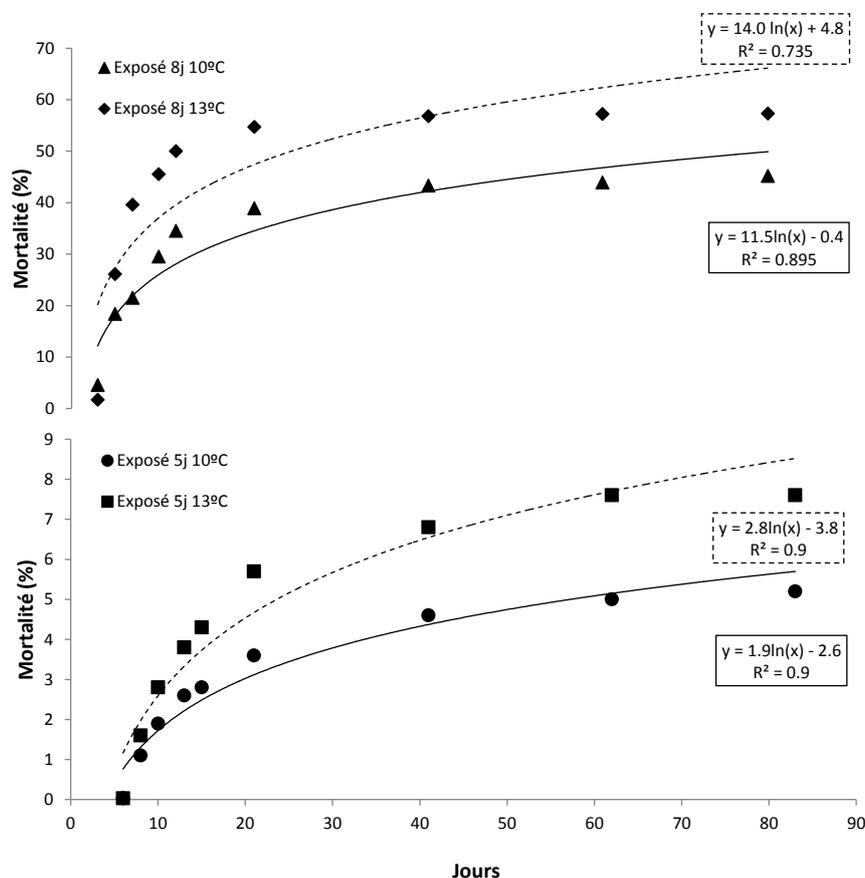


Figure 6. Evolution de la mortalité des huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 d (bas) ou 8 d (haut), puis transférées à basse température (10°C et 13°C) en laboratoire.

La mortalité cumulée finale des huîtres exposées 5 d en milieu naturel (6.4%) est nettement inférieure à celle des huîtres exposées pendant 8 d (51.2%), aussi bien à 10°C qu'à 13°C (Figure 6 et 7).



Figure 7. Bassins contenant les huîtres exposées au milieu naturel pendant 5 d (gauche) ou 8 d (droite) après 50 jours à 10°C.

L'effet de la température est également marqué : la mortalité cumulée finale des huîtres à 10°C est inférieure à celle des huîtres maintenues à 13°C, quel que soit la durée d'exposition en milieu naturel (Figure 6).

