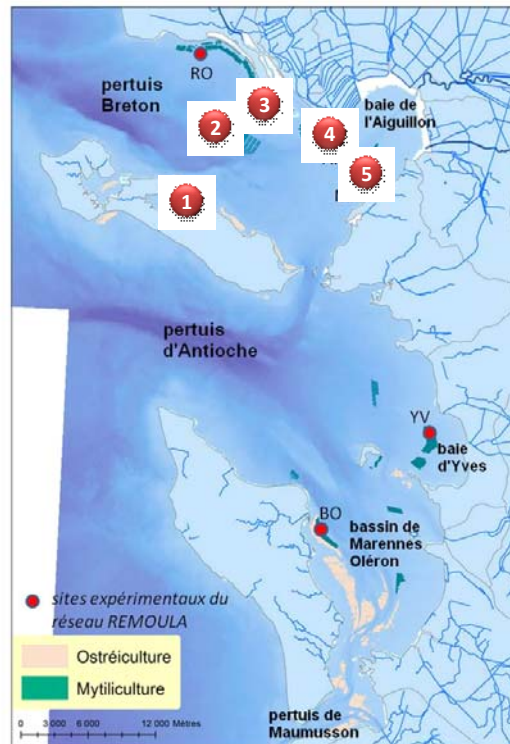


SURMORTALITES DE LA MOULE BLEUE *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014)

Rapport d'expertise sous convention DGAL n° 14/1211521 et
 DPMA n° 14/1211522



* LER PC, La Tremblade
 ** PFOM/PI, UMR LEMAR, Brest
 *** SG2M/LGPMM, La Tremblade
 **** RBE/CTC, Nantes

SOMMAIRE

Introduction générale	4
AXE 1 : caractérisation environnementale, hydrologique et hydrodynamique à l'échelle des Pertuis Charentais des zones d'élevage de la moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	5
1. Le constat des mortalités	5
1.1 Les données sources et sites mytilicoles étudiés	5
1.2 Chronologie des mortalités de moules signalées dans les Pertuis charentais.....	6
1.3 Intensité et spatialisation des mortalités de moules dans les Pertuis charentais.....	8
2. Caractérisation physico-chimiques et biologiques à l'échelle de la façade atlantique	10
2.1 Anomalies de turbidité	10
2.2 Anomalies de Chlorophylle a	11
3. Caractérisation physico-chimiques et biologiques à l'échelle des Pertuis Charentais.....	11
3.1 Evolution des paramètres physico-chimiques et biologiques à la station « Filière W » du Pertuis Breton durant le premier trimestre 2014	11
3.2 Caractérisation du contexte environnemental du point « Filière W » du Pertuis Breton durant le premier trimestre 2014.....	14
3.3 Caractérisation spatiale et interannuelle des sites mytilicoles	15
4. Apports de la modélisation hydrodynamique.....	21
4.1 Estimation de la connectivité des différents secteurs géographiques du Pertuis Breton en lien avec l'évolution spatio-temporelle des surmortalités de moules de l'hiver 2014.....	21
4.2 Evolution spatio-temporelle des surmortalités mise en évidence par le modèle MARS3D-PC	22
4.3 Estimation quantitative des surmortalités par modélisation et analyse des bouées virtuelles	25
AXE 2 : Caractérisation pathologique des moules des zones d'élevage de la moule bleue <i>Mytilus edulis</i> dans les Pertuis Charentais.....	27
5. Bilan des analyses de recherche d'agents infectieux réalisées dans le cadre de saisines Repamo...	27
6. Essais d'induction de mortalité chez les moules	28
7. Diversité des isolats bactériens du groupe <i>Splendidus</i> collectés pendant et hors période de mortalités de moules depuis 2010.....	28
7.1 Isolats bactériens appartenant au groupe <i>Splendidus</i> prélevés au cours d'épisodes de mortalité	29
7.2 Isolats bactériens appartenant au groupe <i>Splendidus</i> prélevés hors d'épisodes de mortalité.....	30
AXE 3 : Caractérisation physiologique des zones d'élevage de la moule bleue <i>Mytilus edulis</i> dans les Pertuis Charentais.....	32
8. Matériel et méthode.....	32
8.1 Plan d'échantillonnage.....	32
8.2 Analyse énergétique	32
9. Résultats et discussion.....	35
9.1 Analyses énergétiques et nutritionnelles	35
9.2 Analyses métabolomiques.....	37
Conclusion générale	39
Références bibliographiques.....	41
Annexes.....	43
Annexe 1. Constat des missions d'enquête des DDTM Vendée et Charente Maritime	43
Annexe 2. Comparaison des débits des principaux fleuves impactant les Pertuis Charentais en automne depuis 1998.....	45
Annexe 3. Evolution de la masse cumulée des deux traceurs aux différentes bouées virtuelles du Pertuis Breton.....	46

Introduction générale

Motivation de l'étude

Suite aux surmortalités observées au sein des élevages de moules touchant à la fois les animaux adultes et les juvéniles au mois de mars, dans les Pertuis Charentais, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) a adressé une saisine à Ifremer le 04 avril 2014. Celle-ci fait état d'une demande d'appui scientifique et technique d'Ifremer pour tenter d'apporter des éléments de réponse par rapport à cette mortalité subite et importante.

Ifremer a proposé un projet d'action permettant l'expertise du phénomène de surmortalité de la moule bleue, selon 3 axes : l'impact environnemental, la pathologie et les caractéristiques physiologiques des moules. Il s'agit de mettre en évidence la présence ou non d'agents infectieux connus ou émergents, d'apporter des éléments de compréhension au regard des fluctuations environnementales, de la réponse physiologique et biochimique des moules dans la mer des Pertuis Charentais et des interactions entre ces trois volets.

Quelques éléments de connaissance

Depuis la fin des années 70, des événements épisodiques à grande échelle tels que des épidémies, des mortalités massives, des efflorescences d'algues toxiques et autres atteintes graves aux populations d'élevage ou de gisement naturel se sont produites dans l'environnement marins à des taux sans précédent historique (Harvell et al. 1999, Burge et al. 2014). Bien que le phénomène de mortalité massive soit souvent associé à des agents infectieux, il reflète souvent des changements environnementaux et un équilibre énergétique défavorable chez l'animal. Notons qu'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 (Samain & McCombie 2008).

Les mortalités d'huîtres creuses, communément appelées « mortalités estivales », se produisent lorsque la température de l'eau augmente jusqu'à atteindre 19-20°C, en période de pré ponte, un état reproducteur caractérisé par un budget énergétique négatif : les ressources énergétiques sont au plus bas alors que la demande énergétique et l'effort reproducteur sont maximaux (Soletchnik et al. 1997, Berthelin et al. 2000, Delaporte et al. 2006, Soletchnik et al. 2006, Samain & McCombie 2008). Au même moment, les hémocytes, qui sont les cellules responsables des défenses immunitaires chez les mollusques, sont moins performants (Delaporte et al. 2006, Gagnaire et al. 2006, Li et al. 2009). Par conséquent, les huîtres en période de pré-ponte sont caractérisées par un affaiblissement énergétique et immunitaire qui les rend plus sensibles aux agents infectieux.

Pendant la maturation gonadique, la composition biochimique des bivalves marins change, reflétant un cycle annuel et naturel de stockage et d'utilisation des réserves énergétiques, en lien avec la reproduction (Barber & Blake 1981, De Zwaan & Mathieu 1992, Berthelin et al. 2000, Barber & Blake 2006). En général, l'énergie est stockée avant la gamétogenèse sous forme de glycogène, de lipides (triglycérides) et de protéines dans le manteau et la glande digestive. Le glycogène et les protéines sont utilisés pour la formation des tissus reproducteurs et la prolifération des gamètes, alors que les lipides sont des réserves énergétiques importantes dans les œufs, assurant la viabilité des larves. Chez la moule bleue, le glycogène constitue la réserve énergétique principale pour alimenter la gamétogenèse en période printanière (Bayne et al. 1982, Pipe 1987, De Zwaan & Mathieu 1992, Martinez-Pita et al. 2012).

En dehors de ces variations naturelles liées à la reproduction, les réserves énergétiques des bivalves marins peuvent varier en fonction des conditions environnementales plus ou moins favorables pour l'animal. Par exemple, Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, les différentes conditions énergétiques, en partie dues à des changements de qualité de la nourriture, jouent un rôle significatif dans la dynamique spatiale et temporelle des mortalités associées au virus OsHV-1 (Pernet et al. 2014). Plus particulièrement, la contribution relative des diatomées au régime alimentaire des huîtres est positivement corrélée avec leurs réserves énergétiques, qui diminuent le risque de mortalité.

Les stress environnementaux au sens large interagissent donc avec l'état physiologique des bivalves, les rendant plus ou moins sensibles aux infections par les pathogènes.

AXE 1 : Caractérisation environnementale, hydrologique et hydrodynamique à l'échelle des Pertuis Charentais des zones d'élevage de la moule bleue *Mytilus edulis*

1. Le constat des mortalités

Les données sources et sites mytilicoles étudiés

➤ Les sources de données utilisées dans le cadre de cette expertise

Différentes sources de données ont été utilisées afin d'analyser les variations environnementales du premier trimestre 2014 :

- Services de l'état, DDTM 17 et 85 (constats de mortalité, données de gestion de l'eau)
- Compte rendu CRC 85
- Hydro France (Débits des fleuves)
- Ifremer
 - Réseaux institutionnels (REPAMO, REPHY, MYTILOBS)
 - Réseaux régionaux (SAPERCHAIS)
 - Plateforme PREVIMER-OCCO (MARS3D, conditions limites du modèle)
 - Images satellites (DYNECO/PELAGOS)

Ainsi les données physico-chimiques et biologiques utilisées sont issues des réseaux de surveillance institutionnels de l'Ifremer, avec une antériorité de plusieurs décennies. Le réseau d'observation régional SAPERCHAIS mis en place depuis 2009 et financé par la CPER Poitou-Charentes de 2008 à 2011, dispose de sondes multiparamètres haute fréquence (pas de temps de 10-15 mn) déployées dans les différentes masses d'eau des Pertuis Charentais.

La climatologie de la période considérée est prise en compte dans la modélisation hydrodynamique via le modèle MANGA du projet PREVIMER (Ifremer). Celui-ci alimente le modèle hydrodynamique régional, MARS3D-PC permettant de simuler, en conditions réalistes, les apports terrigènes et marins dans les Pertuis Charentais.

L'imagerie satellite a permis une investigation de l'environnement des Pertuis complétant le panel d'outils et de données disponibles pour cette expertise. Cette investigation s'est faite au niveau de la façade atlantique et sur des stations spécifiques des sites mytilicoles charentais. A partir de l'ensemble de la base de données historique d'imagerie satellite, des séries chronologiques ont été extraites en des points géographiques précis, constituant des "bouées virtuelles".

➤ **Les sites d'étude**

Les principaux sites mytilicoles des Pertuis Charentais sont localisés (1) dans le Pertuis Breton avec les bouchots des Roulières (B.ROU), d'Aiguillon (B.AIG) et de Marsilly (B.MA) et les filières du Pertuis Breton (F.PB) ; et (2) dans le Pertuis d'Antioche, avec les bouchots d'Yves (B.YV) et de Boyard (B.BO), et les filières d'Yves (F.YV) (Chatelaillon) et des Saumonards (F.SAU) (*Figure 1. et Tableau 1.*). Dans le cas de l'expertise, les bouées virtuelles sont situées au niveau des différents sites mytilicoles des Pertuis Charentais (*Figure 1.*).

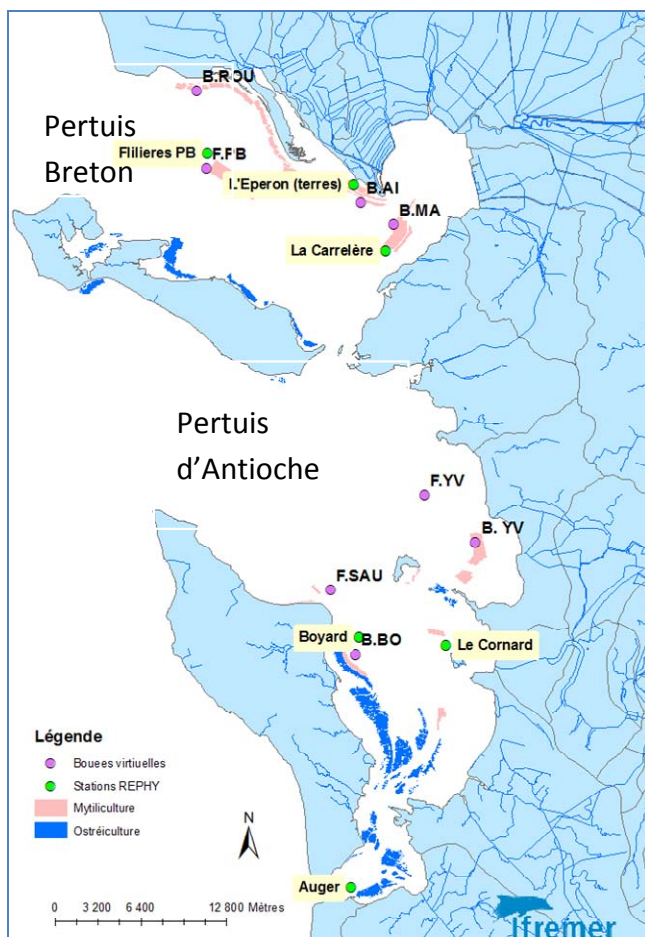


Figure 1. Localisation des stations de surveillance et d'observation (REPHY); une sonde multiparamètres haute fréquence (SAPERCHAIS) est aussi positionnée au point F.PB; les stations virtuelles d'imagerie satellitaire ont été choisies à proximité immédiate des zones mytilicoles, en zone subtidale.

Tableau 1. Les principaux sites mytilicoles des Pertuis Charentais.

Pertuis Breton (secteur impacté)	Pertuis d'Antioche (secteur peu ou pas impacté)
Bouchots des Roulières (B.ROU)	Bouchots d'Yves (B.YV)
Bouchots d'Aiguillon (B.AI)	Bouchots de Boyard (B.BO)
Bouchots de Marsilly (B.MA)	Filières d'Yves (F.YV)
Filières du Pertuis Breton (F.PB)	Filières des Saumonards (F.SAU)

Chronologie des mortalités de moules signalées dans les Pertuis charentais

Ces informations sont issues à la fois de la profession mytilicole et des saisines réalisées par le réseau de surveillance des pathologies des mollusques (REPAMO) et MYTILOBS de l'Ifremer.

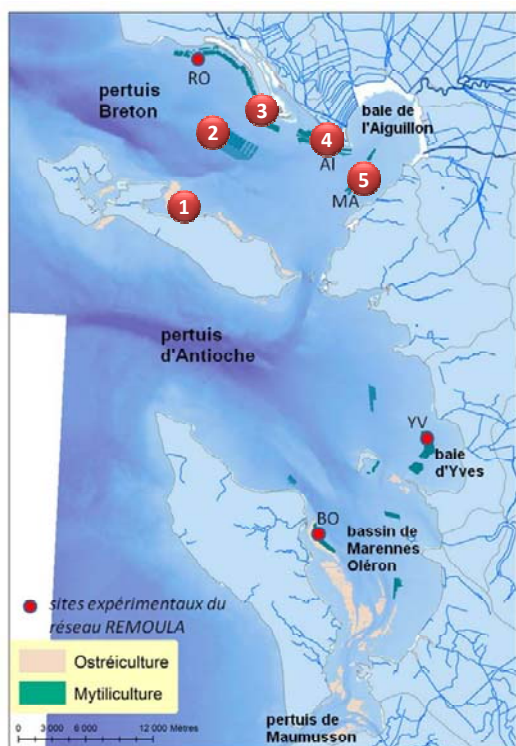
- 1- Le CRC Pays de Loire informe que des mortalités de moules sont constatées dès le 05 mars 2014 sur les moules sauvages captées (en 2013) sur les tables ostréicoles de l'île de Ré (1^{ère} semaine de mars).
- 2- Le 10 mars, des mortalités importantes sont constatées sur les filières du Pertuis Breton. Début de mortalité sur les bouchots (2^{ème} semaine de mars).
- 3- Les premiers prélèvements de REPAMO sur les bouchots ont lieu le 17 mars. La mortalité est de 32 % sur les juvéniles de bouchots à la pointe d'Arçay dans le nord du Pertuis Breton. Le réseau MYTILOBS estime la mortalité à 22 % sur les filières du Pertuis Breton, 9 % sur les bouchots de l'Aiguillon à 1 % sur les bouchots d'Yves.

- 4- En semaine 12 (3^{ème} semaine de mars), une hausse de mortalité est déclarée sur des moules adultes (> 2 ans) issues de captage naturel, élevées en filières dans le Pertuis Breton. La mortalité moyenne estimée est de 26.5 % le jour de l'intervention le 20 mars.
- 5- En semaine 12 (3^{ème} semaine de mars), une hausse de mortalité est déclarée sur des moules adultes (> 2 ans) dans le Pertuis d'Antioche sur les filières de la baie d'Yves. La mortalité estimée est comprise entre 5-20 % le jour de l'intervention le 19 mars.
- 6- En semaine 13 (fin mars), une hausse de mortalité de moules (1-2 ans), issues de captage naturel, élevées sur bouchots, est déclarée dans le Pertuis Breton près de l'Eperon. La mortalité estimée est de 16 % le jour de l'intervention le 27 mars.
- 7- En semaine 13 (fin mars), une hausse de mortalité est déclarée dans la baie de l'Aiguillon, à Marsilly. Les animaux affectés sont des moules juvéniles (1-2 ans), issues de captage naturel, élevées sur bouchots. La mortalité estimée est de 20 % le jour de l'intervention le 28 mars.

L'épisode des surmortalités de moules dans le Pertuis Breton semble centré sur le mois de mars 2014 (aucune autre saisine de moules n'a eu lieu au cours du mois d'avril, dans les Pertuis Charentais).

Remarque : au début du mois d'avril (semaine 14), des mortalités de coquilles Saint-Jacques et de pétoncles adultes sont constatées dans les Pertuis Breton et d'Antioche. Les taux de mortalité sont d'environ 20 % et 9 % pour les coquilles Saint-Jacques, et de 43 % et 3 % pour les pétoncles, respectivement (source REPAMO).

La *Figure 2* reprend les différentes dates d'observations et de déclarations des premières mortalités sur les sites mytilicoles des Pertuis Charentais. Cette dernière montre que les premières mortalités sont présentes dans un secteur situé entre la fosse de Loix et les filières du Pertuis Breton (1,2). Une semaine plus tard, les surmortalités touchent les moules des bouchots de la pointe d'Arçay (3), puis dix jours plus tard, les bouchots de l'Aiguillon et de Marsilly (4,5) au sud de la baie de l'Aiguillon. Ainsi, les mortalités semblent se « propager » du « centre-sud » vers l'Est du Pertuis Breton, en trois semaines environ, en remontant par le Nord (« sens des aiguilles d'une montre »).



Date	Sites	
05 mars 2014	1	moules sauvages sur tables ostréicoles de l'île de Ré
10 mars 2014	2	filières du Pertuis Breton
17 mars 2014	3	bouchots de la pointe d'Arçay
27 mars 2014	4	bouchots de l'Aiguillon (site de l'Eperon)
28 mars 2014	5	bouchots de Marsilly

Figure 2. Spatialisation des premières déclarations de mortalités de moules sur les sites mytilicoles des Pertuis Charentais

Les mortalités de moules apparaissent dès la première semaine de mars, dans un secteur « centre-sud » du Pertuis Breton. Les mortalités sur les différents sites mytilicoles semblent ensuite se « propager » vers l'Est du Pertuis Breton, en trois semaines environ¹.

Intensité et spatialisation des mortalités de moules dans les Pertuis charentais

Entre mars et avril 2014, les DDTM 17 et 85 effectuent les constats de mortalités de moules dans les Pertuis Charentais (annexe 1).

L'estimation des pertes de récolte effectuée par les DDTM est réalisée comme décrit dans l'encadré ci-dessous :

Comment est estimée la perte de récolte ?
1- Remontée de 3 descentes entières (filières) et de la totalité des moules de 3 bouchots sur 12 points de prélèvement repartis dans le Pertuis Breton.
2- Réalisation de 1 à 3 échantillonnages de 1,5 Kg en moyenne par point → première pesée
3 - Tri et retrait des moules vivantes → deuxième pesée
4 - Établissement d'un taux de perte moyen par point de prélèvement

A la fin du mois d'avril 2014, les constats font état de mortalités comprises entre 88 et 100 % dans le Nord et l'Ouest du Pertuis Breton, entre 34 et 80 % de part et d'autre de la baie de l'Aiguillon, et entre 3 et 10 % dans le Pertuis d'Antioche, considéré dans ce dernier cas, comme des mortalités "naturelles" de moules (en fin avril) (*Figure 3. et Tableau 2.*). Les mortalités reportées sont de 80 à 100 % sur les filières du Pertuis Breton, de 100 % sur les zones des Ecluseaux, des Roulières, et de la Belle Henriette (Sud Vendée), de 90 % sur les sites du Pas de tranchais et de la pointe de la Roche (Sud de l'estuaire du Lay), de 50 à 80 % sur la pointe de l'Aiguillon (Ouest de la baie de l'Aiguillon), de 34 % sur Marsilly (Est de la baie de l'Aiguillon), et de 8 % sur les filières d'Yves, de 10 % sur les bouchots d'Yves et de 3 % sur les bouchots d'Aix (dans le Pertuis d'Antioche) (constats DDTM) (*Figure 3. et Tableau 2.*).

¹ Début mai (semaine 18), des mortalités sont signalées à la fois sur le site des Saumonards (dans le Pertuis d'Antioche) et également en Rade de Brest.

