



## PERLE – PROGRAMME D'EXPERIMENTATION ET DE RECHERCHE SUR L'HUITRE PLATE OSTREA EDULIS – RAPPORT FINAL DES SOUS- PROGRAMMES 2 ET 3

---

Arzul Isabelle<sup>1</sup>, Baillon Laury<sup>1</sup>, Boudry Pierre<sup>5</sup>, Bouget Jean-François<sup>4</sup>, Chollet Bruno<sup>1</sup>, Cochet Hélène<sup>3</sup>, Couraleau Yann<sup>1</sup>, Dubreuil Christine<sup>1</sup>, Duchêne Julie<sup>7</sup>, Dutartre Julie<sup>1</sup>, Garcia Céline<sup>1</sup>, Heloury Purotu<sup>1</sup>, Heurtebise Serge<sup>1</sup>, Huchet Eve<sup>1</sup>, Hussenot Mathieu<sup>2</sup>, Langlade Aimé<sup>4</sup>, Ollier Simon<sup>2</sup>, Omnes Emmanuelle<sup>1</sup>, Pouvreau Stéphane<sup>5</sup>, Roby Charlotte<sup>1,6</sup>, Serpin Delphine<sup>1</sup>, Viard Frédérique<sup>6</sup>, Wacrenier Candice<sup>1</sup>, Lapègue Sylvie<sup>1</sup>

Les auteurs sont classés par ordre alphabétique sauf le premier et le dernier qui sont respectivement les responsables des sous-programmes 3 et 2

- <sup>1</sup> Ifremer LGPMM la Tremblade
- <sup>2</sup> CRC Bretagne Nord
- <sup>3</sup> Cochet Environnement
- <sup>4</sup> Ifremer LERMPL La Trinité
- <sup>5</sup> Ifremer LPI Argenton
- <sup>6</sup> CNRS/UPMC, Roscoff
- <sup>7</sup> CNRS/IRD/UBO LEMAR, Brest



comité régional de la  
**CONCHYLICULTURE**  
des Pays de la Loire



L'huître plate (*Ostrea edulis*) est une espèce endémique des côtes européennes, elle est présente depuis des millions d'années. Son aire de répartition est très vaste allant de la Norvège jusqu'au Maroc. Elle est également présente en mer Méditerranée, en mer Noire, mais également au Canada, aux Etats-Unis ou encore en Afrique du Sud, à la suite d'introductions pour des raisons aquacoles. En France, à partir de la fin des années 70, de fortes mortalités ont été constatées sur les bancs naturels et en élevage, faisant rapidement chuter la production de 20 000 tonnes à 2 000 tonnes. Ces mortalités ont été attribuées à deux maladies parasitaires : la marteiliose (due au parasite *Marteilia refringens*) et la bonamiose (due au parasite *Bonamia ostreae*). Trente ans après, les niveaux de production n'ont jamais rattrapé les niveaux des années 60 et stagnent autour de 1 500 tonnes par an.

C'est dans ce contexte difficile pour l'huître plate additionné à la crise des mortalités massives sur la production de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) que le programme PERLE est né pour relancer une production viable d'huîtres plates dans un souci de diversification des activités conchylicoles dans le grand ouest, et la volonté de pérenniser une production ancestrale.

PERLE a fédéré professionnels conchylicoles représentés par les CRC Bretagne-Nord et Pays de la Loire, scientifiques d'Ifremer, du CNRS et de l'IUEM ainsi que le centre technique du SMIDAP autour de la problématique de la restauration des bancs naturels d'huîtres plates.

PERLE, programme d'expérimentation et de recherche sur l'huître plate *Ostrea edulis*, se décompose en 3 thématiques et 9 sous-programmes :

- La première thématique (WP1) s'attache à décrire les interactions entre l'huître plate et son environnement. Des prospections de terrain ont permis de réaliser un inventaire des populations, de décrire la typologie des habitats et de réaliser de nombreux échantillonnages qui ont alimenté les études sur la diversité génétique (SP2) de l'huître plate et permis de mieux comprendre les dynamiques d'infection des parasites (SP3). L'acquisition des premières données en rade de Brest et le traitement de 30 années de suivi en baie de Quiberon ont permis des avancées significatives sur la variabilité spatio-temporelle de la reproduction et du recrutement. En outre, PERLE a permis d'initier de nouvelles techniques scientifiques de suivi et notamment des méthodes alternatives pour l'identification de larves de bivalves (outils moléculaires).