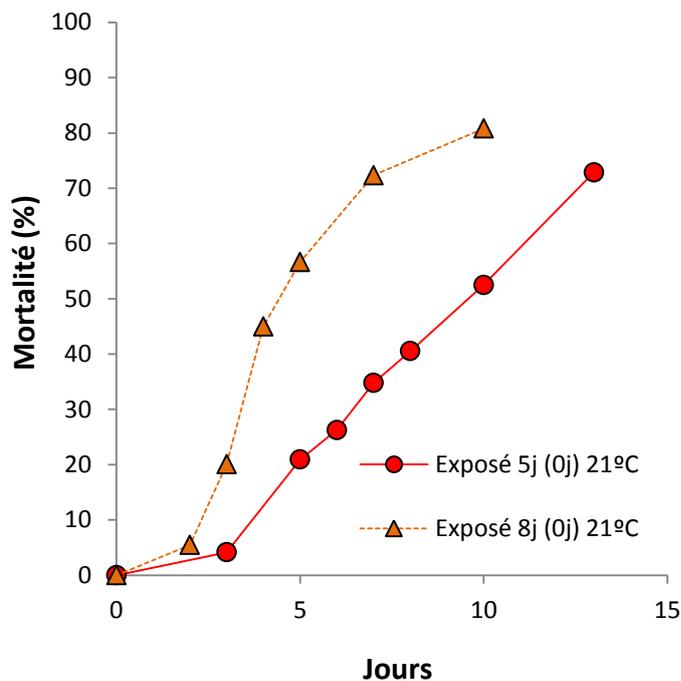


Figure 8. Evolution de la mortalité des huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 d (bas) ou 8 d (haut), puis transférées à 21°C en laboratoire.

Les huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 ou 8 d puis transférées à 21°C en laboratoire présentent plus de 70% de mortalité en 13 jours (Figure 8).

En résumé, le passage des huîtres à basses températures permet de retarder et de réduire les mortalités. Par exemple, les animaux exposés au milieu naturel pendant 8 jours présentent 81% de mortalité à 21°C contre 45% à 13°C et seulement 29.5% à 10°C, après 10 jours en laboratoire.

### 3.3.2. OsHV-1

Tableau 1. Détection d'ADN appartenant à OsHV-1  $\mu$ var dans les huîtres exposées au milieu naturel pendant 5 d ou 8 d, puis transférées à basse température (10°C ou 13°C) en milieu contrôlé. Les quantités d'ADN viral sont exprimées en nombre de copies  $\text{mg}^{-1}$  tissu frais.

Durée d'exposition à basse température	Durée d'exposition en milieu naturel			
	5 d		8 d	
	10°C	13°C	10°C	13°C
0	$2.0 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$
6	d	$1.0 \cdot 10^8$	$2.0 \cdot 10^8$	$1.5 \cdot 10^7$
21	nd	$2.8 \cdot 10^4$	$2.9 \cdot 10^4$	d
41	nd	nd	d	nd
61	nd	d	d	d

*d : faible détection, pas de quantification possible*  
*nd : non détecté*

L'ADN de OsHV-1  $\mu$ var a été détecté en quantité importante ( $>10^7$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissus frais) dans les huîtres après 5 ou 8 d d'exposition en milieu naturel. En revanche, la quantité d'ADN viral détectée dans les animaux exposés 5 d en milieu naturel puis à 10°C en milieu contrôlé diminue graduellement jusqu'à devenir faiblement positif après 6 jours puis non détecté après 21 d (Tableau 1). A 13°C, la dynamique est relativement similaire, à part qu'il faut attendre 41 d pour ne plus détecter d'ADN appartenant à OsHV-1. Enfin, les animaux exposés pendant 8 d au milieu naturel sont restés au moins faiblement positifs jusqu'à la fin de l'expérience, à 10°C et à 13°C.

Par conséquent, le retard et la réduction des mortalités observés lors d'un passage à basse température coïncident avec une baisse progressive de la quantité d'ADN d'OsHV-1 dans les huîtres. Ce résultat confirme les conclusions de l'expérience menée en 2010 (Petton et al. 2013).

## 3.4. Effet du transfert des huîtres à 21°C ou sur le terrain après traitement basse température

### 3.4.1. Mortalité

Bien que le passage des huîtres préalablement infectées en milieu naturel à basse température permette de retarder et réduire les mortalités (voir section précédente) de façon marquée par rapport aux témoins, le passage de ces animaux à 21°C en laboratoire conduit à des mortalités importantes, suggérant qu'OsHV-1 est réactivé.