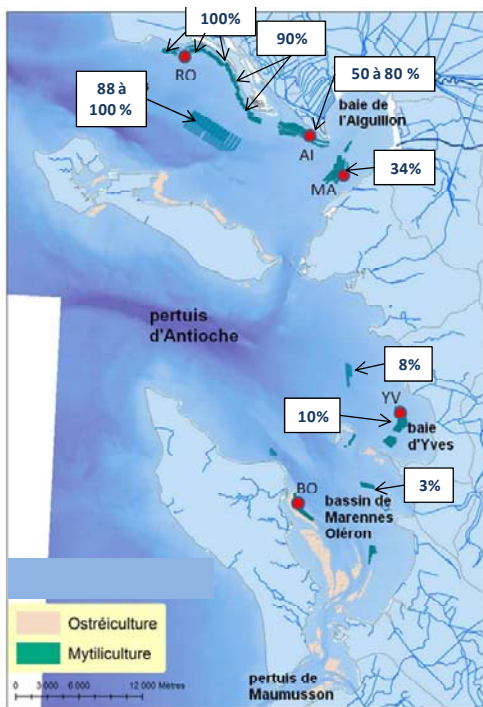


Figure 3. Bilan fin avril 2014 des mortalités de moules dans les Pertuis Charentais : 80 à 100 % sur les filières du Pertuis Breton ; 100 % sur les Ecluseaux, les Roulières (RO), et la Belle Henriette (sud Vendée) ; 90 % sur le Pas de tranchais et la pointe de la Roche (sud de l'estuaire du Lay) ; 50 à 80 % sur la pointe de l'Aiguillon (AI), 34 % sur Marsilly (MA), 8 % sur les filières d'Yves, 10 % sur les bouchots d'Yves (YV) et 3 % sur les bouchots d'Aix (d'après les constats de mortalités de moules des missions d'enquête des DDTM de Vendée et Charente maritime).

Ainsi, les constats de mortalités de moules fin avril 2014 (réalisés par les DDTM de Vendée et de Charente maritimes au cours des mois de mars et avril) montrent bien une spatialisation de l'intensité des mortalités, avec un secteur Nord Ouest du Pertuis Breton, très impacté, un secteur Est du Pertuis Breton, moins impacté, et un Pertuis d'Antioche considéré comme non impacté par les mortalités de moules.

Tableau 2. Constats de la mission d'enquête de la DDTM auprès de professionnels (données communiquées par les DDTM 17 et 85).

Zone ou secteur	Tonnage théorique (tonnes)	Taux de pertes estimé	Perte théorique (tonnes)
Filières du Pertuis Breton (Vendéens)	900	100 %	900
Filières du Pertuis Breton (Charentais)	1434	88 %	1262
Les Ecluseaux	260	100 %	260
Les Roulières	370	100 %	370
La Belle Henriette	637	100 %	637
Pas de Tranchais	925	90 %	833
Pointe de la Roche	1000	90 %	900
Pointe de l'Aiguillon	2400	70 %	1680
Bouchots de Marsilly-Esnandes	1711	34 %	582
Filières de la baie d'Yves	736	8 %	59
Bouchots de la baie d'Yves	1586	10 %	159
Bouchots de l'île d'Aix	161	3 %	5

2. Caractérisation physico-chimiques et biologiques à l'échelle de la façade atlantique

Les résultats présentés ci-dessous sont élaborés à partir de l'interpolation spatiale et temporelle de plusieurs satellites, i.e. SeaWiFS, MODIS et MERIS (IFREMER).

Anomalies de turbidité

A l'échelle de la façade atlantique, une anomalie exceptionnelle de turbidité, enregistrée en février 2014, perdure encore en mars, du sud de la Gironde au sud de la Bretagne (Figure 4). Cette anomalie, de l'ordre de 10 mg/L d'écart par rapport à la médiane mensuelle est la conséquence des tempêtes, coups de vent et fortes précipitations qui touchent la façade atlantique au cours de l'hiver 2014. Ces résultats sont bien en cohérence avec les régimes de houles, particulièrement forts en début janvier, février, et début mars (Figure 5).

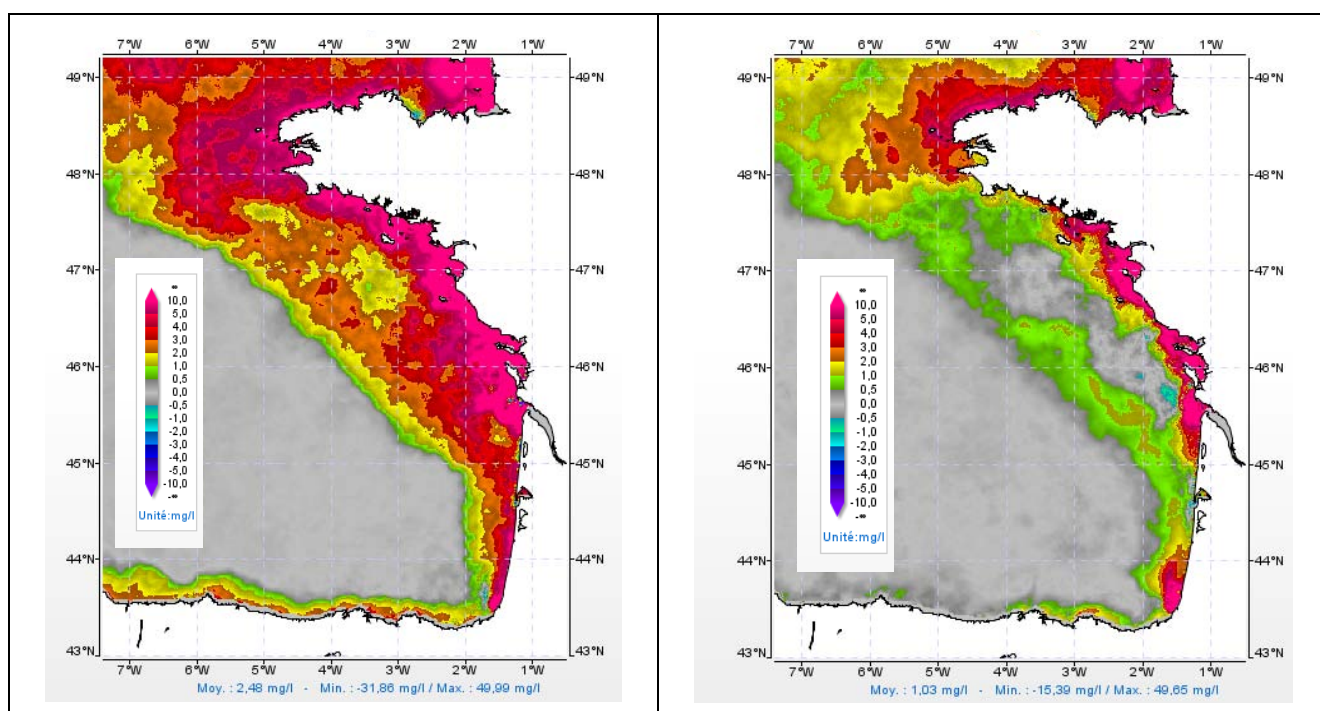


Figure 4. Anomalies mensuelles de turbidité (MES, mg/L) en février (gauche) et mars (droite) 2014 (Comparaison depuis 1986 ; d'après données Ifremer/DYNECO/PELAGOS, F. Gohin).

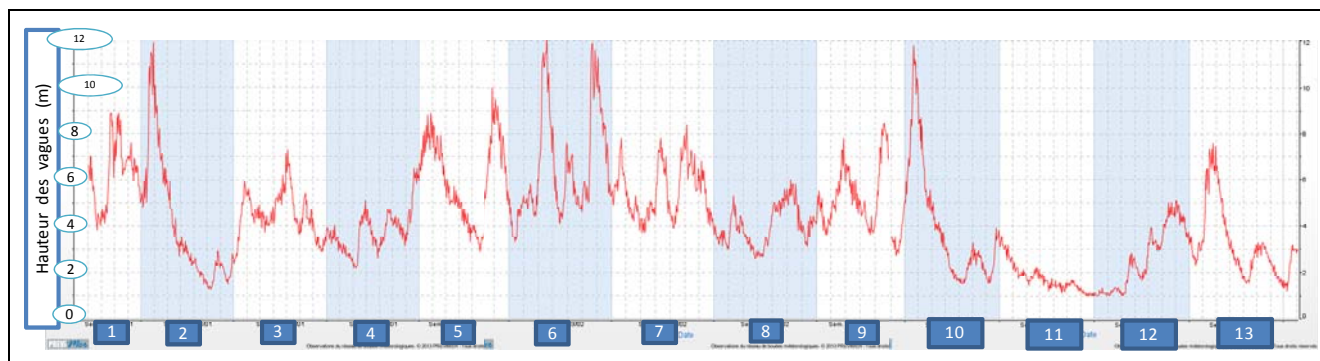


Figure 5. Hauteur significative des vagues (mètres) à la bouée de Gascogne (62001) (45°25'N – 5°W) au cours de l'hiver 2014 (semaines 1 à 13).

Anomalies de Chlorophylle a

A partir de l'imagerie satellite, le mois de mars 2014 ne semble pas marqué par de fortes anomalies de concentration en Chlorophylle *a*, en particulier au niveau des Pertuis Charentais (Figure 6).

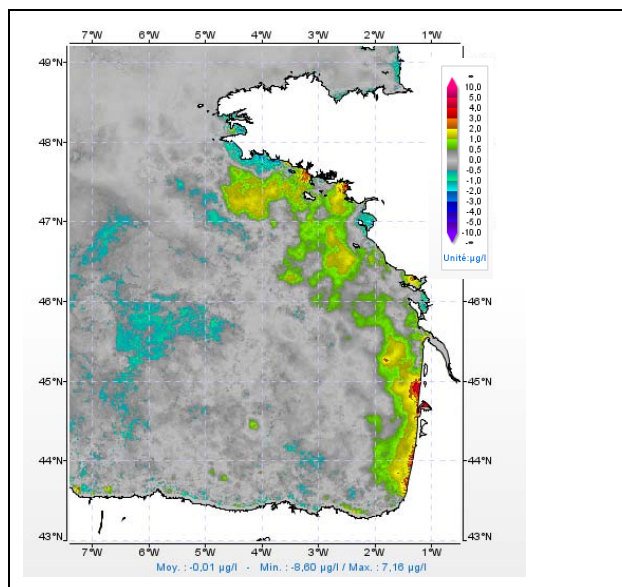


Figure 6. Anomalies de chlorophylle a (Chl a, µg/L) en mars 2014 (comparaison depuis 1986 ; d'après données Ifremer/DYNECO/PELAGOS, Francis Gohin)

Les turbidités exceptionnelles rencontrées en hiver 2014 ne sont pas propres aux Pertuis Charentais. Elles sont générales au niveau de la façade atlantique, et spécialement fortes de la Gironde à la pointe sud Bretagne. Cette forte turbidité est la conséquence probable de l'effet conjoint des forts régimes hydriques hivernaux (débits des fleuves), mais surtout, des coups de vent et tempêtes de l'hiver 2014. Les ressources trophiques (estimées par la Chlorophylle a) sont dans les normes saisonnières à l'échelle de la façade atlantique.

3. Caractérisation physico-chimiques et biologiques à l'échelle des Pertuis Charentais

Evolution des paramètres physico-chimiques et biologiques à la station « Filière W » du Pertuis Breton durant le premier trimestre 2014

Les mesures *in situ* réalisées dans le cadre du réseau expérimental SAPERCHAIS et du réseau national REPHY ont permis de suivre les fluctuations physico-chimiques et biologiques du point « Filière W » du Pertuis Breton du 01 janvier au 05 mai 2014. D'importantes variations ont été observées durant ce premier trimestre 2014 comme le montrent la Figure 7 et le Tableau 3.

Température et salinité de l'eau de surface

La température de l'eau, avec une moyenne de 11.1 ± 1.6 °C, a évolué de 8.3 °C le 12 février (03:50 TU) à 16.3 °C le 10 avril (16:10 TU) 2014. Février et avril ont été les mois les plus froids et chauds avec en moyenne 9.5 ± 0.5 °C et 13.0 ± 0.7 °C, respectivement (Figure 7.A et Tableau 3). Des différences significatives ont été remarquées entre les différents mois (test de Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Suite aux températures basses (entre 8.7 et 10.2 °C) mesurées de janvier à fin février, deux hausses successives de température de l'eau, de 9.9 °C (03/03/2014) à 11.7 °C (13/03/2014) puis de 10.8 °C (27/03/2014) à 14.1 °C (10/04/2014) ont été observées (Figure 7.A). Concernant la salinité, d'importantes variations ont été révélées par les mesures haute fréquence que ce soit à l'échelle du mois, du jour et de la minute. Des différences significatives ($p < 0.0001$) ont aussi été mesurées entre les quatre mois avec celui de février présentant la moyenne la plus basse (28.1 ± 2.1) et celui d'avril marqué par la moyenne la plus forte (32.1 ± 0.7). Les mois de janvier, février et début mars ont été caractérisés par plusieurs baisses successives de salinité au point « Filière W » comme par exemple le 19 janvier à 12:20, le 17 février à 23:40 et le 07 mars à 16:50 où des valeurs basses de 21.7, 16.5 et 16.0 ont été mesurées (Figure 7.A). A partir du 15 mars 2014, des masses d'eau caractérisées par des valeurs de salinité constantes (valeurs moyennes journalières entre 30 et 34) ont été mesurées (Figure 7.A).

Turbidité et concentration en oxygène de l'eau de surface

Des eaux de surface bien oxygénées ont été observées durant le premier trimestre 2014 avec une moyenne de 8.8 ± 0.4 mg/L (*Tableau 3*) et des valeurs minimale et maximale de 7.6 et 9.7 mg/L mesurées le 04 mai 2014 (01:00) et le 23 février (03:34), respectivement (*Figure 7.B*). Des valeurs constantes autour de 9.2 mg/L ont été observées jusqu'à fin mars avant d'observer à partir du 20 avril 2014, une baisse des concentrations et une stabilisation des valeurs autour de 8.3 mg/L. Des différences significatives ($p < 0.0001$) entre chacun des quatre mois ont aussi été notées avec des valeurs moyennes minimales et maximales proches de celles calculées par jour ou encore des valeurs mesurées toutes les 10 minutes (*Tableau 3*). Concernant la turbidité de l'eau de surface au point « Filière W », plusieurs pics ont été remarqués en particulier de la période allant de la fin janvier à début mars 2014 avec des valeurs importantes atteignant 75.3 et 134.2 NTU les 7 (03:44) et 28 (20:14) février 2014, respectivement. A la suite de cette période hivernale instable, des valeurs faibles et constantes inférieures à 10 NTU ont été mesurées en particulier à partir du 24 mars 2014 (*Figure 7.B*).

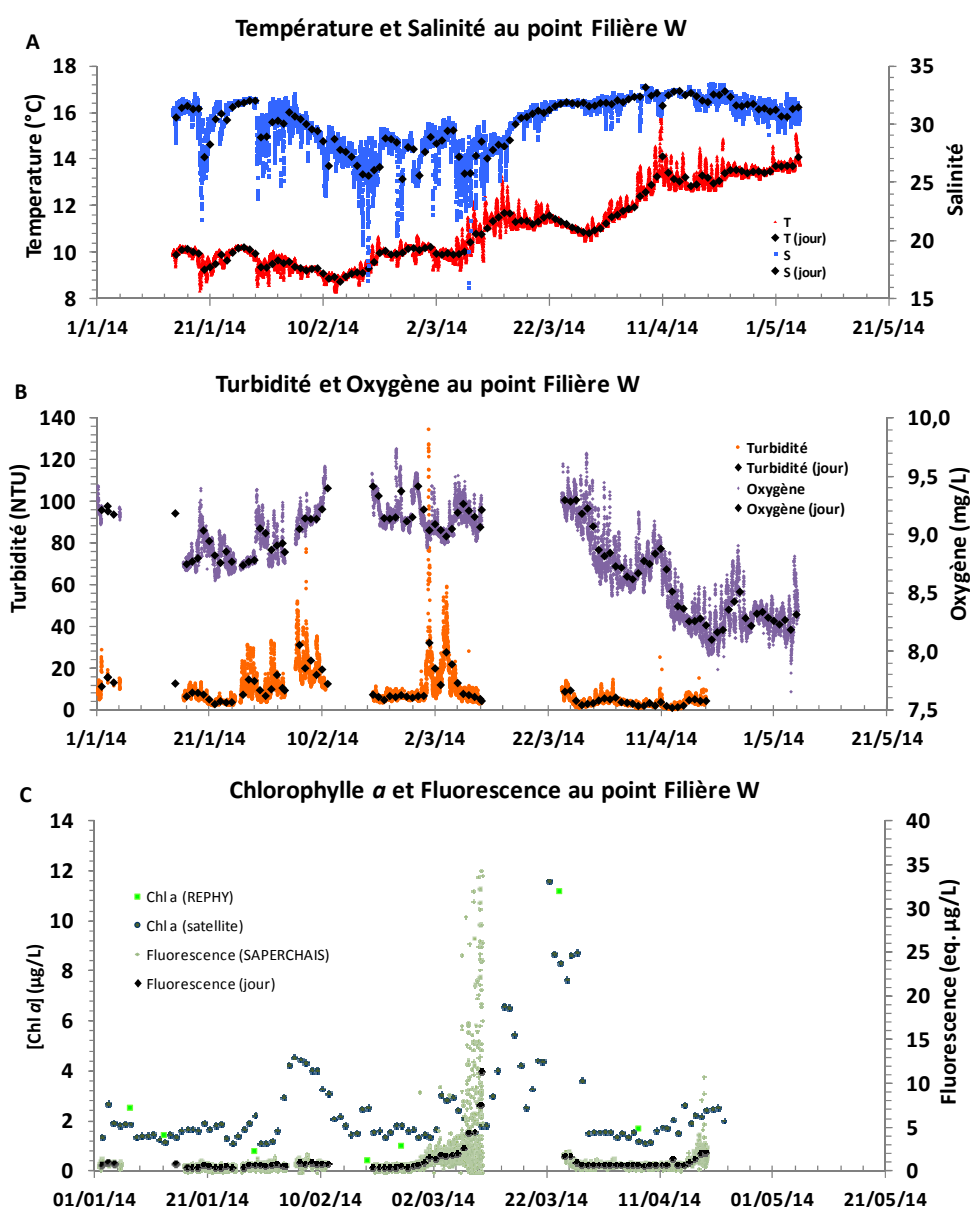


Figure 7. Paramètres physico-chimiques et biologiques mesurés au point Filière W dans les Pertuis breton du 01 janvier au 05 mai 2014. (A) Température (°C) et salinité (sondes STPS, toutes les 10 minutes) ; (B) turbidité (NTU) et concentration en oxygène (mg/L) (sonde YSI, toutes les 10 minutes) ; (C) Concentration en chlorophylle a (REPHY, tous les quinze jours et calculée à partir des analyses par images satellites, tous les jours) et fluorescence (sonde YSI, toutes les 10 minutes). Les points noirs correspondent aux valeurs moyennées par jour à partir des données haute fréquence mesurées par les sondes multiparamètres.

Tableau 3. Paramètres physico-chimiques et biologiques mesurés au point Filière W dans les Pertuis breton du 01 janvier au 05 mai 2014. 10 minutes : valeurs mesurées toutes les 10 minutes par les sondes multiparamétriques ; Jour : données par jour obtenues à partir des données mesurées toutes les 10 minutes ; Mois : données par mois obtenues à partir des données mesurées toutes les 10 minutes. Les moyennes (\pm écart-type), (minimum-maximum) et nombre de valeurs sont présentés.

	Mois				Jour	10 minutes
	janvier-14	février-14	mars-14	avril-14		
Température (°C)	9.8 \pm 0.4 (8.3 - 10.3) 2535	9.5 \pm 0.5 (8.3 - 10.7) 4027	10.9 \pm 0.6 (9.2 - 13.2) 4454	13.0 \pm 0.7 (11.1 - 16.3) 4319	11.1 \pm 1.6 (8.7 - 14.1) 111	11.1 \pm 1.6 (8.3 - 16.3) 15955
Salinité	30.6 \pm 1.7 (21.7 - 32.6) 2535	28.1 \pm 2.1 (16.5 - 32.6) 4027	29.8 \pm 2.1 (16.0 - 32.4) 4454	32.1 \pm 0.7 (29.1 - 33.4) 4318	30.1 \pm 2.1 (25.3 - 33.2) 111	30.1 \pm 2.3 (16.0 - 33.4) 15954
Turbidité (NTU)	7.3 \pm 5.0 (1.9 - 32.9) 2182	12.7 \pm 12.9 (3 - 134.2) 2492	9.1 \pm 9.1 (0.6 - 75.9) 2423	2.9 \pm 1.9 (0 - 25) 2591	8.4 \pm 5.1 (0.7 - 31.8) 76	8.0 \pm 9.1 (0 - 134.2) 9688
Oxygène (mg/L)	8.9 \pm 0.2 (8.6 - 9.4) 2182	9.2 \pm 0.2 (8.7 - 9.7) 2492	9.1 \pm 0.2 (8.6 - 9.7) 2424	8.5 \pm 0.3 (7.8 - 9.4) 4319	8.8 \pm 0.3 (8.1 - 9.4) 92	8.8 \pm 0.4 (7.6 - 9.7) 12038
Chlorophylle a (μg/L)	0.7 \pm 0.2 (0.1 - 1.6) 2178	0.9 \pm 0.4 (0.1 - 9.1) 2485	2.4 \pm 3.6 (0.1 - 34.5) 2396	1.1 \pm 1.6 (0.2 - 59.8) 2591	1.35 \pm 0.8 (0.5 - 11.6) 76	1.3 \pm 2.1 (0.1 - 59.8) 9650

Concentration en Chlorophylle a et fluorescence de l'eau de surface

Une fluorescence moyenne de 1.3 ± 2.1 eq. μ g/L a été mesurée au point « Filière W » avec des valeurs pouvant atteindre 60 eq. μ g/L au maximum comme ce fut le cas le 12 mars à 20h40 (Figure 7.C, Tableau 3). Des différences significatives ($p < 0.0001$) ont été mises en évidence entre les différents mois avec février et mars présentant les moyennes les plus basses et fortes respectivement (Tableau 3). Une bonne correspondance a été trouvée entre les valeurs de fluorescence moyennées par jour à partir des données haute fréquence du réseau SAPERCHAIS, les mesures de chlorophylle a ponctuelles du réseau REPHY et enfin les données journalières de chlorophylle a obtenues à partir du traitement d'images satellites (Figure 7.C). Cette dernière montre en particulier l'existence de deux efflorescences phytoplanctoniques dans le Pertuis Breton, la première ayant lieu le 06 février avec un maximum de 4.54 μ g/L et la seconde, de plus grande importance, le 22 mars 2014 avec des valeurs supérieures à 11 μ g/L. Des valeurs plus faibles et constantes autour de 2 μ g/L ont ensuite été enregistrées dès le début du mois d'avril. Les analyses réalisées dans le cadre du réseau REPHY ont permis de montrer que l'efflorescence phytoplanctonique du 22 mars 2014 était essentiellement composée de *Skeletonema costatum*, une diatomée de type algue fourrage.