- La seconde thématique s'est articulée autour du choix d'huîtres plates présentant un intérêt pour le repeuplement. Pour cela, une unité expérimentale dédiée a été créée avec pour objectif la production de naissains d'huître plate issus de 4 origines. L'un des objectifs de cette production était de maîtriser les techniques de production des ces naissains en écloserie. Un accompagnement scientifique ainsi que de nouvelles expérimentations sur la gestion prophylaxique des géniteurs et les conditions favorables à l'élevage des post-larves ont permis de mieux maîtriser la production de naissains en écloserie.
- Enfin, un dernier volet a consisté à coordonner techniquement et administrativement le programme PERLE afin d'atteindre les objectifs cités précédemment. En plus de la coordination, un suivi, sous-forme de fiches d'avancement, a été mis en place trimestriellement. Un rapport complet et détaillé présentant l'ensemble des résultats des 9 sous-programmes de PERLE a été rédigé.

Nous présentons dans ce document une partie des résultats finaux du programme PERLE obtenus dans le cadre du premier volet (WP1) et des deux sous-programmes SP2 et SP3.

## WP1 -SP2 : Étude de la diversité génétique des populations naturelles

### Objectifs

Ce sous-programme de travail se focalise sur la diversité génétique des populations naturelles (au sens de stocks) d'huîtres plates, en s'intéressant à la fois à des échantillons adultes et de naissains afin d'obtenir une représentation spatiale et temporelle de cette diversité, et ce à une échelle régionale. En effet, jusqu'ici les populations d'huîtres plates avaient été étudiées principalement à l'échelle européenne. Il avait été mis en évidence une faible, mais significative, structure génétique à cette échelle, avec un isolement génétique expliqué par la distance géographique séparant les populations (Diaz Almela et al. 2004). Une étude plus récente a permis par ailleurs d'identifier 6 stocks génétiquement différenciés à cette échelle européenne (Harrang 2012). Partant de ces résultats, le projet PERLE avait deux objectifs principaux:

#### 1. Diversité génétique des populations naturelles : focus en rade de Brest

Ce premier objectif visait à déterminer au stade adulte:

- le degré de similitude génétique existant entre les différents sites colonisés par des huîtres adultes au sein de la rade de Brest,
- si les sites de la rade de Brest présentaient des niveaux de diversité différents de ceux mesurés dans d'autres zones de captage naturel (Quiberon)

#### 2. Taille efficace et dynamique génétique des populations

Ce second objectif cherchait à :

- déterminer si les naissains collectés reflétaient la diversité génétique des populations adultes en place dans la rade de Brest et formant potentiellement la populations (stock) parentale ou n'en représentaient qu'une fraction, notamment en fonction de leur localisation dans la rade.
- caractériser l'instabilité démo-génétique des populations par une analyse temporelle des naissains recrutés.

### Méthodes

#### Marqueurs moléculaires

Pour ce faire, deux types de marqueurs moléculaires ont été sélectionnés; tout d'abord, des marqueurs microsatellites (Figure 1) qui correspondent à des séquences d'ADN formées par la répétition d'un motif composé de 2 à 6 nucléotides. Seize marqueurs microsatellites ont été choisis afin de réaliser une mise au point de multiplexage (fonctionnement de plusieurs marqueurs en même temps). Au final, 12 marqueurs ont pu être multiplexés sous la forme de 4 séries de trois marqueurs, à partir de marqueurs déjà publiés (Launey et al., 2002; Lallias et al., 2009), et onze ont été analysés avec succès.

```

GCTCCAGCCTTGACATCATCATCATCATCATCATCGCTAATCCTGGTACTAT
CGAGGTCGGAACGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGCGATTAGGACCATGATA

GCTCCAGCCTTGACATCATCATCATCATCATCGCTAATCCTGGTACTAT
CGAGGTCGGAACGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGCGATTAGGACCATGATA

```

Figure 1. Exemple d'une différence de longueur (délétion de deux répétitions) au niveau d'un marqueur microsatellite ayant la répétition CAT/AGT, entre deux échantillons