Toutefois, certaines combinaisons de température et durée d'application semblent limiter la mortalité par rapport aux différents groupes témoins (Figure 9). Par exemple, la mortalité cumulée finale des huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 d, puis à 10°C pendant 61 d présentent 53% de mortalité contre 73% pour le groupe témoin correspondant. Par conséquent, bien que parfois significatifs, les gains de survie suite à un passage à basse température des huîtres sont limités. D'autre part, l'absence de lien

entre (1) la durée d'exposition à basse température et la mortalité ou (2) la température (10°C vs 13°C) et la mortalité, est surprenante.

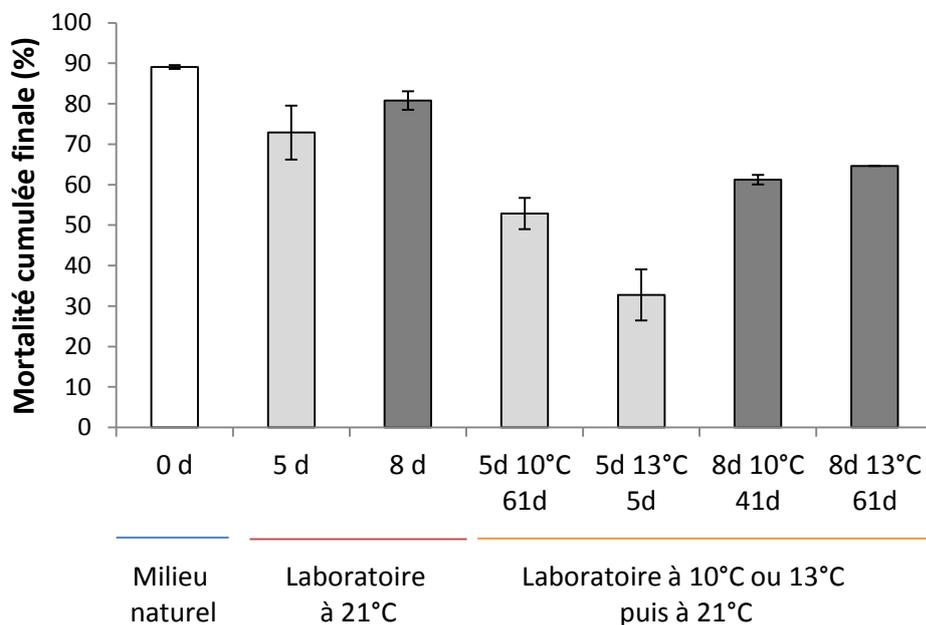


Figure 9. Mortalité cumulée finale des huîtres témoins (0 d) transférées le 4 juillet en milieu naturel, des huîtres exposées 5 ou 8 d en milieu naturel puis transférées directement à 21°C (5 d et 8 d) ou transférées à basse température (10°C ou 13°C) pour une durée comprise entre 5 et 61 d avant d'être exposées à 21°C en laboratoire. Les durées d'exposition à basses températures présentées dans cette figure sont celles pour lesquelles la mortalité est la plus faible.