A la vue de cette première analyse descriptive des fluctuations environnementales du point « Filière W », quelques éléments de caractérisation environnementale de ce trimestre peuvent être dégagés et explicités.

Caractérisation du contexte environnemental du point « Filière W » du Pertuis Breton durant le premier trimestre 2014

Les mois de janvier, février et début mars ont été marqués par des baisses successives de salinité mesurées au point « Filière W » du Pertuis Breton en lien avec les conditions météorologiques particulières de cet hiver 2014. Ces baisses importantes ont été généralement de courte durée, de l'ordre de quelques minutes sur une journée. En effet, comme le montre la *Figure 8.A*, la baisse de salinité observée le 07 mars 2014 à 16:50 a duré moins de 10 minutes avec des valeurs de 19.0 dès 17:00. Au contraire, la moyenne de salinité par jour la plus basse a été mesurée le 23 février, jour au cours duquel des valeurs plus élevées situées entre 21.3 et 21.2 ont été mesurées pendant plus de deux heures (*Figure 8.B*). Les données de salinité obtenues au point « Filière W » mettent en évidence une circulation complexe des masses d'eau dans le Pertuis Breton en fonction du rythme tidal. Le 07 mars 2014 par exemple, deux chutes consécutives de salinité ont été observées aux cours des deux marées montantes de la journée (de 27.0 à 22.8 et de 27.9 à 16.0 respectivement (*Figure 8.A*)). Ce phénomène observé aussi d'autres jours durant le premier trimestre 2014 au point « Filière W » montre le caractère hétérogène des masses d'eau du Pertuis Breton avec la présence sous certaines conditions de « lentilles » d'eau douce au sein des masses d'eau océanique. Les corrélations significatives et négatives observées de janvier à mars 2014 entre les moyennes journalières de salinité et les débits des fleuves Loire, Sèvre Niortaise, Charente et Dordogne permettent d'appuyer la double origine interne et externe de ces masses d'eau au Pertuis Breton (*Figure 9.A*). Ces dernières montrent également l'influence significative des grands fleuves que sont la Dordogne ($R^2 = 0.48$) et la Loire ($R^2 = 0.36$) sur les masses d'eau du Pertuis Breton et précisément de la station « Filière W » durant cet hiver 2014 caractérisé par des conditions météorologiques particulières.

Concernant la turbidité de l'eau de surface au point « Filière W », plusieurs pics ont été enregistrés en particulier de la période allant de la fin janvier à début mars 2014. Des corrélations significatives et positives ont été observées entre les valeurs moyennes de turbidité au point « Filière W » et de débits du Lay ($R^2 = 0.20$) et de la Dordogne ($R^2 = 0.32$) (*Figure 9.B*). Ceci montre là aussi l'influence des apports interne d'eau douce (plus turbides) du bassin versant du Pertuis Breton mais aussi externe via la Dordogne sur les masses d'eau de cette station côtière. Néanmoins, les valeurs significatives mais relativement faibles des coefficients de corrélation suggèrent également une influence des apports marins sur la turbidité et la dynamique des masses d'eau du point « Filière W » lors d'épisodes de forts courants de marée notamment.

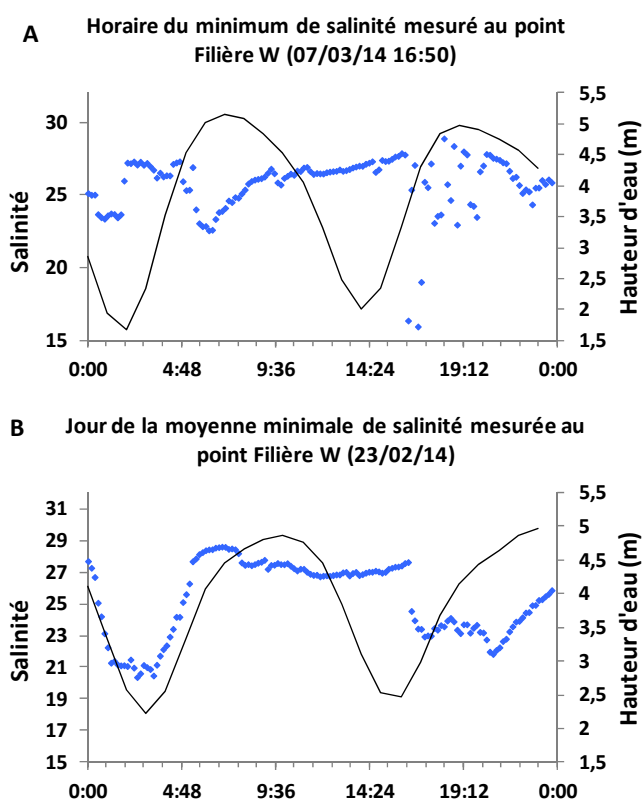


Figure 8. Valeurs de salinité mesurées toutes les 10 minutes (sonde multiparamètres STPS) au point Filière W dans le Pertuis Breton du 01 janvier au 05 mai 2014. (A) heure du minimum de salinité mesuré et (B) jour de la moyenne minimale de salinité calculée au point « Filière W ». Les hauteurs d'eau mesurées à Saint Martin de Ré (SHOM, toutes les heures) ont été représentées.

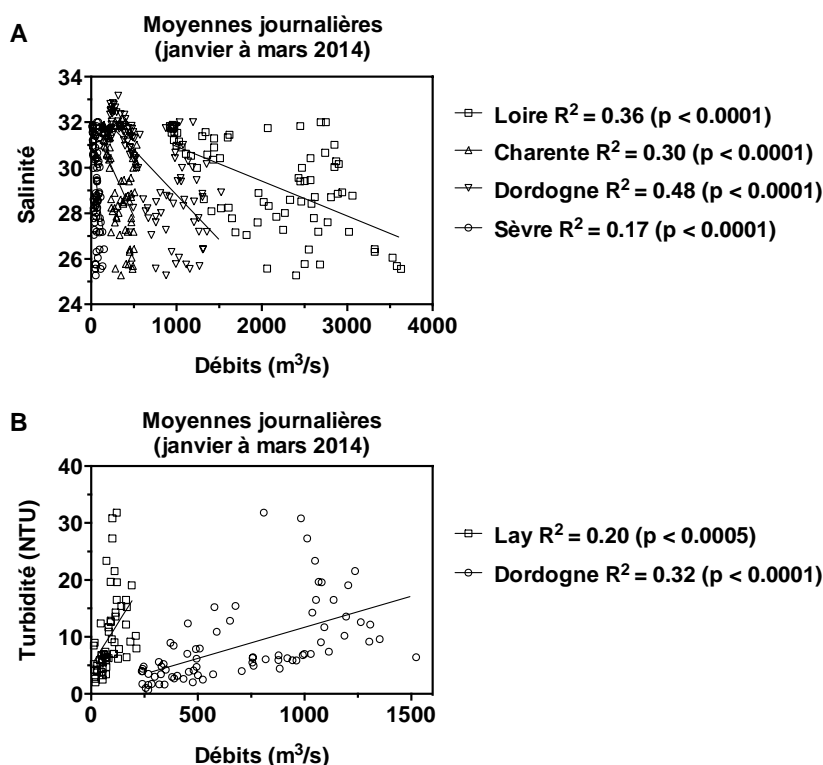


Figure 9. Corrélations linéaires significatives entre les moyennes de salinité (A) et de turbidité (B) de l'eau mesurées au point « Filière W » et les débits des fleuves du bassin versant des Pertuis Charentais.

Le premier trimestre 2014 au point « Filière W » du Pertuis Breton a été caractérisé par plusieurs baisses successives de salinité, des pics importants de turbidité en relation avec les apports marins et terrigènes et les conditions météorologiques particulières de cet hiver 2014 (tempêtes à répétition, fortes précipitations et épisodes venteux de secteur Sud). Le réchauffement des masses d'eau ainsi que les conditions anticycloniques ensoleillées de la deuxième quinzaine de mars ont aussi favorisé le développement d'un bloom phytoplanctonique dans le Pertuis Breton.

Caractérisation spatiale et interannuelle des sites mytilicoles

Régimes hydrologiques (débits des fleuves)

Les Pertuis Charentais sont à la fois sous l'influence des fleuves internes et externes aux Pertuis. Parmi les fleuves internes aux Pertuis, la Charente et la Seudre impactent principalement le Pertuis d'Antioche. La Sèvre Niortaise et le Lay impactent le Pertuis Breton. Par ailleurs, la Gironde et la Loire ont des panaches fluviaux qui influencent également les masses d'eau des Pertuis Charentais. C'est en automne et en hiver que les apports en eau douce sont les plus importants. En automne 2013, les débits ont été sensiblement supérieurs à la médiane pour l'ensemble des fleuves impactant les Pertuis, sauf pour le Lay, sans excès toutefois par rapport aux 16 années de référence (annexe 2).

En hiver par contre, les débits ont été largement excédentaires pour tous les fleuves qui impactent les Pertuis Charentais. Gironde, Charente, Lay et Seudre ont battu les records de débits sur la série de 17 années de référence (Figure 10). Les débits hivernaux de la Loire sont arrivés en 2^{ème} position après l'année 2001, et les débits de la Sèvre, en 4^{ème} position. Globalement, on peut dire que les débits de l'hiver 2014 ont été exceptionnels, proches de ceux rencontrés en 2001.

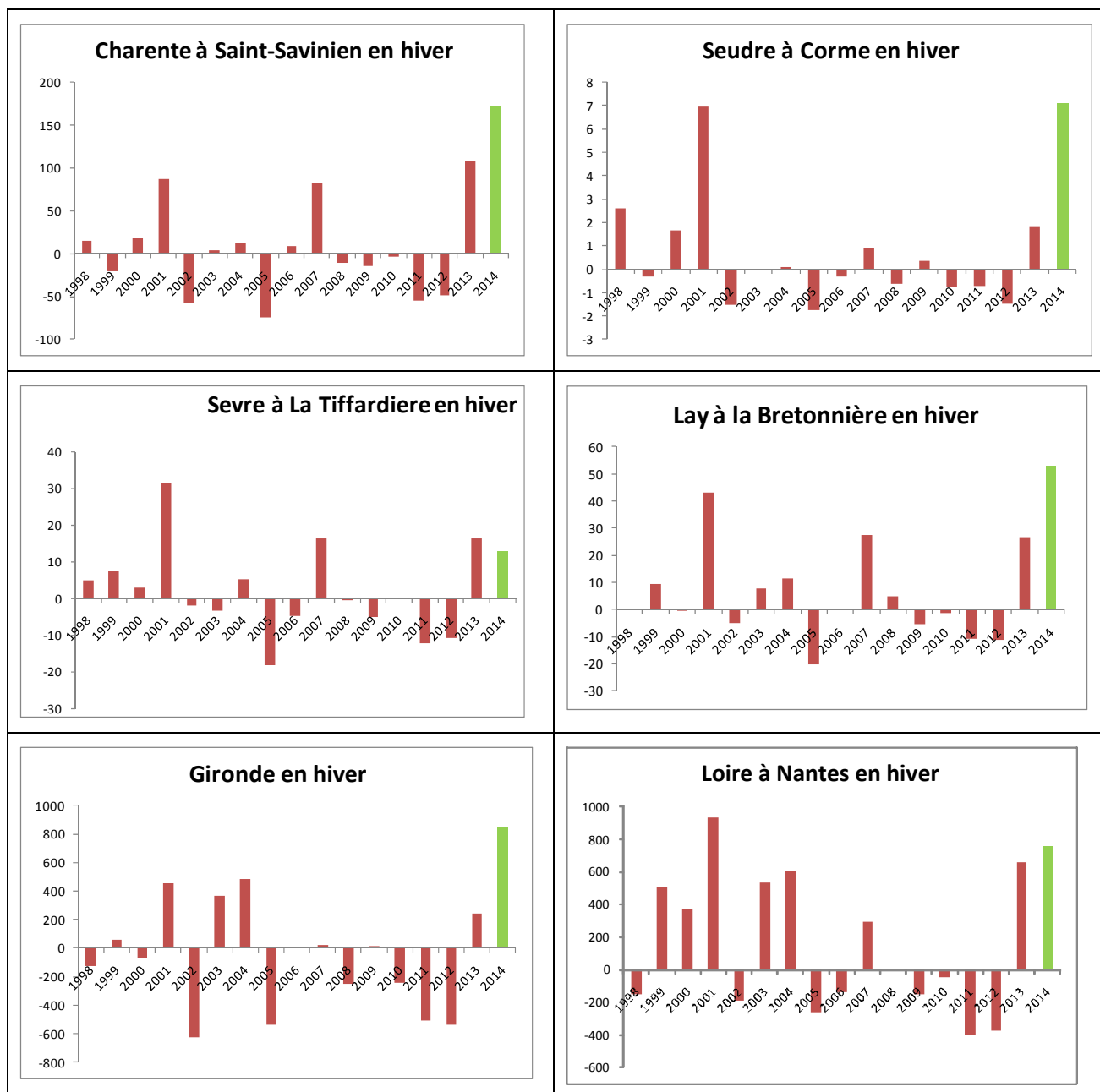


Figure 10. Ecart à la médiane interannuelle des débits moyens hivernaux (m^3/s) des fleuves internes et externes aux Pertuis Charentais entre l'hiver 1998 et l'hiver 2014 (en m^3/s) (données Hydro France).

Les précipitations cumulées, relevées par l'ORE (Observatoire Régional de l'Environnement en Poitou-Charentes) sur les bassins versants du Lay et de la Sèvre niortaise, ont été de 130 à 150 mm/m^2 en février 2014, soit environ le double par rapport à la normale. Cette pluviométrie élevée a pu avoir des conséquences sur le lessivage des sols et des terres agricoles, ainsi que sur le volume des apports en aval.

En automne 2013 (octobre-décembre), les débits moyens des fleuves internes et externes aux Pertuis Charentais ne présentent pas de débits moyens « hors normes ». Par contre, en hiver 2014 les débits sont extrêmement élevés pour la quasi-totalité des fleuves impactant les Pertuis, et proches des conditions rencontrées en 2001.

Les données suivantes de température et salinité sont issues des stations de mesures du réseau REPHY. Celles-ci sont localisées dans (1) le Pertuis Breton, au niveau des points Filière, Carrelère et Eperon et (2) dans le Pertuis d'Antioche au niveau des points Auger, Boyard et Cornard. Seul Auger, dans le sud du bassin de Marennes Oléron ne se trouve pas à proximité d'un site de production de moules (cf. Figure 1.).

Température

La température de l'eau, à l'hiver 2014, est de 1 à 2 °C supérieure à la médiane interannuelle (Figure 11). C'est le site du Cornard, à proximité des filières d'Yves, à l'Est du Pertuis d'Antioche, qui a présenté la plus forte température. En hiver 2014, les conditions de température ont été proches de celles rencontrées en 2007, 2001 et 1994.

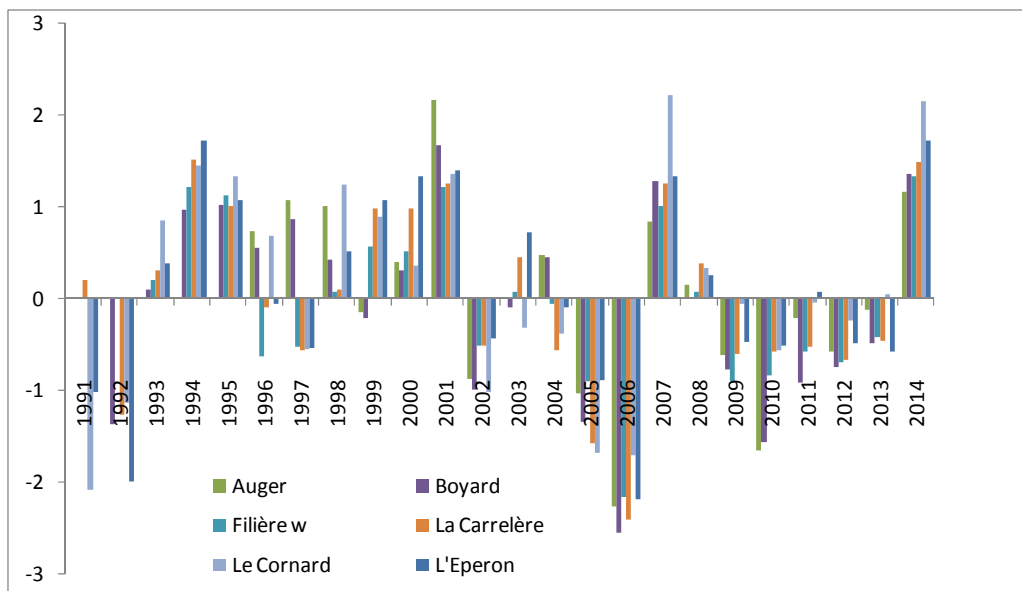


Figure 11. Ecart à la médiane interannuelle des températures hivernales aux six stations REPHY des Pertuis Charentais (source REPHY).

Salinité

En hiver 2014, l'écart à la médiane pluriannuelle a été compris entre 2 et 5 PSU selon les stations (Figure 12). Les sites de L'Eperon (Pertuis Breton) et du Cornard (Pertuis d'Antioche) présentent les écarts les plus importants de salinité, de l'ordre de 4-5 unités PSU, par rapport à la normale saisonnière. La dessalure hivernale a été forte, équivalente à celle des années 1994, 1995, 2007 ; légèrement supérieure à celle de 2013, et inférieure à celle de 2001.

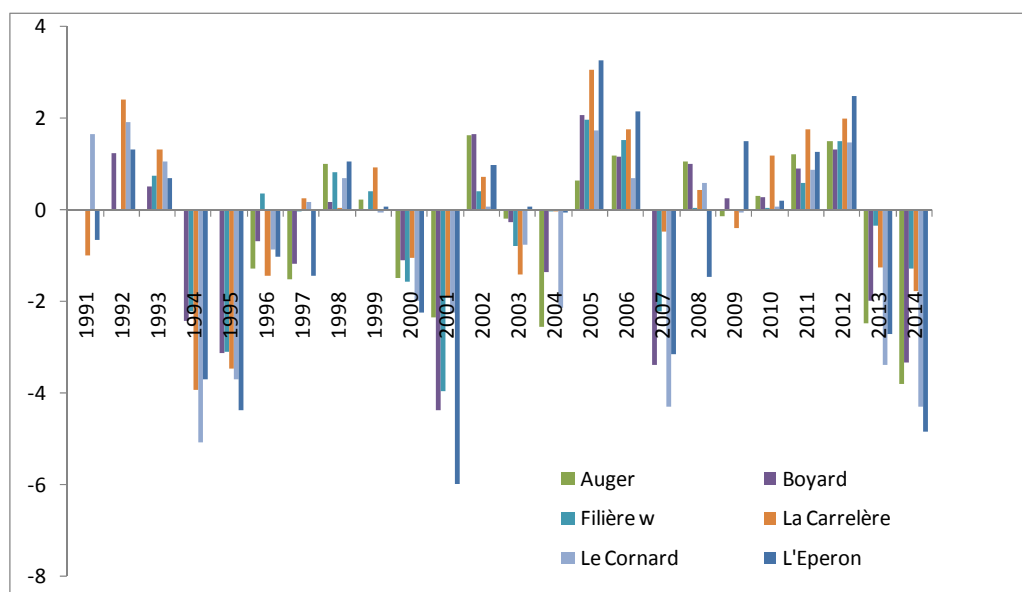


Figure 12. Ecart à la médiane interannuelle de la salinité hivernale aux six stations REPHY des Pertuis Charentais (source REPHY).

Turbidité

En 2014, la turbidité a été bien supérieure à la médiane interannuelle (17 années de référence). Elle se classe parmi les 4-5 années les plus turbides, avec 2007, 2008 et 2009, et 2001 (uniquement au niveau des filières du Pertuis Breton et des bouchots des Roulières) (*Figure 13*).