D'autre part, nous avons choisi des marqueurs SNPs (Single Nucleotide Polymorphism, Figure 2), correspondant à des variations d'une seule paire de base à une position donnée du génome (toutes les 50-70 pb chez *O. edulis*, Harrang et al., 2013). Nous avons travaillé à partir d'un jeu de 384 SNPs potentiels mis au point dans des projets de recherches précédents (Lapègue et al., 2014). Sur ces 384 SNPs, 119 ont été analysés avec succès sur l'ensemble des individus.

```

GCTCCAGCCTTGACATCGCTAATCCTGGTACTAT
CGAGGTCGGAACTGTAGCGATTAGGACCATGATA

GCTCCAGCCTTGACGTCGCTAATCCTGGTACTAT
CGAGGTCGGAACTGCAGCGATTAGGACCATGATA

```

Figure 2. Exemple d'une variation d'une seule base (A/G) à une position du génome, entre deux échantillons

### Echantillons d'huîtres

Un total de 17 populations d'huîtres adultes (Figure 3), composées de 749 individus, ont été analysées: 11 en Rade de Brest, 5 en Bretagne/Normandie/Baie de Bourgneuf, et 1 en Corse.

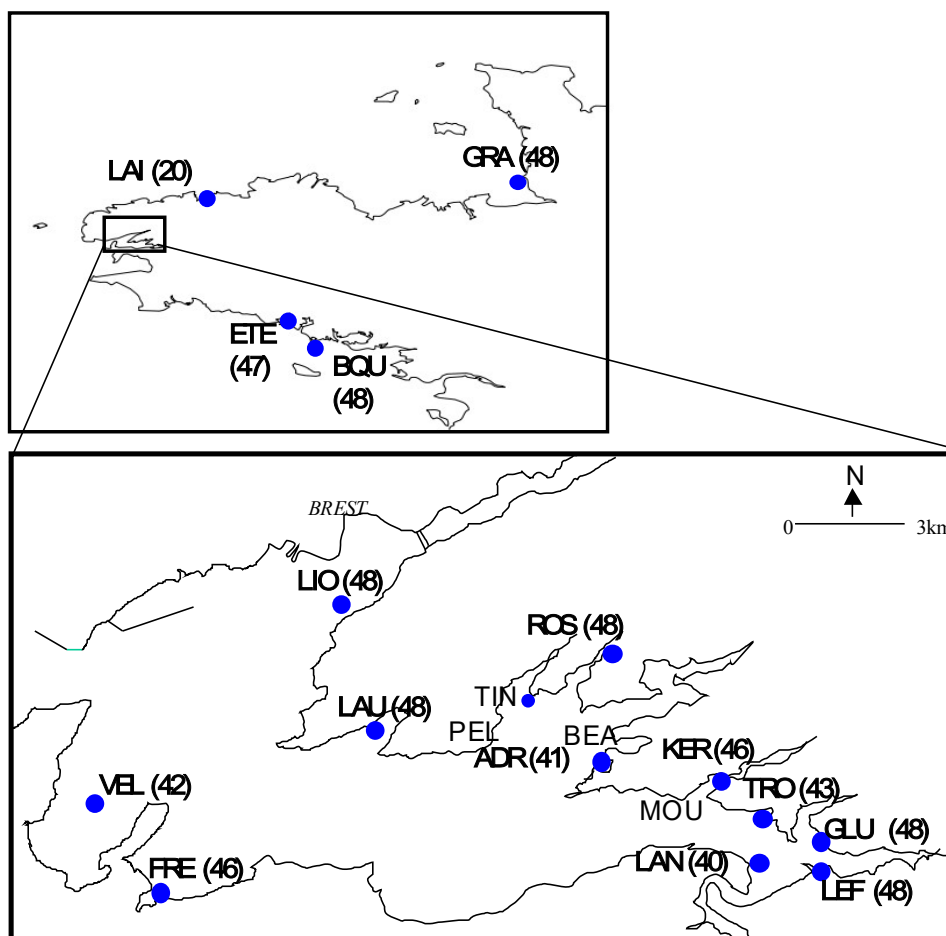


Figure 3. Localisation des échantillons d'huîtres adultes analysés.

De plus, 14 échantillons de naissains recrutés en 2011 et 16 en 2012 dans la rade de Brest (Figure 4), composés respectivement de 649 et 737 individus, ont été analysés.