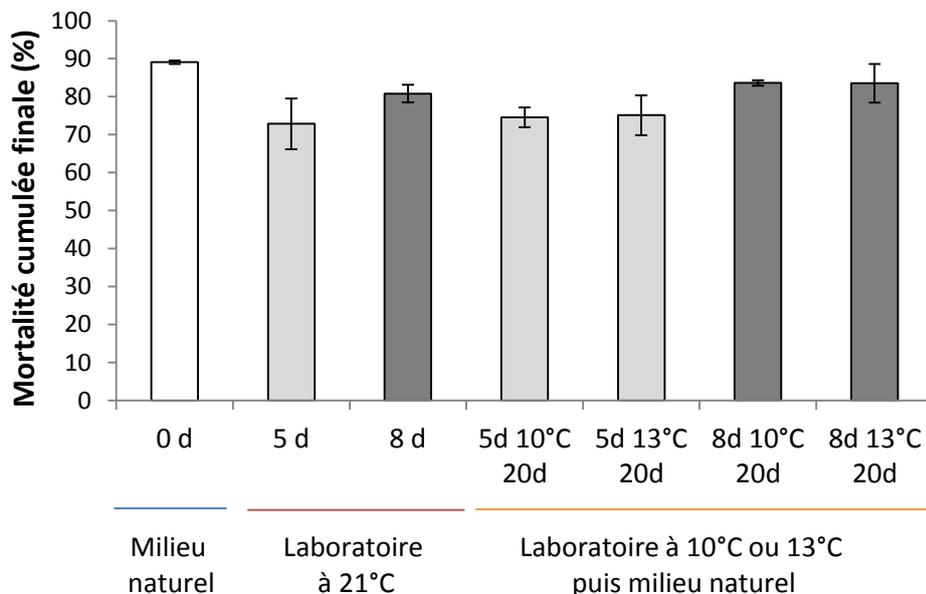


Figure 10. Mortalité cumulée finale des huîtres témoins (0 d) transférées le 4 juillet en milieu naturel, des huîtres exposées 5 ou 8 d en milieu naturel puis transférées directement à 21°C (5 d et 8 d) ou transférées à basse température (10°C ou 13°C) pour une durée comprise entre 5 et 61 d avant d'être exposées en milieu naturel. Les durées d'exposition

à basses températures présentées dans cette figure sont celles pour lesquelles la mortalité est la plus faible.

De même, bien que le passage des huîtres préalablement infectées en milieu naturel à basse température permette de retarder et réduire les mortalités de façon marquée par rapport aux témoins (voir section précédente), le transfert de ces animaux en milieu naturel conduit à des mortalités importantes, similaires aux groupes témoins correspondant (Figure 10). Par exemple, la mortalité cumulée finale des huîtres exposées en milieu naturel pendant 5 d, puis à 10°C pendant 20 d est de 74% contre 73% pour le groupe témoin correspondant.

Par conséquent, le gain de survie globale relevé à 21°C en laboratoire n'a pas été observé en milieu naturel où OsHV-1 est présent. Notre étude suggère que les huîtres préalablement infectées par OsHV-1, puis maintenues à basse température survivent mieux que les témoins maintenus en milieu naturel ou en laboratoire à 21°C. Toutefois, ce gain de survie est nettement réduit après un transfert des animaux à 21°C en laboratoire, et nul après un retour en milieu naturel où la maladie sévit.

### 3.4.2. OsHV-1

Tableau 2. Détection d'ADN appartenant à OsHV-1  $\mu$ var dans les huîtres exposées au milieu naturel pendant 5 d ou 8 d, puis transférées à basse température (10°C ou 13°C) en milieu contrôlé. Les quantités d'ADN viral sont exprimées en nombre de copies  $\text{mg}^{-1}$  tissu frais.

Durée à basse T°C (d)	Durée à 21°C	Durée en milieu naturel (d)		Durée à 21°C (d)	Durée en milieu naturel (d)	
		5 d			8 d	
		10°C	13°C		10°C	13°C
6	4	$2.0 \cdot 10^8$		4	$1.2 \cdot 10^5$	d
	15	$7.9 \cdot 10^7$		15	d	$3.25 \cdot 10^6$
21	3	$1.2 \cdot 10^5$	d	3	d	$2.2 \cdot 10^5$
	20	d	$1.2 \cdot 10^5$	20	nd	$2.5 \cdot 10^6$
41	4	nd	$2.0 \cdot 10^8$	4	$6.3 \cdot 10^6$	d
	21	nd	$1.7 \cdot 10^4$	21	d	d
61	4	$2.0 \cdot 10^8$	$2.0 \cdot 10^8$	4	$2.0 \cdot 10^8$	$2.4 \cdot 10^7$
	18	$2.5 \cdot 10^4$	d	15	$1.1 \cdot 10^5$	$6.8 \cdot 10^4$