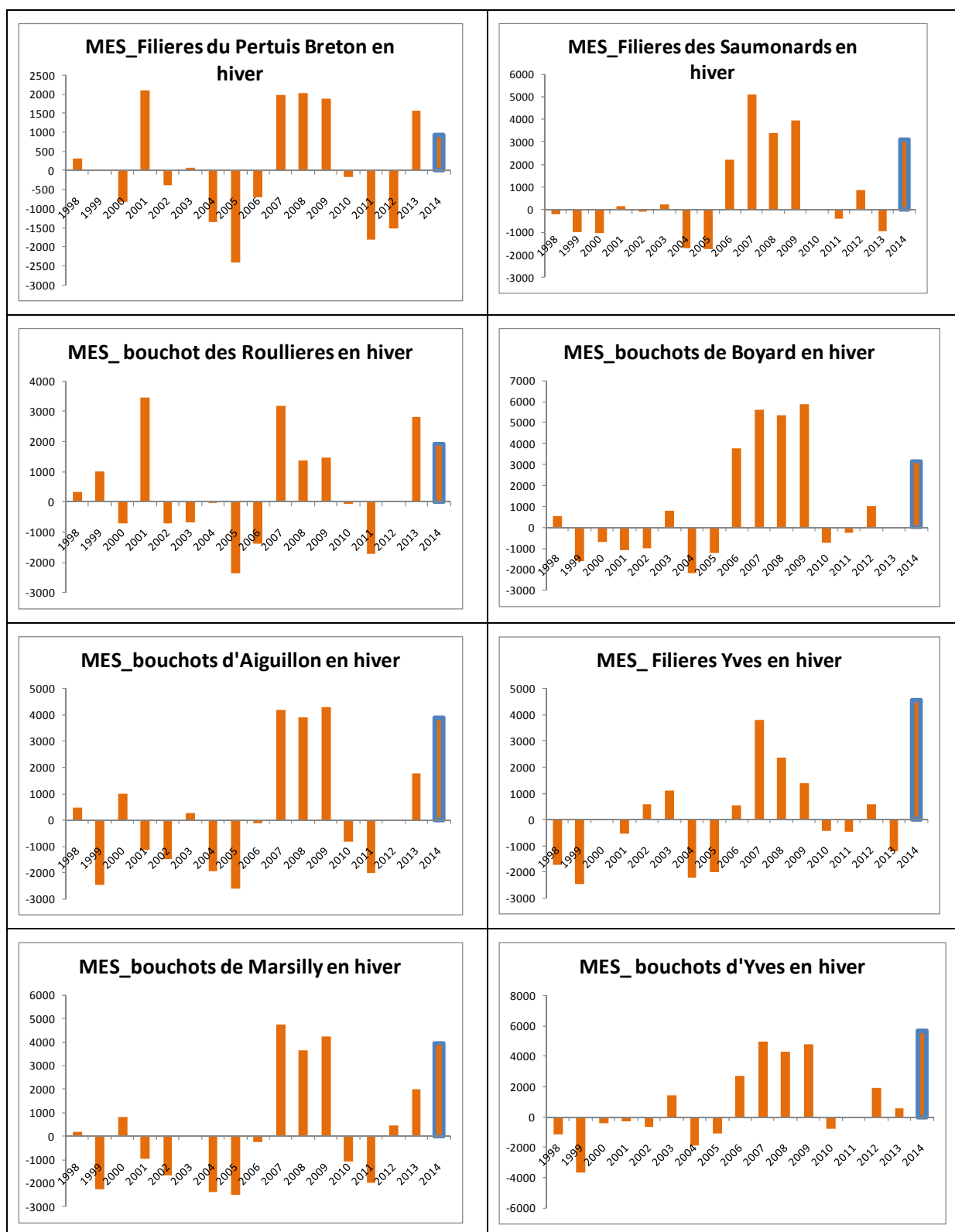


Figure 13. Ecart à la médiane interannuelle (17 ans) de turbidité hivernale (matière en suspension = MES, en mg/m³) sur les sites de production de moules dans les Pertuis Charentais. Données satellitaires extraites au niveau des sites de production (bouées virtuelles) (source : données satellitaires ; Dyneco).

Ressource trophique

➤ Caractérisation de l'hiver 2014 en chlorophylle *a* par rapport aux séries historiques

La ressource trophique, évaluée à partir du traceur chlorophylle *a*, est mesurée d'une part au niveau des stations REPHY (Figure 14.) et d'autre part, spatialisée grâce à l'imagerie satellitaire (Figure 16.). En hiver 2014, la teneur en chlorophylle *a* a été proche de la médiane pour le Pertuis d'Antioche (Auger, Boyard et le Cornard). Elle a été par contre supérieure à la médiane, de 2-3 $\mu\text{g/L}$, pour les sites du Pertuis Breton (Filière, Carrelère et Eperon) (Figures 14. Et 16.). L'hiver 2012 apparaît comme exceptionnel sur la période des 24 dernières années. Les phéopigments, traceurs des apports terrigènes, ont suivi parfaitement la norme des valeurs saisonnières (Figure 15.).

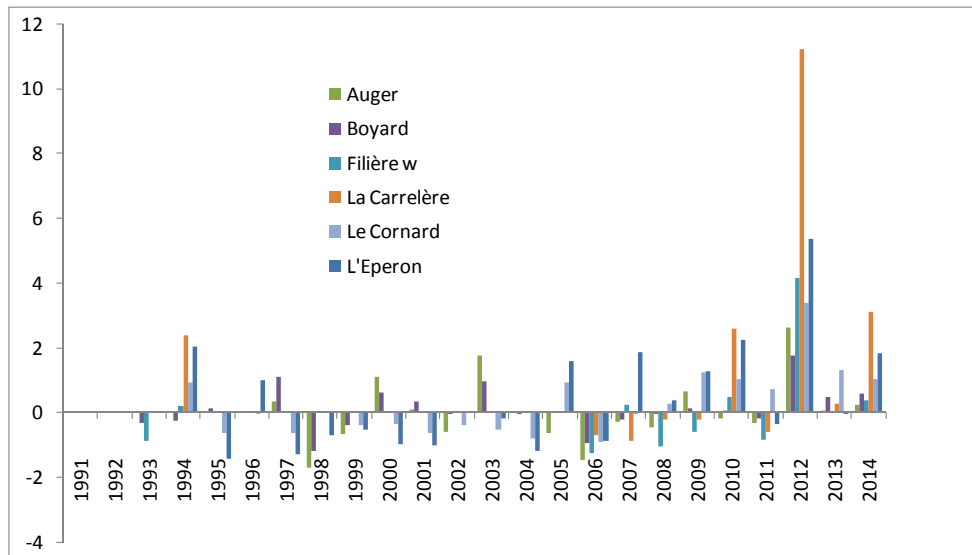


Figure 14. Ecart à la médiane interannuelle des valeurs moyennes hivernales de Chlorophylle *a* ($\mu\text{g/l}$) (source REPHY).

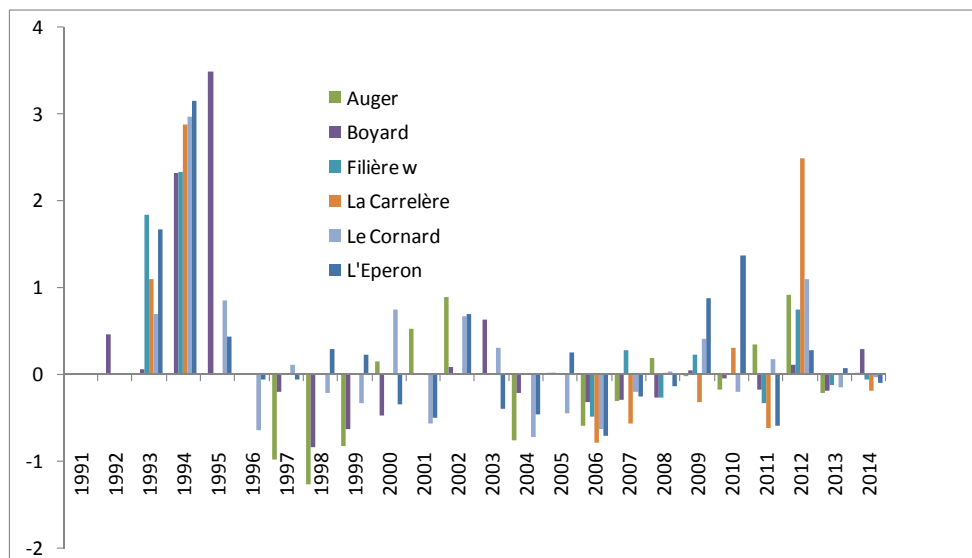


Figure 15. Ecart à la médiane interannuelle des valeurs moyennes hivernales de phéophytine ($\mu\text{g/l}$) (source REPHY).

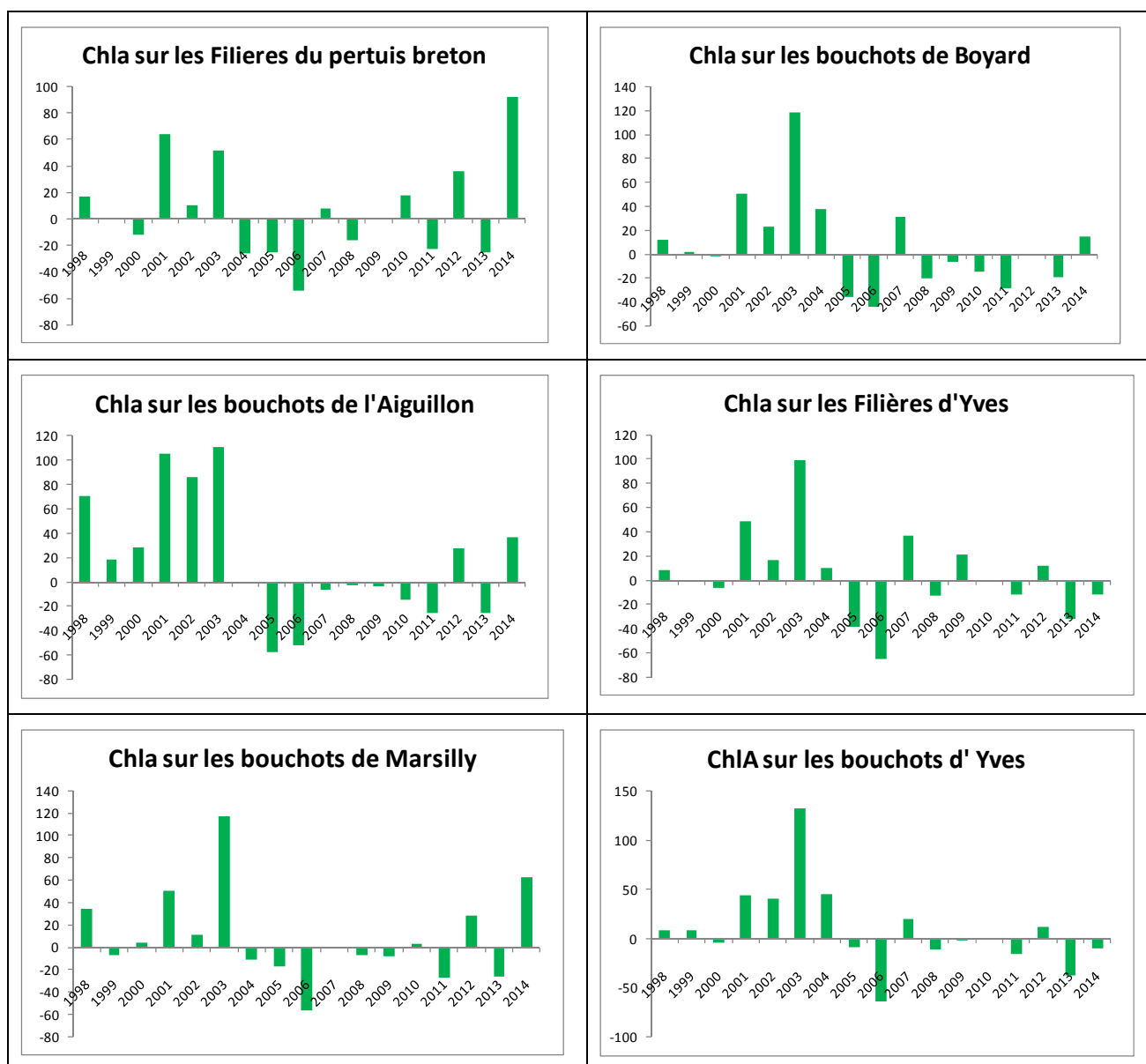


Figure 16. Ecart à la médiane interannuelle (17 ans) d'une estimation de la Chlorophylle a sur les sites de production de moules (bouées virtuelles) (en mg/m³) (source : données satellitaires ; Dyneco).

En hiver 2014, la **température** de l'eau de mer a été supérieure de 1-2 °C par rapport à la médiane interannuelle. Ces températures sont proches de celles rencontrées en 1994, 1995, 2001 et 2007, et caractérisent un hiver « chaud ». La **dessalure** de l'hiver 2014 dans les Pertuis se classe parmi les cinq plus fortes dessalures enregistrées depuis 24 ans (1994, 1995, 2001, 2007, 2014). La **turbidité** a été supérieure à la médiane au niveau de tous les sites de production de moules. Elle est proche de celle rencontrée au cours des hivers 2007, 2008, 2009, et 2001 à l'ouest du Pertuis Breton. La concentration en chlorophylle a a été légèrement supérieure à la médiane dans les Pertuis Charentais au cours de l'hiver 2014. Les phéopigments, traceurs des apports terrigènes, affichent des valeurs proches de la médiane interannuelle (à l'inverse des années 1993, 1994 et 2012).

➤ Les blooms hivernaux de diatomées dans les Pertuis Charentais

L'algue fourrage, *Skeletonema costatum*, principale espèce de diatomées dans les Pertuis Charentais, a été très abondante en mars et en avril 2014 (Figure 17). Elle prédomine largement sur le site de l'Eperon (Pertuis Breton). Des efflorescences à *Skeletonema costatum* sont constatées le 24 mars 2014 dans le Pertuis d'Antioche (moyenne à 1.2 10⁶ cellules/L). Les numérations de blooms sont comprises entre 2.3 et 5.1 10⁶ cellules/L dans le Pertuis Breton, entre le 24 mars et le 7 avril 2014, supérieures à celles du Pertuis d'Antioche (comme au cours des années 2000-2010). Dans le Pertuis Breton, la concentration de *Skeletonema costatum* est passée de 0.13 à 2.38 10⁶ cellules entre le 10 mars et le 24 mars.

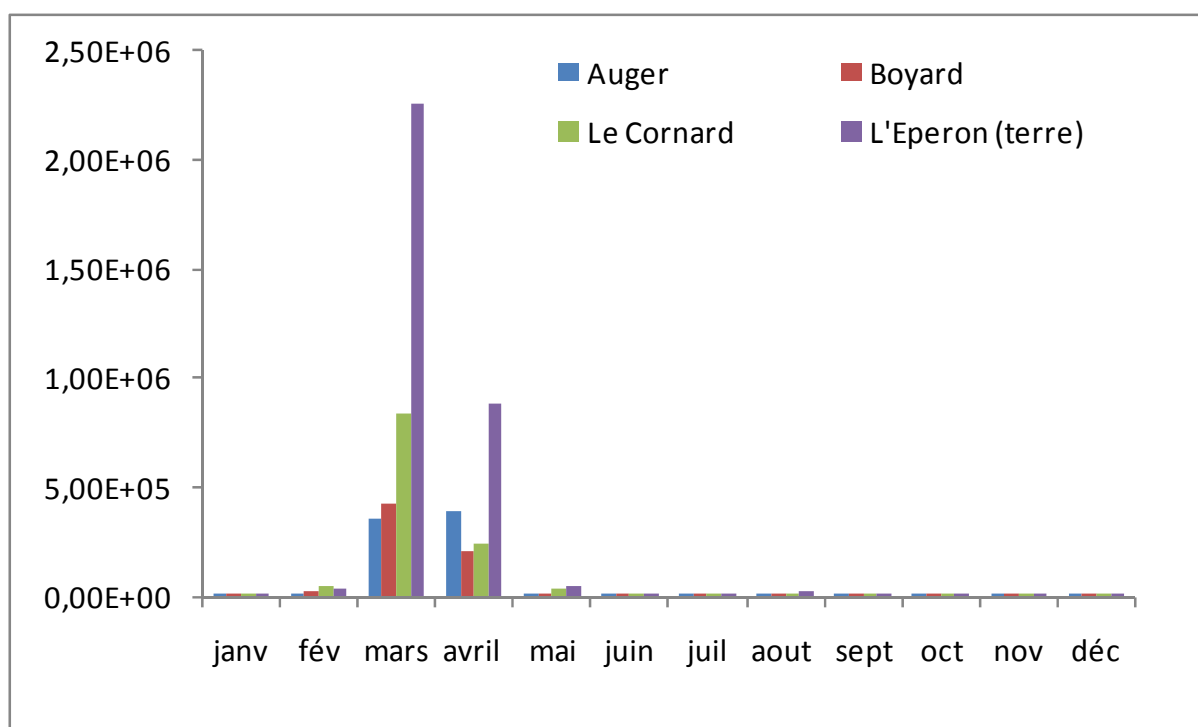


Figure 17. Saisonnalité de présence de la diatomée *Skeletonema costatum* dans les Pertuis Charentais : Auger (Sud du bassin de Marennes), Boyard et Le Cornard (Pertuis d'Antioche) et L'Eperon (Pertuis Breton) entre 2000 et 2010 (en nombre par litre et par prélèvement – 10 à 20 prélèvements selon les mois de l'année) (source REPHY).

En 2014, des blooms de diatomées sont apparus au cours du mois de mars. Ils ont été plus abondants dans le Pertuis Breton que dans le Pertuis d'Antioche. En 2014, le développement des blooms de *Skeletonema costatum* a eu lieu entre le 10 et le 24 mars 2014.

4. Apports de la modélisation hydrodynamique

Estimation de la connectivité des différents secteurs géographiques du Pertuis Breton en lien avec l'évolution spatio-temporelle des surmortalités de moules de l'hiver 2014

Le modèle MARS3D-PC a été développé en raffinement régional du modèle Manche Gascogne (MANGA) fourni par PREVIMER. Son emprise s'étend depuis la baie de Vilaine au Nord jusqu'à la côte espagnole au Sud avec une résolution de 500 mètres. Il a été décidé d'utiliser préférentiellement cette emprise, sa résolution étant supérieure à celle du modèle MANGA (500 versus 2500 mètres). Les différentes simulations sont centrées sur le premier trimestre 2014 (01/01/2014 - 25/04/2014) dans le cadre des surmortalités survenues dans le Pertuis Breton lors de l'hiver 2014. Elles prennent en compte en plus des conditions météorologiques, les apports marins et terrigènes de l'ensemble des grands fleuves (Loire et Gironde) et des fleuves côtiers depuis la Vilaine à l'Adour (Vilaine, Lay, Sèvre Niortaise, Charente, Seudre, Leyre et Adour) en conditions réalistes.

Deux traceurs positionnés au niveau du Pertuis Breton ont été implémentés au modèle MARS3D-PC afin d'estimer la connectivité des différents secteurs géographiques du Pertuis Breton. Ces estimateurs de connectivité ont été libérés au fond au niveau de la fosse de Loix (46°13'18.732" N - 01°23'57.8034" W) et du point Filière (46°16'33.168" N - 01°23'9.5136" W) le jour précédant les premières constatations de mortalités (Figure 2.), i.e. les 04 et 09 mars 2014 respectivement, sur une période de huit jours. Dans le modèle MARS3D-PC, ces deux traceurs ont été paramétrés comme étant conservatifs et dissous. Au moment de leur libération, un flux de 1000 kg m⁻³ s⁻¹ a été fixé pour chacun des traceurs. Cette valeur, choisie de manière arbitraire, a permis d'optimiser la visualisation de leur évolution spatio-temporelle. Leurs caractéristiques (état et nature) ont été quant à elles choisies dans l'optique d'une analyse hydrodynamique sans lien direct avec la biologie, mais permettant bien d'apporter des éléments de compréhension sur le rôle du mouvement de masses d'eau en lien avec les conditions climatiques observées durant cette période de l'hiver 2014.

Evolution spatio-temporelle des surmortalités mise en évidence par le modèle MARS3D-PC

Afin de comprendre d'un point de vue hydrodynamique, l'évolution spatio-temporelle des surmortalités au niveau des différents secteurs mytilicoles du Pertuis Breton, la concentration moyenne par jour et sur la colonne d'eau de chacun des traceurs a été simulée et suivie sur une période de 15 jours dans le Pertuis (Figures 18. et 19.).

Ces simulations montrent que le traceur Loix est, dans un premier temps, relativement confiné dans un secteur Nord proche de sa zone d'émission. Sa concentration reste élevée (entre 0.50 et 15.00 kg m⁻³) jusqu'au 11 mars 2014, c'est à dire sept jours après le début de son émission, ce qui témoigne d'un déplacement faible des masses d'eau (Figure 18.). Le traceur atteint ensuite le 11 mars, le point Filière au Nord avec une gamme de concentration moyenne de 0.08 à 0.53 kg m⁻³ (Figure 18.). Au même moment, les premières mortalités aux niveaux très élevés sont déclarées par les professionnels sur les filières du Pertuis Breton (Figures 2. et 3.). Dans un deuxième temps, à partir du 11 mars 2014, le traceur Loix semble être repoussé vers la partie Est du Pertuis Breton et même évacué en faible quantité vers le Pertuis d'Antioche (côte sud-est de l'île de Ré à partir du 15 mars 2014) par le coureau de La Rochelle (Figure 18.). Enfin, le traceur ne semble pas être entraîné hors du Pertuis Breton par le secteur Nord, Nord-Ouest.

Contrairement au traceur Loix, celui libéré au point Filière est dès les premiers jours, rapidement transporté et dilué par les masses d'eau du Pertuis Breton (Figure 19.). En effet, le 12 mars 2014, soit trois jours après sa libération, il atteint le Nord du Pertuis, en particulier la pointe d'Arçay, avec des concentrations moyennes de 0.13 à 0.49 kg m⁻³ (Figure 19.). Le 16 mars (sept jours après sa libération), le traceur touche l'ensemble des bouchots du Sud Vendée avec des concentrations atteignant 0.80 kg m⁻³. Ceci correspond aux premières mortalités à des niveaux intermédiaires déclarées au niveau de la pointe d'Arçay, le 17 mars 2014 (Figures 2. et 3.). Au contraire, à ce moment les zones de l'Aiguillon et Marsilly plus à l'Est ne sont pas encore touchées par le traceur et ne sont sujettes à aucune déclaration de mortalités (Figures 2. et 19.). A partir du 18 mars, le traceur Filière est évacué du Pertuis Breton vers le Nord-Ouest en longeant les côtes de Vendée. Au même moment, il commence à atteindre les bouchots de l'Aiguillon avant d'envahir complètement ces derniers et ceux de Marsilly autour du 20-22 mars 2014 avec des concentrations plus faibles de 0.08 et 0.23 kg m⁻³ (Figure 19.). Le 22 mars, le traceur sort du Pertuis Breton vers le Pertuis d'Antioche par le coureau de La Rochelle (Figure 19.). Les déclarations de mortalités concernant les bouchots de l'Aiguillon et de Marsilly ont été plus tardives datées du 27 et 28 mars, respectivement et à des niveaux plus bas que ceux notés au niveau des filières et des bouchots du secteur Sud Vendée (Figures 3. et 19.). Enfin, le traceur Filière semble s'étendre majoritairement vers le secteur Nord du Pertuis Breton contrairement au traceur Loix qui semble être cantonné sur la partie Sud du Pertuis Breton (côte Nord de l'île de Ré) (Figures 18. et 19.).

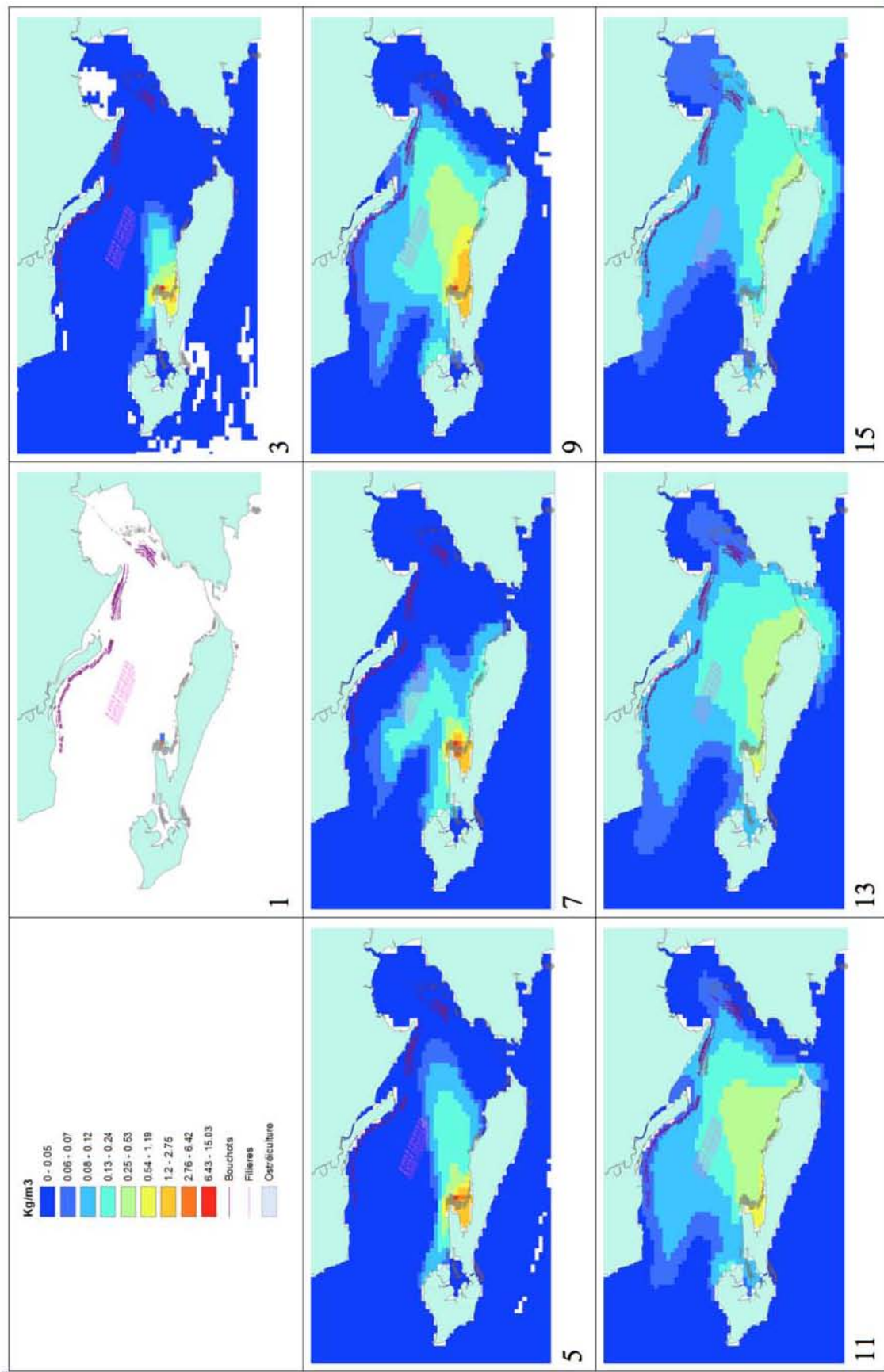


Figure 18. Evolution de la concentration moyenne journalière sur la colonne d'eau du traceur libéré au niveau de la fosse de Loix (46°13'18.732" N - 01°23'57.8034" W) le 04 mars 2014. Les numéros correspondent aux nombres de jours depuis le début de l'émission du traceur.

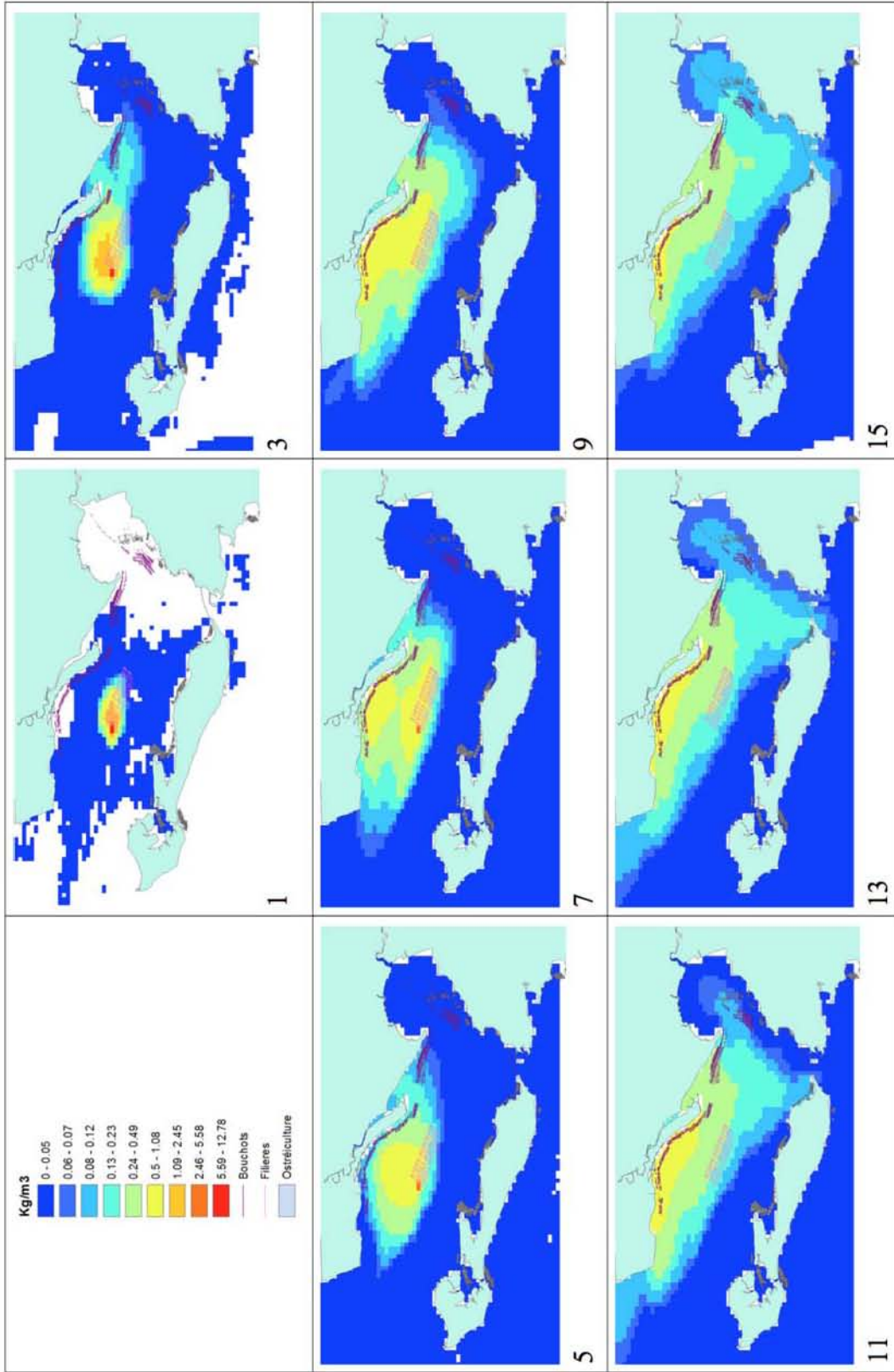


Figure 19. Evolution de la concentration moyenne journalière sur la colonne d'eau du traceur libéré au niveau du point Filière (46°16'33.168" N - 01°23'9.5136" W) le 09 mars 2014. Les numéros correspondent aux nombres de jours depuis le début de l'émission du traceur.

Estimation quantitative des surmortalités par modélisation et analyse des bouées virtuelles

Il s'agit dans un premier temps d'évaluer de manière quantitative la cinétique des deux traceurs calculée aux différentes positions des bouées virtuelles précédemment utilisées. Cela ne concerne que les bouées localisées dans le Pertuis Breton en lien avec les mortalités observées à cette période dans ce secteur uniquement. Dans un deuxième temps, cette cinétique est comparée à l'évolution spatio-temporelle et aux niveaux des surmortalités observées. Ce travail permet de vérifier la cohérence entre les déplacements des traceurs simulés par le modèle et les déclarations de mortalités observées, et de mieux comprendre ainsi le rôle de la dynamique des masses d'eau du Pertuis Breton sur celle des surmortalités de l'hiver 2014. Dans cet objectif, les concentrations moyennées sur la colonne d'eau (Figure 20.) de chacun des deux traceurs ont été calculées.

Les différents calculs montrent que le traceur Loix libéré depuis le 04 mars n'est visible sur les différentes bouées virtuelles du Pertuis Breton (présentées en Figure 1.) qu'en très faibles concentrations jusqu'au 08 mars au soir du flot (0.10 kg m^{-3} , Figures 20.A et 20.C). Cette période correspond en effet aux mortes eaux (faibles coefficients de marée, Figure 20.C), ce qui explique le faible mouvement des masses d'eau observé précédemment (Figure 18.). Les plus fortes concentrations (0.15 kg m^{-3} au maximum) à la bouée Filière sont centrées sur la période du 08-11 mars correspondant aux premières mortalités déclarées sur les Filières du Pertuis Breton. Les mêmes gammes de concentrations faibles apparaissent sur les autres bouées virtuelles jusqu'au 20 mars avant de se stabiliser sur une gamme de concentrations très faible d'environ 0.02 à 0.09 kg m^{-3} (Figure 20.A). Le déplacement du traceur Loix vers la partie Est du pertuis observé précédemment (Figure 18.) semble lié au revif (augmentation des coefficients de marée, Figure 20.C). En fin de revif et début de déchet (16 mars), les concentrations augmentent à la bouée de La Rochelle ce qui est cohérent avec l'évacuation en faible quantité du traceur Loix, simulée et décrite précédemment (Figure 18.).

La libération du traceur Filière le 09 mars, i.e. un jour avant la déclaration des mortalités sur ce point, entraîne une augmentation rapide des concentrations le 10 mars avec 0.81 kg m^{-3} , ces dernières atteignant plus 1.40 kg m^{-3} le 12 et 13 mars 2014 (Figure 20.B). L'amplitude des variations de concentrations observées ($1.45 - 0.35 \text{ kg m}^{-3}$ le 13 mars par exemple, Figure 20.B) pendant cette période à la bouée Filière semble être liée à l'alternance des apports océaniques durant le revif (+1.6 - -2.6 mètres, marnage supérieur à 4 mètres le 13 mars, Figure 20.B). Les concentrations maximales atteintes sur la bouée Filière sont dues à la proximité du point de libération du traceur. Les concentrations les plus importantes sont ensuite calculées à la bouée des Roulières avec 0.65 kg m^{-3} le 16 mars (Figure 20.B). Ces maximums de concentrations observés un jour avant les mortalités déclarées à la pointe d'Arcay (Figure 2.) sont cohérents avec l'évolution spatiale du traceur Filière décrit précédemment en ce point (Figure 19.). Les concentrations aux Roulières se stabilisent ensuite autour de 0.60 kg m^{-3} pendant la période de déchet jusqu'au 22 mars (Figure 20.B). Les maximums de concentrations apparaissent ensuite le 18 mars 2014 sur les bouées de l'Aiguillon puis de Marsilly à des concentrations trois fois plus faibles qu'à la bouée Filière (Figure 20.B). Ce facteur est cohérent avec les mortalités déclarées à hauteur de 34 % dans ce secteur (Figure 3.) On peut aussi noter qu'il existe un facteur 10 environ entre les concentrations calculées aux bouées Roulières, Aiguillon et Marsilly avec le traceur Filière par rapport à celles calculées avec le traceur Loix (Figures 20.A et B) avec le même flux initial. Ceci traduit une connectivité hydrodynamique plus importante entre les Filières et tous les autres sites mytilicoles du Pertuis Breton. Enfin, contrairement au traceur Loix, des concentrations minimales persistent sur la bouée de La Rochelle (Figure 20.B). Ceci confirme l'observation précédente montrant une évacuation faible vers le pertuis d'Antioche et plus importante vers le Nord des côtes vendéennes (Figures 18. et 19.).

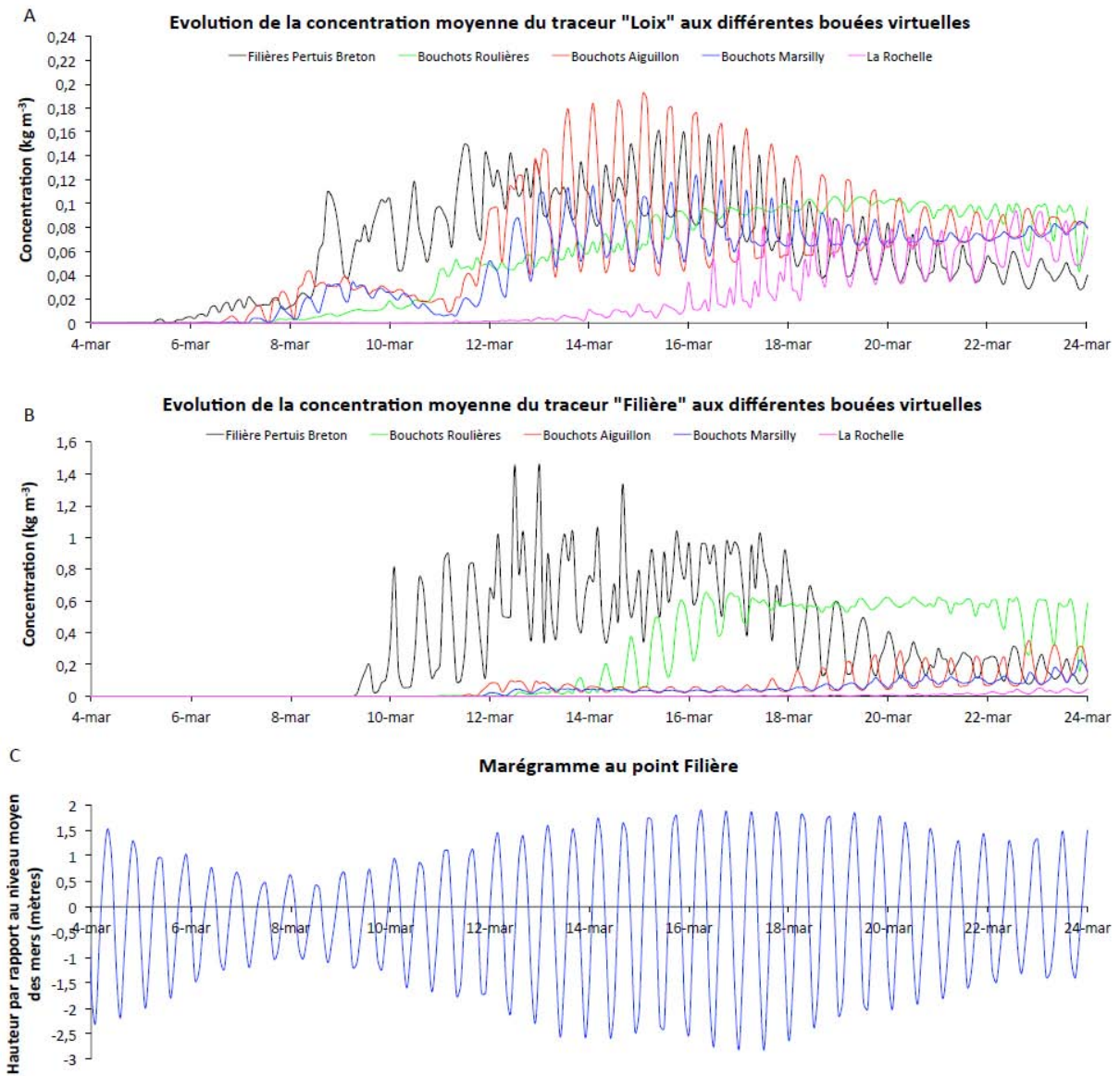


Figure 20. Evolution de la concentration moyenne sur la colonne d'eau des deux traceurs aux différentes bouées virtuelles du Pertuis Breton ; (A) traceur libéré au niveau de la fosse de Loix ($46^{\circ}13'18.732''\text{ N} - 01^{\circ}23'57.8034''\text{ W}$) le 04 mars 2014 ; (B) traceur libéré au point Filière ($46^{\circ}16'33.168''\text{ N} - 01^{\circ}23'9.5136''\text{ W}$) le 09 mars 2014 ; (C) marégramme calculé au point Filière. Une bouée virtuelle supplémentaire au niveau de La Rochelle ($46^{\circ}07'26\text{ N} - 01^{\circ}14'56\text{ W}$) a été ajoutée afin d'évaluer l'évacuation du traceur vers le Pertuis d'Antioche au Sud. Le pas de temps est d'une valeur toutes les deux heures.

AXE 2 : Caractérisation pathologique des moules des zones d'élevage de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais

5. Bilan des analyses de recherche d'agents infectieux réalisées dans le cadre de saisines Repamo

Dans le contexte des épisodes de mortalité massive observés chez les moules en 2014, l'Ifremer a reçu 9 lots différents pour analyses en pathologie du secteur des Pertuis Charentais dans le cadre de saisines Repamo :

Mars

- Lot 2014FRL015 - 32% de mortalité estimée - 17/03/2014 - Pertuis Breton (ZIR 76)
- Lot 2014FRL020 - 20% de mortalité estimée - 19/03/2014 - Pertuis d'Antioche (ZIR 79)
- Lot 2014FRL018 - 26% de mortalité estimée - 20/03/2014 - Pertuis Breton (ZIR 76)
- Lot 2014FRL025 - 16% de mortalité estimée - 28/03/2014 - Pertuis Breton (ZIR 76)
- Lot 2014FRL026 - 20% de mortalité estimée - 28/03/2014 - Baie de l'Aiguillon (ZIR 77)

Mai

- Lot 2014FRL 045 - 10 % de mortalité estimée - 09/05/2014 - Pertuis d'Antioche (ZIR 79)
- Lot 2014FRL 052 - 32% de mortalité estimée - 15/05/2014 - Pertuis d'Antioche (ZIR 79)
- Lot 2014FRL 053 - <15% de mortalité estimée - 20/05/2014 - Vendée Nord (ZIR 72)
- Lot 2014FRL 056 - <15% de mortalité estimée - 20/05/2014 - Vendée Nord (ZIR 72)

Deux types d'analyses ont été mis en œuvre par le LGPMM (Ifremer, La Tremblade) sur ces échantillons pour rechercher des agents pathogènes. D'une part, des analyses moléculaires en PCR en temps réel ont été réalisées en ciblant trois agents infectieux : le virus OsHV-1 (analyses de 15 individus par lot) et les bactéries de l'espèce *Vibrio aestuarianus* et du groupe *Splendidus*. Pour la détection des bactéries, une étape préalable de culture sur milieu « *Marine agar* » a été mise en œuvre (à partir de cinq individus pour chacun des lots). Les souches bactériennes majoritaires isolées en culture ont fait l'objet d'une identification par PCR en temps réel. D'autre part, des analyses en histologie ont également été effectuées pour une recherche non ciblée d'agents infectieux, tout particulièrement les parasites protozoaires.

Le premier type d'analyse a montré l'absence de détection d'ADN du virus OsHV-1 et de la bactérie *V. aestuarianus* pour les 11 lots. **Des isolats bactériens identifiés comme appartenant au groupe *Splendidus* ont été détectés dans l'ensemble des échantillons analysés par PCR en temps réel.** Cette dernière approche analytique ne permet que de vérifier qu'un isolat appartient ou non au groupe *Splendidus* (ce groupe intégrant à ce jour 13 espèces différentes). Des approches méthodologiques complémentaires (séquençage, génotypage, ...) sont donc nécessaires pour une identification plus précise. Elles ont pu être mises en œuvre dans la mesure où des isolements bactériens ont été réalisés et conservés (59 isolats bactériens, cf. infra).

Sur l'ensemble des animaux, les analyses en histologie n'ont pas permis de détecter d'agents pathogènes inconnus observables grâce à cette technique. Cependant, différents types de lésions non spécifiques (nécrose, infiltration hémocytaire, ...) ont été observés attestant du mauvais état physiologique des animaux moribonds et des mortalités en cours.

6. Essais d'induction de mortalité chez les moules

Les travaux menés en pathologie à l'Ifremer ont pour objectifs principaux la détection d'organismes pathogènes et l'étude de leur implication dans les mortalités observées. Ces travaux ont intégré des essais d'induction de mortalité afin de vérifier si le phénomène observé sur le terrain pouvait être reproduit en conditions expérimentales et donc transmis à des animaux sains.

Ces essais ont été réalisés en utilisant des moules prélevées dans le Pertuis Breton (pointe de la Roche) le 18 avril et présentant des mortalités. Ils ont consisté en l'injection à des moules saines (ne montrant pas de mortalité au moment de la réalisation de l'expérience) de broyats de tissus préparés à partir des animaux prélevés sur le terrain. Cette approche méthodologique avait pour objectif, en induisant des mortalités chez des individus sains, de mettre en évidence **la présence d'un agent pathogène** (produit toxique, toxine ou organisme pathogène) chez les animaux présentant des mortalités sur le terrain.

Les moules prélevées dans le pertuis Breton (18 avril 2014) ont servi à préparer un broyat de tissus (branchies, manteau) qui a été traité par filtration (8 μm et 0,22 μm). Ce broyat, après filtration, a été injecté à des moules saines provenant des installations du LGPMM (Ifremer, La Tremblade). Une mortalité de 100% a été observée 24 heures après injection chez les animaux ayant reçu le broyat filtré à 8 μm et aucune mortalité n'a été relevée après injection du broyat traité à 0,22 μm .

L'expérience a été répétée en utilisant les animaux morts après injection lors du premier essai pour préparer le broyat et des résultats identiques ont été obtenus (mortalité totale des animaux injectés pour le broyat filtré 8 μm et aucune mortalité pour le broyat traité à 0,22 μm).