*d : faible détection, pas de quantification possible*  
*nd : non détecté*

Les huîtres infectées en milieu naturel, exposées à basses températures, puis remontées à 21°C en laboratoire, présentent toujours, à une exception près, de l'ADN d'OsHV-1 (Tableau 2). En revanche, l'ADN d'OsHV-1 n'a pas été détecté dans les témoins non exposés au milieu naturel. Par conséquent, notre étude montre que l'exposition des huîtres infectées à basse température retarde et réduit les mortalités en limitant la

prolifération d'OsHV-1, mais que le passage de ces animaux à 21°C en laboratoire réactive le virus et provoque d'importantes mortalités. La réactivation du virus suite à une augmentation de température à 21°C n'avait pas été observée en 2010 (Petton et al. 2013). Il est possible que le pouvoir pathogène ou invasif d'OsHV-1 en rade de Brest ait été plus fort en 2013. Cela expliquerait que les mortalités de NSI en 2013 ont été particulièrement élevées comparées aux années précédentes (voir section 3.1).

## 4. Conclusions et perspectives

Notre étude montre que le naissain d'huître creuse préalablement infecté par OsHV-1 muvar par exposition en milieu naturel pendant 5 d ou 8 d, puis transféré à basse température (10°C ou 13°C) pendant 5 à 80 d, présente des mortalités plus faibles et plus tardives que les animaux témoins en laboratoire. La réduction des mortalités observée dans le naissain exposé à basse température coïncide avec une diminution progressive des concentrations d'ADN appartenant à OsHV-1 dans les tissus, au point de devenir non-déTECTÉ ou non quantifiable après 6 à 41 d.

En revanche, lorsque ces animaux sont exposés à une augmentation de température à 21°C en laboratoire, le virus est réactivé et d'importantes mortalités sont constatées. Bien que ces mortalités soient souvent inférieures à celles des animaux témoins, le gain de survie est généralement faible et semble indépendant de la température (10°C ou 13°C) et de la durée d'exposition à basse température (5 à 80 d).

Enfin, lorsque ces animaux sont réexposés en milieu naturel où la maladie sévit, des mortalités similaires à celles des groupes témoins sont constatées. Par conséquent, notre étude montre que les huîtres naturellement exposées à OsHV-1, chez lesquelles le développement de la maladie est limité par une exposition plus ou moins longue à basses températures, demeurent sensibles à cet agent infectieux.

Cette étude a permis d'obtenir du naissain d'huître standardisé, infecté par OsHV-1, où le développement de la maladie a été naturel ou contrôlé par l'application de basses températures. Par conséquent, grâce à cette expérience, nous allons approfondir les mécanismes physiologiques impliqués au cours de l'infection et du cycle de latence-réactivation d'OsHV-1 chez l'huître. Ce travail est en cours au laboratoire.

## 5. Références

- Dégremont L (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317:94-98
- Dégremont L, Guyader T, Tourbiez D, Pépin J-F (2013) Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture* 408–409:51-57
- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu X, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, Kirkland PD, Frances J (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Org* 105:109-126
- Little TJ, Kraaijeveld AR (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol Evol* 19:58-60

- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269-276
- Pernet F, Barret J, Gall PL, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, Pépin J-F, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon. *Aquaculture Env Interact* 2:215–237
- Petton B, Alunno-Bruscia M, Boudry P, Pernet F (en preparation) Investigating risk factors associated with disease mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* using standardized seed and controlled temperature elevation. *Aquaculture Env Interact*
- Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 3:257-273
- Pope EC, Powell A, Roberts EC, Shields RJ, Wardle R, Rowley AF (2011) Enhanced Cellular Immunity in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'Vaccination'. *PLoS ONE* 6
- Segarra A, Pepin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) 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* 153:92-99
- Tamayo D, Corporeau C, Petton B, Quéré C, Pernet F (soumis) Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1  $\mu$ var. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*