Les résultats obtenus indiquent qu'il a été possible de **transmettre par injection un élément capable d'induire des mortalités massives et rapides chez des moules saines**. Cet élément n'apparaît pas être une substance toxique/toxine dans la mesure où il n'a pas été observé un effet de dilution (résultats identiques obtenus dans les deux essais successifs), ni un organisme dont la taille est inférieure à 0,22 μm (virus). **Les résultats obtenus suggèrent plutôt l'implication d'une ou de plusieurs bactéries.**

Il est important de noter que des huîtres creuses saines ont également été injectées avec les broyats préparés à partir des moules moribonds au cours des deux essais.

Aucune mortalité n'a été observée chez les huîtres. Ce résultat pourrait s'expliquer par une sensibilité différente des huîtres et des moules à un ou des agents infectieux.

Cependant, il est important de préciser que ces essais sont préliminaires et demanderaient à être répétés pour confirmer les résultats obtenus.

7. Diversité des isolats bactériens du groupe *Splendidus* collectés pendant et hors période de mortalités de moules depuis 2010

Les bactéries cultivables majoritairement (isolats) présentes dans les tissus des animaux moribonds analysés en 2014 et identifiées comme appartenant au groupe *Splendidus* ainsi que les isolats bactériens identifiés comme appartenant à ce même groupe disponibles dans la collection du LGPMM (isolés de moules depuis 2010 dans le cadre de saisines Repamo), ont fait l'objet d'une première caractérisation via le séquençage d'un gène de ménage (*gyraseB*). Ces analyses ont permis d'apporter des premiers éléments de réponse quant à la diversité de ces isolats (appartenance à une ou plusieurs des 13 espèces du groupe *Splendidus*).

Ainsi, 144 isolats bactériens identifiés comme appartenant au groupe *Splendidus* issus de 24 lots prélevés entre 2010 et 2014, en Bretagne, Vendée, Charente-Maritime et Normandie ont été étudiés. Ces isolats ont été collectés

- (a) lors de prélèvements réalisés suite à des hausses de mortalité de moules signalées (saisines Repamo) en 2010, 2012, 2013 et 2014 (94 isolats dont 59 prélevés en 2014, 19 lots) ;
- (b) au cours d'un projet de recherche financé par la Commission Européenne (Bivalife coordonné par l'Iframer) sur un site de Charente Maritime hors épisodes de mortalité (2011-2012, 50 isolats, 5 lots) (Figure 1).

Suite à des extractions d'ADN total pour l'ensemble de ces souches (144), 130 séquences du gène *gyrB* et 85 séquences de gène *hsp60* ont été obtenues, alignées, et comparées entre elles et avec des séquences de référence.

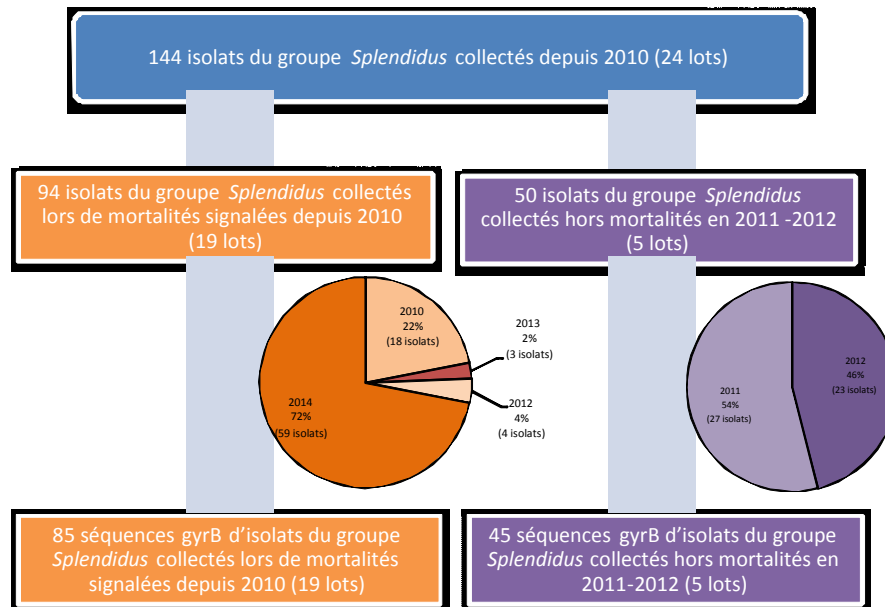


Figure 1. Répartition des isolats du groupe *Splendidus* analysés dans cette étude

Isolats bactériens appartenant au groupe Splendidus prélevés au cours d'épisodes de mortalité

L'analyse des 85 séquences partielles obtenues pour le gène *gyrB* des isolats prélevés au cours d'épisodes de mortalité de moules a permis de mettre en évidence 8 ensembles phylogénétiques supposés correspondant à 6 des 13 espèces du groupe décrites à l'heure actuelle (Figure 2).

Un ensemble regroupant la majorité des isolats (58 sur les 85 isolats) a pu être identifié. Ce groupe contient **la souche type de *V. splendidus*** ainsi que des isolats prélevés en 2014, 2013 et 2010. Ainsi, 100% des lots collectés en 2014 (11 lots), 100% des lots collectés en 2010 (6 lots), ainsi que le lot collecté en 2013 lors d'épisodes de mortalités de moule contiennent des isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus*. Un second ensemble contenant la souche type de *V. atlanticus* regroupe 7 isolats (6 isolats de 2014 et 1 de 2012). Ainsi, 36% des lots collectés en 2014 lors d'épisodes de mortalités de moules sont donc identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus*. Un second ensemble contenant la souche type de *V. atlanticus* regroupe 7 isolats (6 isolats de 2014 et 1 de 2012). Ainsi, 36% des lots collectés en 2014 lors d'épisodes de mortalités de moules sont donc identifiés comme appartenant à l'espèce *V. atlanticus*. Enfin, des séquences d'isolats proches de celles des souches type de *V. lentus*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. artaborum*, ou sans séquence type à proximité ont également été obtenues.

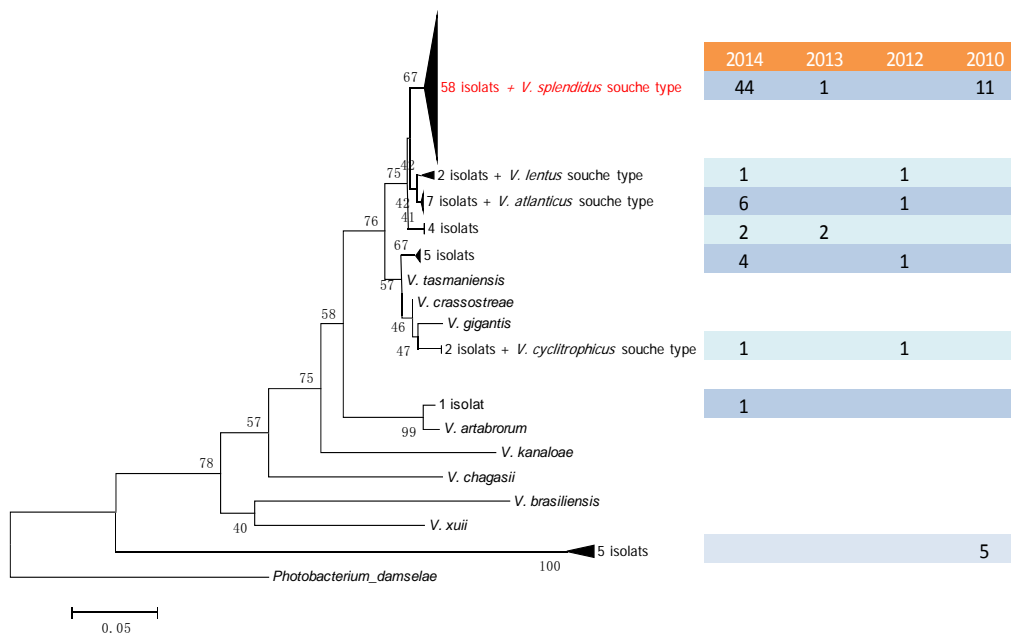


Figure 2. **A.** Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène *gyrB* (Muscle, ML, b1000, Mega6, 504 positions). Isolats prélevés au cours des épisodes de mortalités de moules analysés par le réseau Repamo. **B.** Année d'isolement des isolats bactériens analysés

Isolats bactériens appartenant au groupe *Splendidus* prélevés hors d'épisodes de mortalité

A partir des 50 isolats collectés hors mortalité sur des moules sauvages au cours du projet de recherche Bivalife, 45 séquences partielles du gène *gyrB* ont été obtenues et comparées aux séquences de référence (souches type définissant les espèces du groupe *Splendidus*). Ces différentes séquences se répartissent à proximité de différentes espèces: *V. splendidus*, *V. lentus/V. atlanticus*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus/V. gigantis*, *V. artaborum*, *V. kanaloae*. (Figure 3).

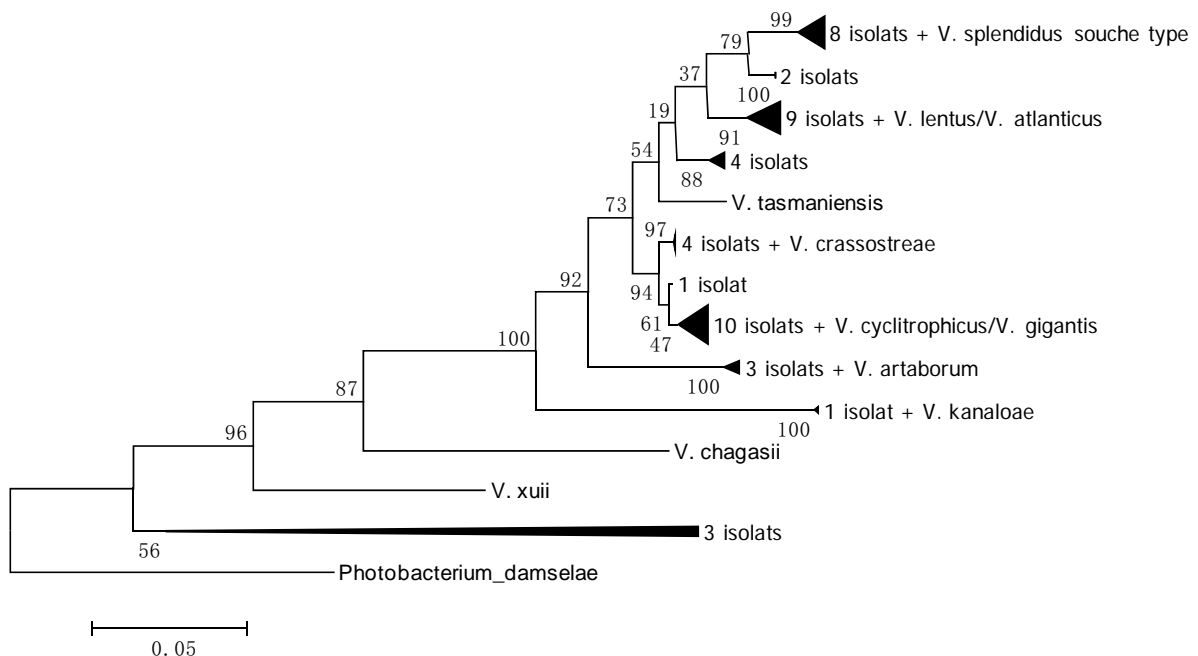


Figure 3. Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène *gyrB* (Muscle, ML, b1000, Mega6, 413 positions). Isolats prélevés hors mortalités de moules

En conclusion, l'analyse des séquences des isolats prélevés au cours des épisodes de mortalité de moules depuis 2010 met en évidence une représentation non négligeable d'isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* : 68% des isolats du groupe *Splendidus* prélevés au cours d'épisodes de mortalité (2010-2014) appartiennent à l'espèce *V. splendidus* (58 isolats / 85 isolats analysés) (Figure 4). Il est important de rappeler que l'espèce *V. splendidus* est elle-même composée de différentes sous-populations. L'affiliation au rang d'espèce n'apporte qu'une information parcellaire pour appréhender la diversité des souches, et des travaux récents mettent en évidence la nécessité de définir des populations écologiques plutôt que des espèces.

Il est important de noter que des bactéries appartenant à cette même espèce peuvent également être isolées sur des animaux sains hors mortalité, mais en moindre proportion : 18 % des isolats prélevés appartiennent à l'espèce *V. splendidus* (8 isolats / 45 isolats analysés) (Figure 4).

Afin de mieux appréhender la diversité des souches de cette espèce (pendant/hors mortalité ; 2010/2014), il paraît important de poursuivre cette étude en analysant des séquences plus discriminantes (hsp60) ou en typant ces bactéries par des techniques comme la recherche de Variable Number Tandem Repeat (VNTR).

L'analyse des 60 séquences du gène hsp60 pour les isolats prélevés au cours d'épisode de mortalités de moules révèle une flore très diversifiée. Cependant, 35% des isolats prélevés en 2014 sont identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* et peuvent être regroupés dans un même ensemble défini comme une famille au sein de cette espèce.

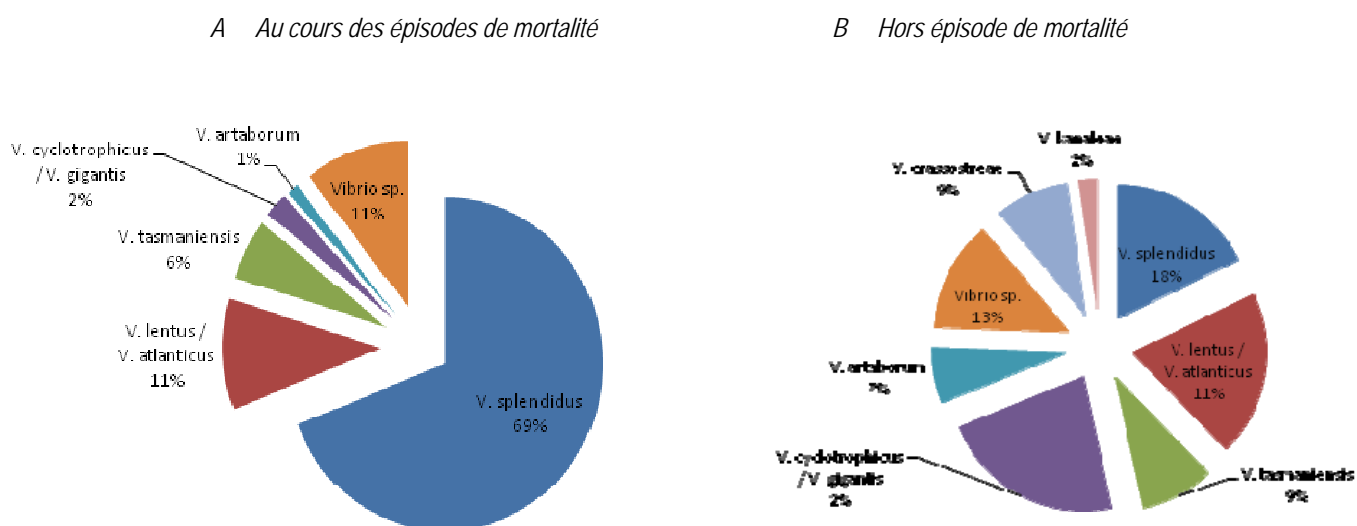


Figure 4. Répartition des isolats issus des lots prélevés au cours des épisodes de mortalité de moules analysés depuis 2010 (A), ou hors mortalité (B), au sein des différentes espèces du groupe *Splendidus*.

Les approches d'identification moléculaire d'isolats bactériens ne sont cependant pas suffisantes pour démontrer l'implication de bactéries dans des épisodes de mortalités. Ces approches permettent de mettre en évidence la présence de populations bactériennes particulières, sans pouvoir préciser si elles peuvent être les causes ou les conséquences des mortalités observées.

Des essais de pathologie expérimentale sont nécessaires pour préciser la virulence des isolats bactériens identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* collectées depuis 2010 lors d'épisodes de mortalité de moules. Une telle approche devrait permettre de déterminer des espèces à risque au sein du groupe *Splendidus*, et pourraient apporter des éléments complémentaires dans la compréhension des événements de mortalité de moules observés en 2014. Ces essais de pathologie expérimentale doivent aussi être accompagnés de travaux en épidémiologie afin de compléter l'approche et de tenter de définir un lien de causalité entre la présence de certaines bactéries et des phénomènes de mortalité massive. Enfin, il apparaît également nécessaire de se pencher sur les interactions entre environnement et communautés microbiennes afin de mieux appréhender les phénomènes qui peuvent conduire à l'émergence de certains agents pathogènes.

AXE 3 : Caractérisation physiologique des zones d'élevage de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais

8. Matériel et méthode

Plan d'échantillonnage

Tableau 1. Caractéristiques des prélèvements de moules réalisés au printemps 2014 dans les Pertuis. Chaque échantillon est constitué de 5 individus. Abréviations : TAG : triglycérides, AG : acides gras, CS : Citrate Synthase.

Pertuis	Date	Structure	Station	Mortalité (%)	N° site	Nb échantillons analysés	
						Sucre, TAG, AG	CS et métabolisme
Antioche	24/04/2014	Bouchot	Yves	0	1	5	
Antioche	24/04/2014	Bouchot	Pied Aix	<10%	2	5	
Antioche	24/04/2014	Bouchot	Tête Aix	<10%	3	5	3
Antioche	24/04/2014	Filière	Suspente Yves	0	4	5	
Antioche	24/04/2014	Filière	Traverse Yves	0	5	5	3
Antioche	22/04/2014	Filière	Saumonard	0	6	5	3
Breton	22/04/2014	Sauvage	Bas estran Rivedoux (Sud île de Ré)	0	7	5	
Breton	22/04/2014	Sauvage	Haut estran Rivedoux (Sud île de Ré)	0	8	5	3
Antioche	22/04/2014	Sauvage	Boyard	0	9	5	
Breton	22/04/2014	Bouchot	Pied Passe d'Eslandes	20	10	5	
Breton	22/04/2014	Bouchot	Tête Passe d'Eslandes	20	11	4	3
Breton	22/04/2014	Bouchot	Passe Pelle	20	12	4	3
Breton	22/04/2014	Bouchot	Pied La carrelère	20	13	5	
Breton	22/04/2014	Bouchot	Tête La carrelère	20	14	4	3
Breton	22/04/2014	Filière	Entrée du Pertuis	90	15	5	3

Les échantillons de moules ont été prélevés par l'équipe du Laboratoire Environnement Ressource des Pertuis-Charentais (LER-PC) de l'Ifremer sur 10 sites plus ou moins impactés par les mortalités le 22 et le 24 avril 2014 (n=75 pools de 5 individus collectés, [Tableau 1](#)). Ces échantillons ont été conservés à -20°C puis transférés sur glace le 12 mai 2014 au centre Ifremer de Bretagne à Plouzané. Tous les échantillons ont été réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à bille sous azote liquide. Ces poudres ont été divisées en sous échantillons pour l'analyse de l'état énergétique (sucres, triglycérides [TAG] et activité de l'enzyme Citrate Synthase [CS]), de l'état nutritionnel (composition en acides gras des lipides de réserves) et de l'état métabolique au sens large (approche métabolomique).

Analyse énergétique

Les sucres et les triglycérides (une classe des lipides neutres) sont les réserves énergétiques principales des mollusques bivalves. Ces variables sont donc des indicateurs de l'état énergétique des moules. Notre hypothèse est que les mortalités succèdent à un affaiblissement énergétique tel qu'observé chez les huîtres exposées à OshV-1.

Sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés selon la méthode de Dubois (1956). Un échantillon de poudre (100 mg) est dilué dans 2 mL d'eau MilliQ. L'échantillon est dilué d'un facteur 10. 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 40 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 : $DO = DO_{490} - 1.5 \times (DO_{600} - 0.003)$. La concentration en sucre est par la suite calculée à partir d'une gamme étalon et exprimée en % de la masse sèche de tissu.

Classes de lipides

Un échantillon de poudre (~100 mg) est dilué dans 3 mL de mélange de Folch (chloroforme/méthanol 2:1 v/v) stocké à -20°C dans des tubes en verre de 6 mL munis de bouchons à vis, à joint en téflon, sous atmosphère d'azote. Les lipides sont déposés sur plaque de silice activée à l'aide d'un passeur automatique d'échantillons, et les classes de lipides sont séparées en immergeant la base des plaques dans un système de solvant de polarité croissante. Les classes de lipides apparaissent en tâches noires après avoir immergé les plaques dans une solution de $CuSO_4 \cdot H_3PO_4$ et chauffé. Les plaques sont scannées à 370 nm et les tâches noires sont quantifiées à l'aide du logiciel Wincats (CAMAG, Suisse). Dans le cadre de cette étude, nous présenterons le rapport de triglycéride / cholestérol (TAG/ST) qui est un indicateur du niveau de réserves lipidiques pondéré par un proxy de la quantité de tissu structure.

Activités enzymatiques

Les protéines ont été extraites tel que décrit dans Corporeau et al. (2011). Nous avons suivi l'activité de l'enzyme citrate synthase (CS), une enzyme clé du métabolisme énergétique impliquée dans la production d'énergie. L'activité de la CS varie en fonction de l'état physiologique et reproducteur des mollusques (Garcia-Esquivel et al. 2002, Moran & Manahan 2004). Une étude récente montre que l'activité de la CS chez les larves d'huître *C. virginica* diminue avant un épisode de mortalité traduisant une baisse de la production d'énergie (Genard et al. 2013).

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

La CS transfère le groupe acyl de l'acétyl coenzyme A à l'oxaloacetate formant le citrate. Le protocole de cette réaction est basé sur la réaction du DTNB ou 5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) avec le groupe -SH du coenzyme A libre (Childress & Somero 1979). Le NTB ou 2-nitro (acide 5-thiobenzoïque) produit est de couleur jaune et absorbe à 412 nm. L'activité de la CS est déterminée dans 100 mM de tampon Tris/HCl (pH 8 à 25°C) contenant 0.2 mM d'acétyl co-enzyme A et 0.1 mM de DTNB. La réaction s'effectue avec 20 µl d'échantillon auxquels on ajoute 20 µl d'oxaloacétate 500µM et 160 µl de milieu réactionnel.

Analyse de l'état nutritionnel (acides gras)

La composition en acides gras des lipides de réserves permet d'identifier le type de proies ingérées par l'animal, compte tenu que ces molécules sont peu modifiées lors de la fabrication de réserve et qu'elles sont caractéristiques de la source alimentaire (bactérien, groupes phytoplanctoniques, détritiques) (Delaunay et al. 1993, Dalsgaard et al. 2003). Par conséquent, la composition en acides gras des lipides neutres dans les moules pourrait révéler des informations intéressantes quant aux sources de nourriture disponibles. Nous suivrons donc l'évolution de plusieurs signatures acides gras typiques de diatomées, dinoflagellés, bactéries et matière terrigène dans les lipides de réserve des moules afin d'identifier les sources principales de nourriture. Dans le cadre de cette étude, nous allons présenter des indicateurs trophiques connus (Kelly & Scheibling 2012):

- le rapport 16 :1n-7/16:0, qui reflète la contribution des diatomées,
- la somme 18:2n-6+18:3n-3, qui est corrélé avec les apports de matière organique d'origine terrigène,
- le rapport 22:6n-3/20:5n-3, qui est indicateur de la contribution des dinoflagellés,
- le rapport 18:1n-9/18:1n-7, qui est souvent associé à de la matière organique d'origine animale (indice de « carnivorie »),
- la somme des acides gras ramifié (*i, ai*), 15:0 et 17:0, indicateur de la contribution des bactéries.

Extraction des lipides neutres (réserves)

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

Méthode de transesterification

L'extrait est mélangé dans 1 mL de BF₃-MeOH (10%) puis chauffée 10 min à 100°C tel que décrit dans Metcalfe et Schmitz (1961). Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits et analysés selon la méthode développée par Marty et al. (1992). Les EMAG sont analysés par chromatographie en phase gazeuse par injection directe dans une colonne capillaire de type DB-wax (30 m×0.25 mm×0.25 µm) et ionisation de flamme.

8.3 Analyse métabolomique

Enfin, l'ensemble des métabolites de petites tailles ont été extraits et analysé sur la plate-forme Metabomer (Station Biologique de Roscoff, CNRS-UPMC). L'analyse porte sur 30mg de poudre de moules auxquels sont ajoutés 5µg d'acide 12-OH-laurique et de 5µg d'atropine (étalons internes), 1 ml de chloroforme/méthanol/eau (4/6/1, v:v:v) avant extraction 30 min à 4°C sur agitateur rotatif. L'échantillon est par la suite centrifugé à 13000rpm pendant 10min à 4°C et les surnageants sont mis à sec et récupéré dans 1ml d'acétonitrile/méthanol/eau (2/6/2, v:v:v). Un pool constitué de 100µl de chaque échantillon a été utilisé comme contrôle qualité. L'acquisition de données en LC/MS a eu lieu sur un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo) couplé à une chaîne UHPLC Ultimate 3000 (Dionex) à la fois en mode positif et négatif. L'échantillon est injecté (10µl) dans une colonne C18 (100mm×2.1mm×1.7µm) placée dans un four à 25°C et élué avec un système de solvant A : H₂O 0,01% acide acétique et B: Acétonitrile 0,01% acide acétique selon un gradient (A:B, v/v) : 95:5 de 0 à 2 min; 5:95 à 15 min maintenu pendant 2 min; 95:5 à 17 min et maintenu pendant 6min. L'acquisition dure 26 min, de 50 à 900 m/z en mode centroid, R=30000. L'extraction de données et l'annotation ont été réalisées sous Galaxy avec XCMS. Les banques interrogées sont MassBank, HMDB, KEGG, HR2. Les isotopes, adduits, fragments et bruit de fond ont été éliminés manuellement. Les données ont été normalisées selon l'intensité de l'étalon interne (l'acide 12-OH-laurique pour le mode négatif et l'atropine pour le mode positif). Les analyses statistiques ont été réalisées sous SIMCA-13 (Umetrics, Malmö).

9. Résultats et discussion

Analyses énergétiques et nutritionnelles

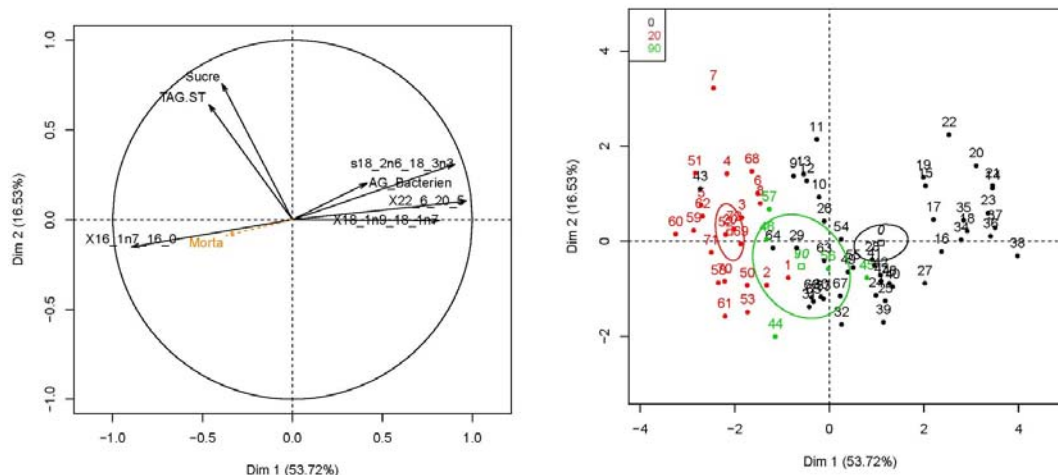


Figure 1. Analyse en composante principale : représentation des variables (gauche) et des échantillons (droite) sur le premier plan de l'ACP. Les échantillons sont classés en fonction du niveau de mortalité observé sur le terrain au moment du prélèvement.

L'analyse en composante principale (ACP) des variables biochimiques montre que l'axe principal oppose le rapport 16:1n-7/16:0, indicateur de la contribution des diatomées au régime alimentaire des moules, à tous les autres indicateurs trophiques basé sur la composition en acides gras (Figure 1, gauche). La contribution relative des diatomées au régime alimentaire des moules est négativement corrélée avec les apports de matière organique d'origine terrestre, bactérienne ou animale. Les indicateurs énergétiques (sucres, TAG/ST) semblent peu corrélés avec le rapport 16:1n-7/16:0 et pas du tout corrélés avec les autres indicateurs trophiques. Dans l'ensemble, les variables étudiées sont peu corrélées avec les mortalités observées. Il semble cependant que les moules prélevées sur des sites où les mortalités ont eu lieu présentent des valeurs accrues de 16:1n-7/16:0 (Figure 1, droite).

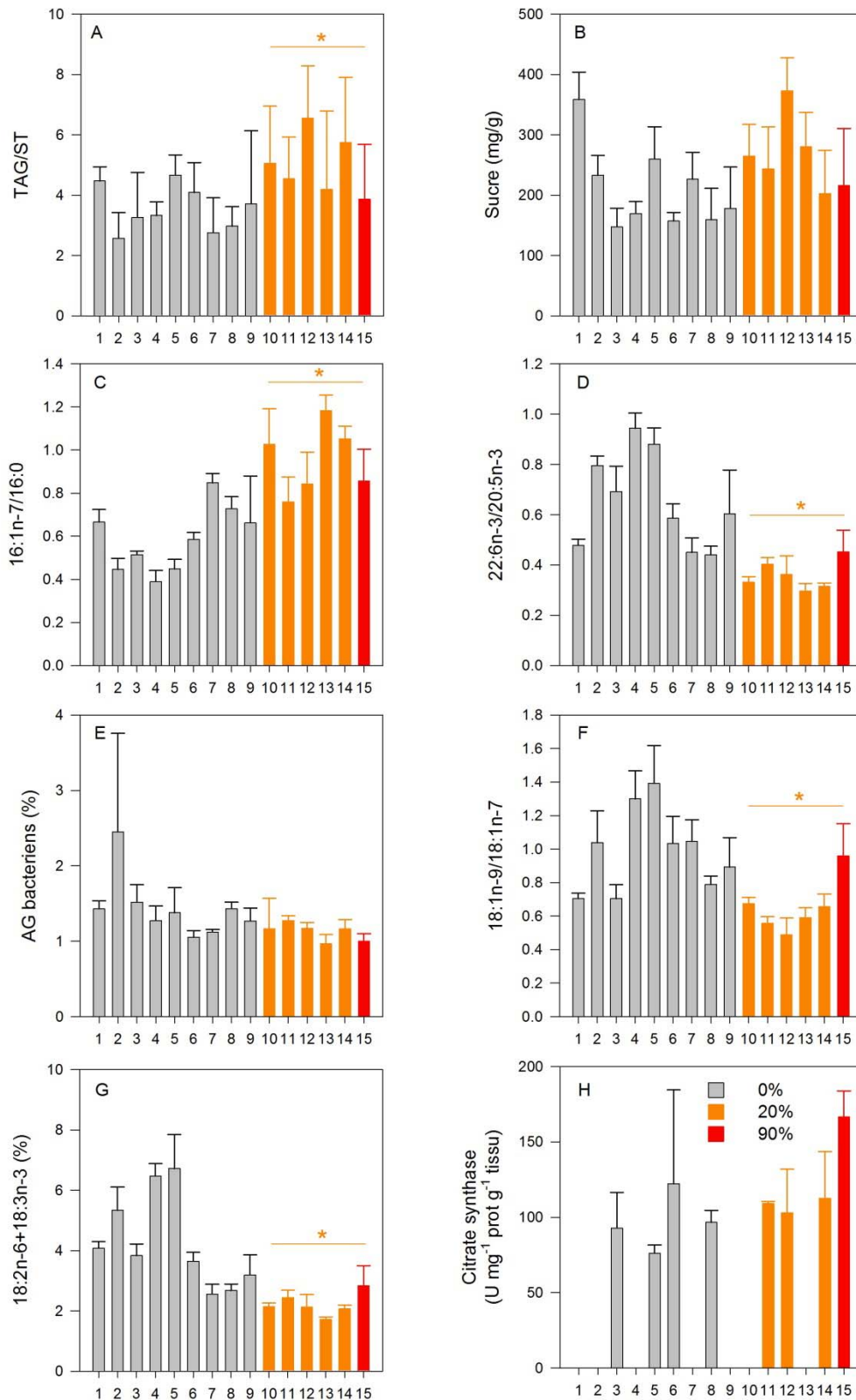


Figure 2. Histogramme des variables biochimiques en fonction des sites de prélèvement (n° 1 à 15, voir Tableau 1). Les couleurs sont associées au % de mortalité constaté au moment du prélèvement. L'étoile indique des différences significatives entre les individus prélevés sur des sites où les mortalités sont constatées et les moules prélevées sur des sites exempts de mortalité (ANOVA, $p < 0.05$, model $df = 15$ sites).

L'analyse plus approfondie de chaque variable en fonction de la présence ou de l'absence de mortalité constatée (quel que soit le niveau) montre que le niveau de réserves énergétiques, évalué par le rapport TAG/ST, et la contribution relative des diatomées (16:1n-7/16:0) sont plus élevés dans les moules prélevées sur des sites où il y a eu des mortalités (Figure 2A et 2C). A l'inverse, la somme 18:2n-6+18:3n-3, indicatrice des apports de

matière organique d'origine terrigène, le rapport 22:6n-3/20:5n-3, indicateur de la contribution des dinoflagellés, et le rapport 18:1n-9/18:1n-7, qui est souvent associé à de la matière organique d'origine animale, sont généralement inférieurs dans les moules prélevées sur des sites où il y a eu des mortalités.

Par conséquent, il semble que les moules prélevées sur des sites où il y a eu des mortalités sont de meilleur qualité, du point de vue énergétique et nutritionnel, que celles qui ont été échantillonnées sur des sites exempts de mortalité. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les moules prélevées sur les sites où les mortalités se sont produites sont des « survivantes » qui ont été naturellement sélectionnées, contrairement à celles qui ont été échantillonnées sur les sites exempts de mortalité.

Analyses métabolomiques

Les échantillons de moules ont été injectés en LC/MS en mode positif et négatif. Les analyses de données dans ces deux modes ont mis en évidence 3 métabolites la n-décanoyl-glycine, l'acide eicosapentaénoïc (EPA, 20:5n-3) et la putative phosphatidyle serine (PS 20:5/0:0).

La n-décanoyl-glycine, une molécule impliquée dans le métabolisme des acides gras, est quasiment absente chez les individus prélevés sur des sites où les mortalités ont eu lieu comparativement aux moules échantillonnées sur des sites exempts de mortalité (Figure 3A). À l'inverse, l'acide gras libre 20:5n-3 augmente avec les mortalités (Figure 3B). Les acides gras polyinsaturés en C₂₀ (20:5n-3 et 20:4n-6) agissent comme précurseurs des eicosanoïdes, un groupe d'hormone incluant les prostaglandines, leucotriènes et acides hydroxyeicosatétraénoïques (Smith & Murphy 2003). La production d'eicosanoïdes est associée à des événements stressants ou coûteux d'un point de vue énergétique, tels que la gamétogenèse et la ponte ou la stimulation des fonctions immunitaires (Osada et al. 1989, Stanley et al. 1999). Chez les bivalves, les membranes des hémocytes sont caractérisées par des niveaux particulièrement élevés d'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) probablement pour réguler les réponses immunitaires (Delaporte et al. 2003). Enfin, la phosphatidyle serine (20:5/0:0), comme 20:5n-3, augmente avec les mortalités (Figure 3C).

Ces résultats suggèrent une altération du métabolisme lipidique chez les moules en fonction des mortalités, reflétant possiblement un processus d'inflammation accru chez les individus prélevés sur les sites où les mortalités ont eu lieu. Toutefois, il est difficile d'aller plus loin dans l'interprétation de ce signal.

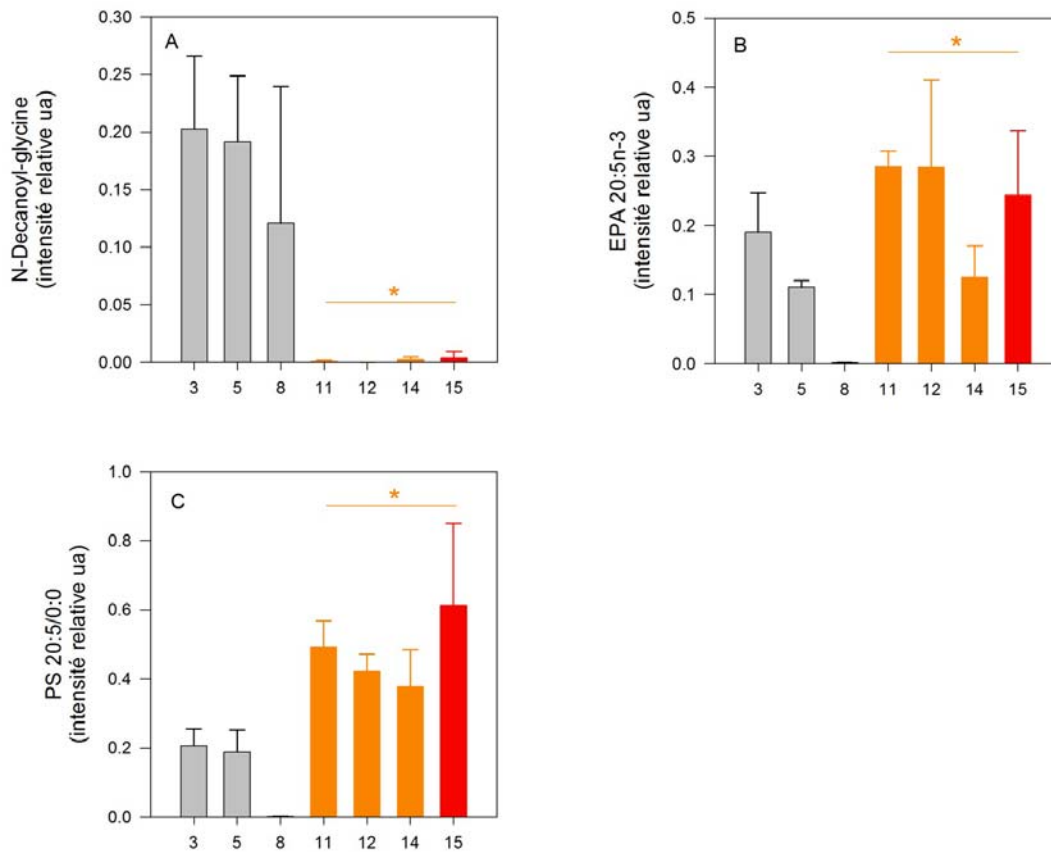


Figure 3. Histogramme des métabolites différemment exprimés en fonction des mortalités par sites de prélèvement (n° 1 à 15, voir Tableau 1). Les couleurs sont associées au % de mortalité constaté au moment du prélèvement (0% : gris, 20% : orange, 90% : rouge). L'étoile indique des différences significatives entre les individus prélevés sur des sites où les mortalités sont constatées et les moules prélevées sur des sites exempts de mortalité.

En résumé, Les analyses menées dans le cadre de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence un affaiblissement énergétique ou un déficit nutritionnel, contrairement à ce qui a été montré chez l'huître creuse. En effet, les moules prélevées sur des sites où il y a eu des mortalités sont de meilleur qualité, du point de vue énergétique et nutritionnel, que celles qui ont été échantillonnées sur des sites exempts de mortalité. D'autre part, les analyses en métabolomique ont révélé des différences en fonction des mortalités pour seulement trois métabolites, généralement associés au métabolisme des lipides.

Conclusion générale

Après analyse de la période climatique englobant la période critique du mois de mars 2014 où des mortalités exceptionnelles de moules d'élevage sont apparues dans le Pertuis Breton, il a été montré que :

Au cours de l'hiver/printemps 2014, les **débits** ont été exceptionnels pour la quasi-totalité des fleuves impactant les Pertuis Charentais, et proches des conditions rencontrées en 2001. **Ils ont été en nette augmentation par rapport à la série des hivers 2008-2012**, et encore supérieurs aux forts débits de l'hiver 2013. La **température** de l'eau a été **supérieure de 1-2 °C** par rapport à la médiane interannuelle (comprise entre 8,6 et 9,7 °C selon les sites). Ces températures sont proches de celles rencontrées en 1994, 1995, 2001 et 2007, et caractérisent un **hiver «chaud»**.

Le point « Filière W » du Pertuis Breton a été caractérisé par **plusieurs baisses successives de salinité** et des **pics importants de turbidité** en relation avec les **apports marins** (panache des fleuves externes aux Pertuis) et **terrigenes** (fleuves internes au Pertuis Breton), dont les effets se conjuguent dans ce secteur. Dans les Pertuis, la dessalure observée se classe parmi les cinq plus fortes depuis 24 ans (1994, 1995, 2001, 2007, 2014). La turbidité est supérieure (de 1 à 6 mg/L) à la médiane au niveau de tous les sites de production de moules (résultats au niveau des bouées virtuelles). Elle est proche de celle rencontrée au cours des hivers 2001, 2007, 2008 et 2009 à l'ouest du Pertuis Breton. Au cours de **l'hiver 2014**, le **littoral de la façade atlantique** a présenté une **turbidité très forte**, supérieure de 10 mg/L à la normale saisonnière. Celle-ci n'est pas spécifique aux Pertuis Charentais. Elle a été observée de façon très prononcée, en particulier, de la Gironde à la pointe Sud Bretagne. Cette forte turbidité rencontrée est la conséquence probable de l'effet conjoint des **forts régimes hydriques hivernaux** (débits des fleuves), et surtout, des **coups de vent et tempêtes** de l'hiver 2014.

La concentration en chlorophylle *a* est légèrement supérieure à la médiane dans les Pertuis Charentais au cours de l'hiver 2014. Les phéopigments, traceurs des apports terrigenes, affichent des valeurs proches de la médiane interannuelle. En 2014, les blooms de diatomées (*Skeletonema costatum*) apparaissent dans le Pertuis Breton au cours du mois de mars après les premiers constats de mortalités. Le réchauffement des masses d'eau et les conditions anticycloniques ensoleillées de la deuxième quinzaine de mars ont probablement favorisé ce développement. Les **ressources trophiques** (estimées par la Chlorophylle *a*) sont dans la **gamme des valeurs saisonnières rencontrées à l'échelle de la façade atlantique**.

Sur la base de cette expertise environnementale, aucune différence physico-chimique et biologique marquée n'a pu être notée entre les deux Pertuis, sachant que seules les moules du Pertuis Breton ont subi des surmortalités en mars 2014.

Les caractéristiques environnementales de cet hiver sont d'abord celles d'un **hiver doux et pluvieux** qui classe 2014 avec les hivers des années 1994, 1995, 2001, 2007. La deuxième caractéristique est celle d'une **turbidité élevée sur le littoral** en lien avec les coups de vent successifs et les forts débits (deux fois supérieure à la normale d'un mois de février par exemple, en Poitou-Charentes). Ces conditions particulières ont par ailleurs été rencontrées en 2001, 2007, 2008 et 2009. **La conjugaison de ces deux caractéristiques particulières rapproche l'hiver 2014, des hivers 2001 et 2007 sur les 24 années analysées.**

Les résultats apportés par des **essais de simulation avec le modèle courantologique en trois dimensions « MARS3D-PC »** montrent que la chronologie, la spatialisation et les niveaux de mortalités observés sur les différents sites mytilicoles du Pertuis Breton au cours du mois de mars 2014 sont cohérents avec un transport hydrodynamique simulé au travers des deux traceurs implémentés dans le modèle. Une forte connectivité dynamique des sites Filières et sud Vendée et la relative indépendance des secteurs Aiguillon, Marsilly, La Rochelle avec la zone Filière et Sud Vendée ont également été mises en évidence (annexe 3).

Ceci est cohérent d'un point de vue spatial et quantitatif avec les mortalités observées sur les différents secteurs mytilicoles du Pertuis Breton. De plus, le temps de renouvellement moyen élevé des masses d'eaux déjà observé dans ce secteur a pu être encore amplifié par le confinement relatif observé pendant la période de mortes eaux (du 01 au 08 mars 2014).

Pour conclure sur l'expertise environnementale, les conditions physico-chimiques et biologiques particulières de l'hiver 2014 ne peuvent pas expliquer à elles seules les surmortalités de moules observées dans le Pertuis Breton durant l'hiver 2014.

Par ailleurs, les analyses en pathologie n'ont pas permis de mettre en évidence de présence d'agents infectieux exotiques ni de formes émergentes d'agents pathogènes déjà connus en France. **Toutefois, la présence de**

bactéries appartenant au groupe bactérien *Splendidus* a été détectée dans l'ensemble des échantillons analysés. Une identification plus poussée de ces isolats bactériens a permis de montrer que la majorité d'entre eux étaient identiques ou très proches et qu'ils pouvaient être identifiés dans l'état actuel des connaissances comme appartenant à l'espèce *Vibrio splendidus*. Des premiers résultats obtenus pour certains de ces isolats montrent qu'ils sont capables d'induire chez des moules saines des mortalités massives en conditions expérimentales.

Les résultats acquis sur les réserves biochimiques et énergétiques des moules impactées et non impactées par les épisodes de mortalité ne permettent pas de mettre en évidence un affaiblissement énergétique ou un déficit nutritionnel chez les moules impactés.

Les analyses de métabolomique suggèrent une altération du métabolisme lipidique chez les moules en fonction des mortalités, reflétant possiblement un processus d'inflammation accru chez les individus prélevés sur les sites où les mortalités ont eu lieu.

En résumé, des conditions environnementales particulières (apports importants d'eau douce, remise en suspension des sédiments au travers de tempêtes successives et d'un temps de résidence élevé de la masse d'eau spécifique au Pertuis Breton et à cette période notamment en mortes eaux) apparaissent comme importants dans le phénomène de mortalité de moules observés en 2014. Ces conditions auraient pu induire localement des modifications dans les équilibres microbiens, et favoriser la prolifération de bactéries identifiées comme appartenant à l'espèce *V. Splendidus*, pathogènes pour les moules, et leur contact avec les coquillages.

Références bibliographiques

- Barber BJ, Blake NJ (1981) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J Exp Mar Biol Ecol* 52:121-134
- Barber BJ, Blake NJ (2006) Reproductive physiology. In: Shumway SE, Parsons GJ (eds) *Scallops: Biology, ecology and aquaculture*, Book 35. Elsevier, Amsterdam
- Bayne BL, Bubel A, Gabbot PA, Livingston DR, Lowe DM, Moore N (1982) Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125:359-369
- Burge CA, Eakin CM, Friedman CS, Froelich B, Hershberger PK, Hofmann EE, Petes LE, Prager KC, Weil E, Willis BL, Ford SE, Harvell CD (2014) Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. In: Carlson CA, Giovannoni SJ (eds) *Annual Review of Marine Science*, Vol 6, 2014, Book 6
- Childress JJ, Somero GN (1979) Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar Biol* 52:273-283
- Corporeau C, Groisillier A, Jeudy A, Barbeyron T, Fleury E, Fabioux C, Czjzek M, Huvet A (2011) A Functional Study of Transforming Growth Factor-Beta from the Gonad of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnol* 13:971-980
- De Zwaan AE, Mathieu M (1992) Cellular biochemistry and endocrinology. In: Gosling E (ed) *The mussel Mytilus: ecology, physiology genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254:571-582
- Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quere C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain J-F (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Biol* 206:3053-3064
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T (2006) Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254:606-616
- Garcia-Esquivel Z, Bricelj VM, Felbeck H (2002) Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp Biochem Physiol* 133:63-77
- Genard B, Miner P, Nicolas J-L, Moraga D, Boudry P, Pernet F, Tremblay R (2013) Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in pacific oyster larvae. *PLoS ONE* 8:e64534-e64534
- Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus A, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR (1999) Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science* 285:1505-1510
- Kelly JR, Scheibling RE (2012) Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar Ecol Prog Ser* 446:1-22
- Li Y, Qin JG, Li X, Benkendorff K (2009) Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286:64-71
- Martinez-Pita I, Sanchez-Lazo C, Ruiz-Jarabo I, Herrera M, Mancera JM (2012) Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture* 358:274-283
- Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain J-F (1992) Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J Exp Mar Biol Ecol* 163:221-234

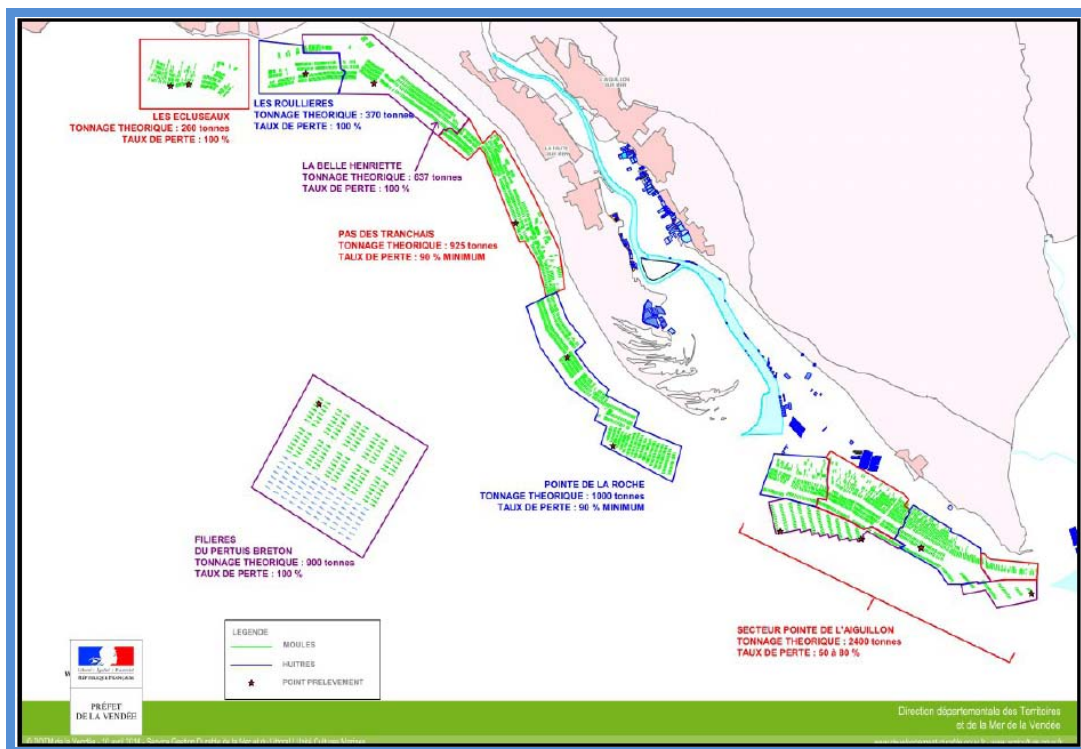
- Metcalfe LD, Schmitz AA (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 33:363-364
- Moran AL, Manahan DT (2004) Physiological recovery from prolonged 'starvation' in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 306:17-36
- Osada M, Nishikawa M, Nomura T (1989) Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol* 94:595-601
- Pernet F, Lagarde F, Jeannée N, Daigle G, Barret J, Le Gall P, Quere C, D'orbcastel ER (2014) Spatial and Temporal Dynamics of Mass Mortalities in Oysters Is Influenced by Energetic Reserves and Food Quality. *PLoS ONE* 9:e88469
- Pipe RK (1987) Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 96:519-528
- Samain J-F, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the Morest project
- Smith WL, Murphy RC (2003) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Book 36. Elsevier Science, Amsterdam
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328-338
- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P (1997) Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Res* 10:177-185
- Stanley D, Hoback W, Bedick J, Tunaz H, Rana R, Aliza A, Miller J (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in larvae of the butterfly, *Colias eurytheme*. *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 123:217-223

Annexe 1. Constat des missions d'enquête des DDTM Vendée et Charente Maritime

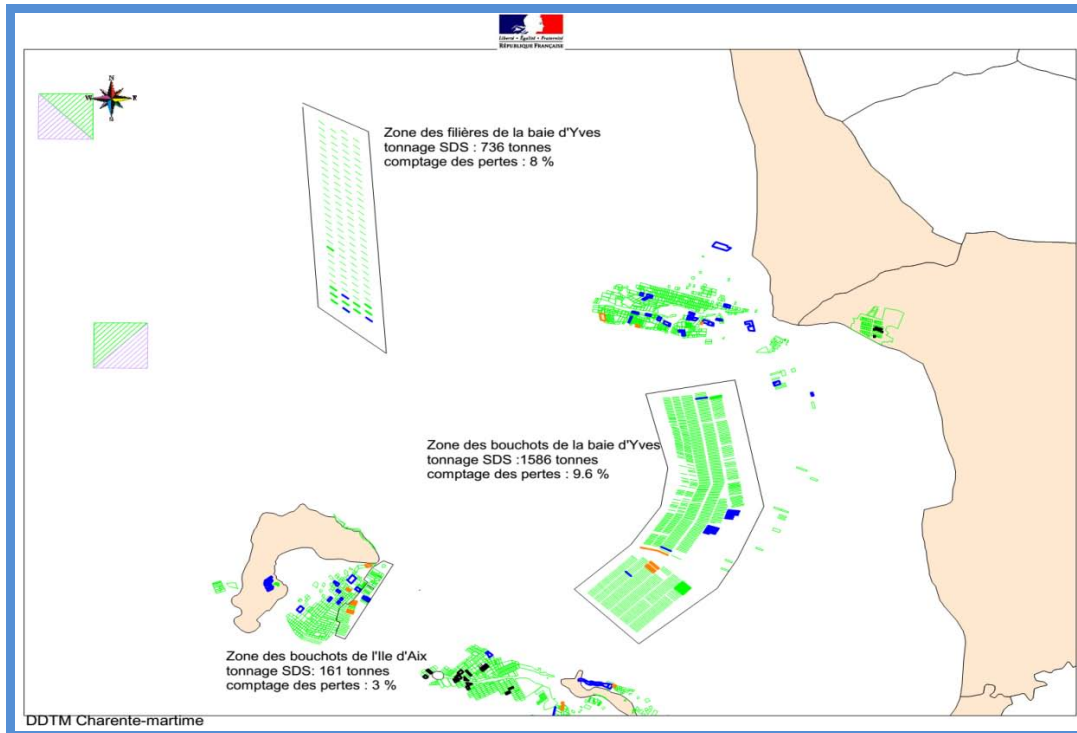
Comment est estimée la perte de récolte ?

- 1- Remontée de 3 descentes entières (filières) et de la totalité des moules de 3 bouchots sur 12 points de prélèvement repartis dans le Pertuis Breton.
- 2- Réalisation de 1 à 3 échantillonnages de 1,5 Kg en moyenne par point
→ première pesée
- 3 - Tri et retrait des moules vivantes
→ deuxième pesée
- 4 - Établissement d'un taux de perte moyen par point de prélèvement

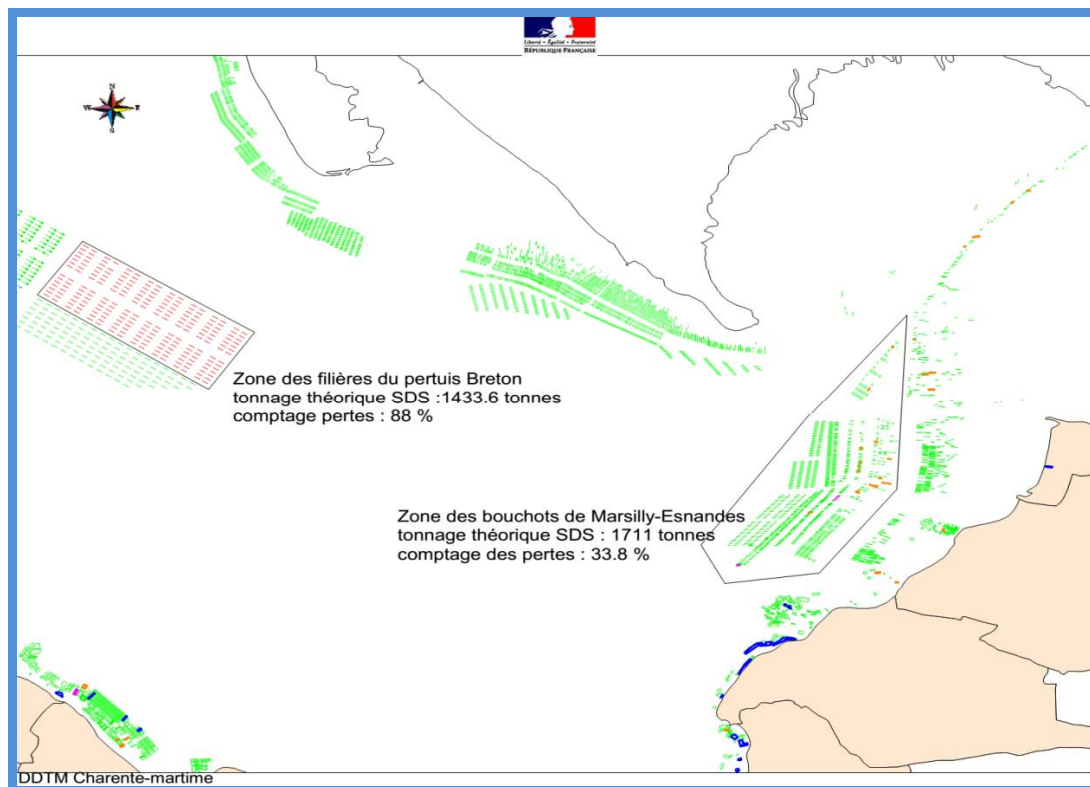
Secteur sud Vendée (nord Pertuis-breton)



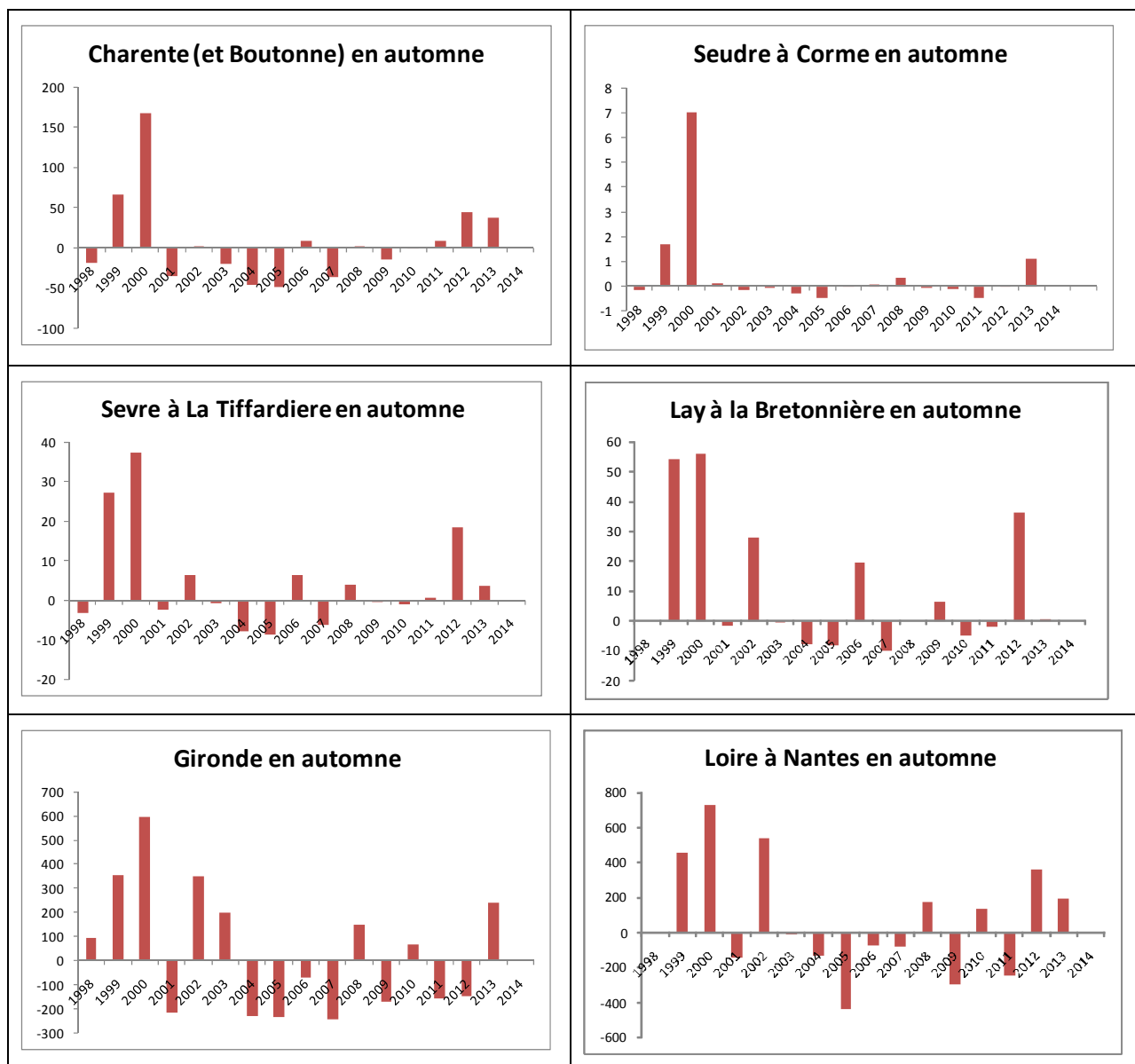
Secteur du Pertuis d'Antioche (baie d'Yves - Aix)



Secteur du Pertuis Breton

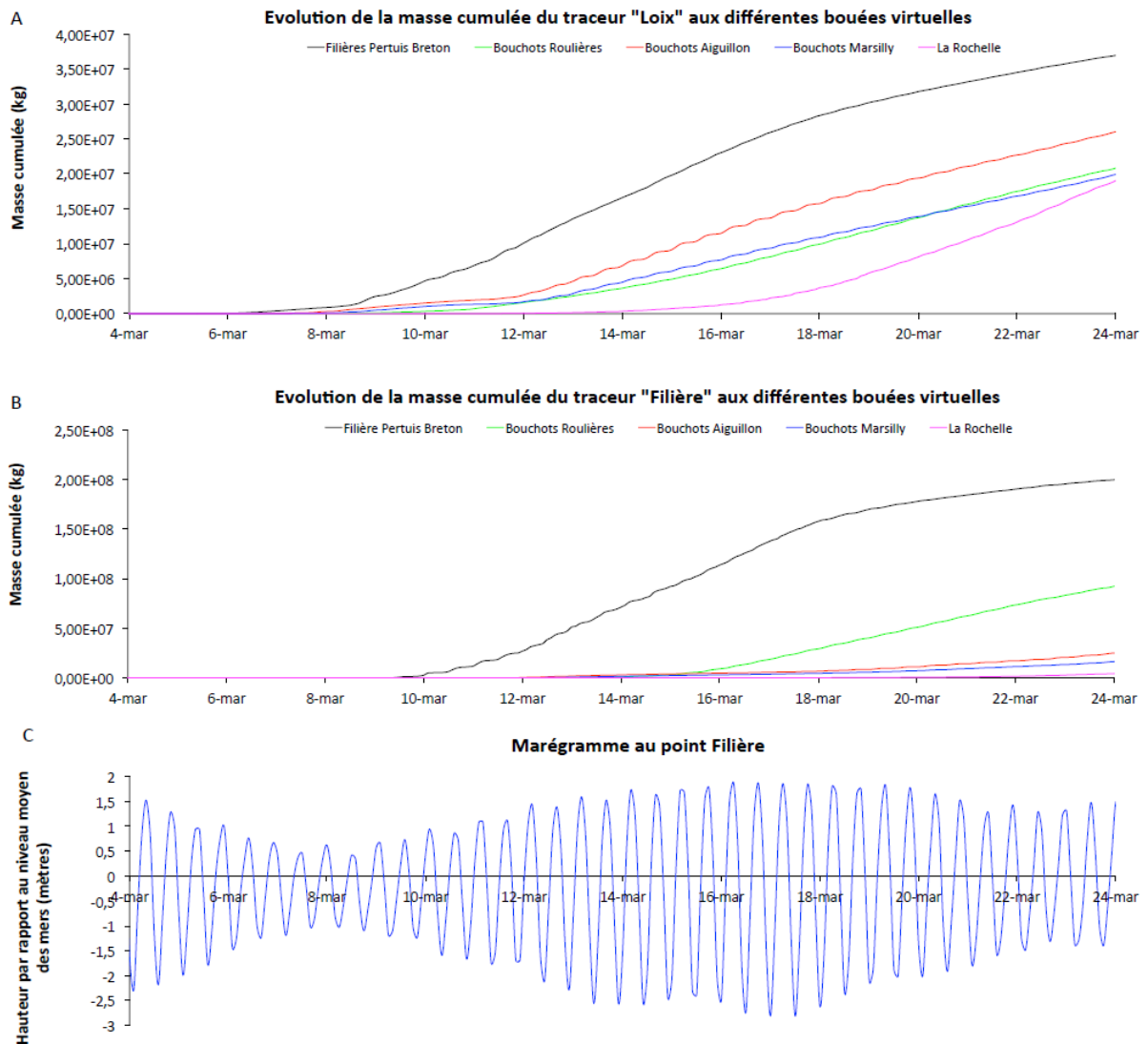


Annexe 2. Comparaison des débits des principaux fleuves impactant les Pertuis Charentais en automne depuis 1998



Ecart à la médiane interannuelle des débits des fleuves internes et externes aux Pertuis charentais entre l'automne 1998 et l'automne 2013 (en m^3/s).

Annexe 3. Evolution de la masse cumulée des deux traceurs aux différentes bouées virtuelles du Pertuis Breton



(A) traceur libéré au niveau de la fosse de Loix (46°13'18.732" N - 01°23'57.8034" W) le 04 mars 2014 ; (B) traceur libéré au point Filière (46°16'33.168" N - 01°23'9.5136" W) le 09 mars 2014 ; (C) marégramme calculé au point Filière. Une bouée virtuelle supplémentaire au niveau de La Rochelle (46°07'26 N - 01°14'56 W) a été ajoutée afin d'évaluer l'évacuation du traceur vers le Pertuis d'Antioche au Sud. La masse cumulée représente le cumul des masses présentes dans la maille de calcul (500 x 500 mètres) à chaque pas de temps. Ce dernier est d'une valeur toutes les deux heures.