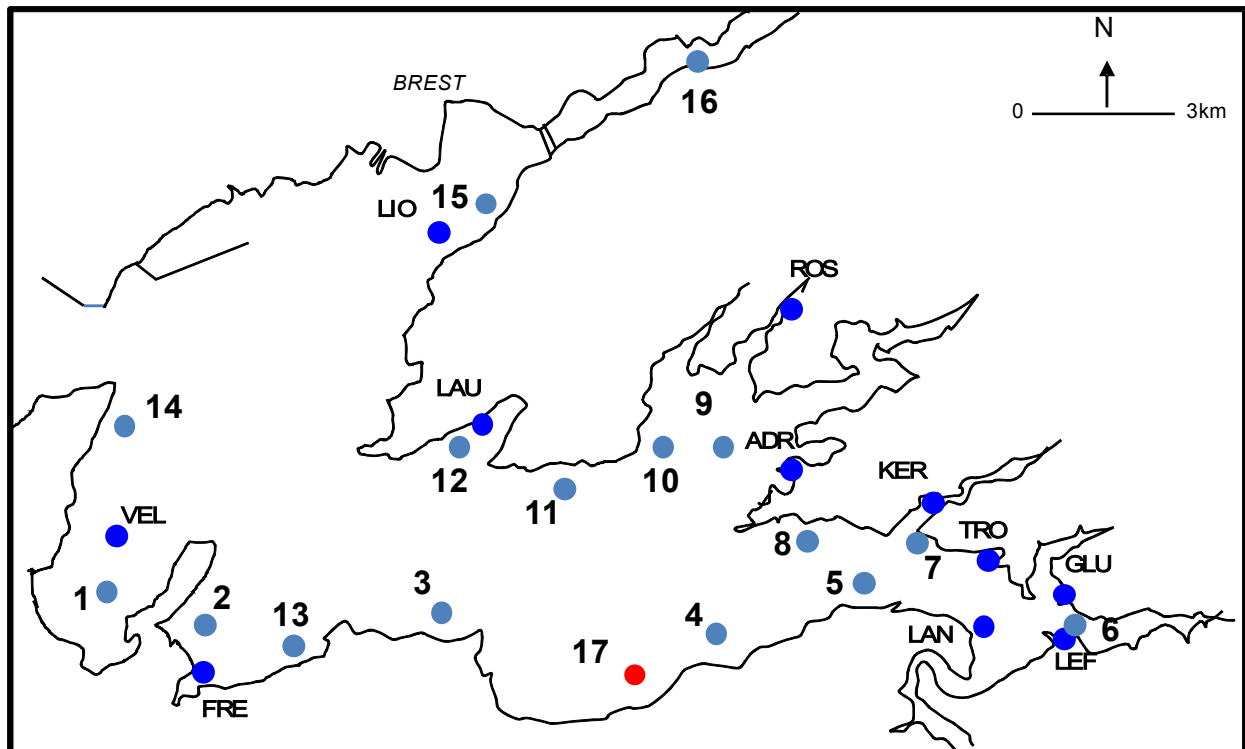


Figure 4. Localisation des échantillons de naissains (en bleu clair et nommés avec des nombres) et d'adultes (en bleu foncé et nommés avec des lettres) en rade de Brest. Est indiqué en rouge le site de captage professionnel.

Au total, ont été analysés, avec 11 marqueurs microsatellites et 119 SNPs, respectivement 47 et 33 échantillons de populations d'huîtres adultes et naissains, répartis selon le tableau 1. Un nombre moins important d'individus a été analysé avec les marqueurs SNPs pour des raisons budgétaires. Le choix des individus à analyser avec les SNPs a été réalisé en fonction des premiers résultats intermédiaires qui avaient été obtenus avec les marqueurs microsatellites.

	Adultes Rade	Adultes extérieur	Naissains 2011	Naissains 2012
Microsatellites	11	6	14	16
SNPs	8	6	9	10

Tableau 1. Nombre de populations échantillonnées selon les zones géographiques, le stade et analysées avec les deux types de marqueurs.

## Résultats

Au total, nous avons réalisé les analyses statistiques à partir des génotypes obtenus pour 11 marqueurs microsatellites d'une part, et 119 marqueurs SNPs d'autre part, respectivement pour 2135 et 1370 individus. A partir de ces génotypes et pour chaque marqueur, les fréquences alléliques ont été estimées afin de mesurer des paramètres de diversité et de structure génétique des populations.

### 1. Diversité génétique des populations naturelles adultes et naissains

Les marqueurs microsatellites mettent en évidence une forte diversité génétique, et ce dans toutes les populations, adultes et naissains (Figure 5).

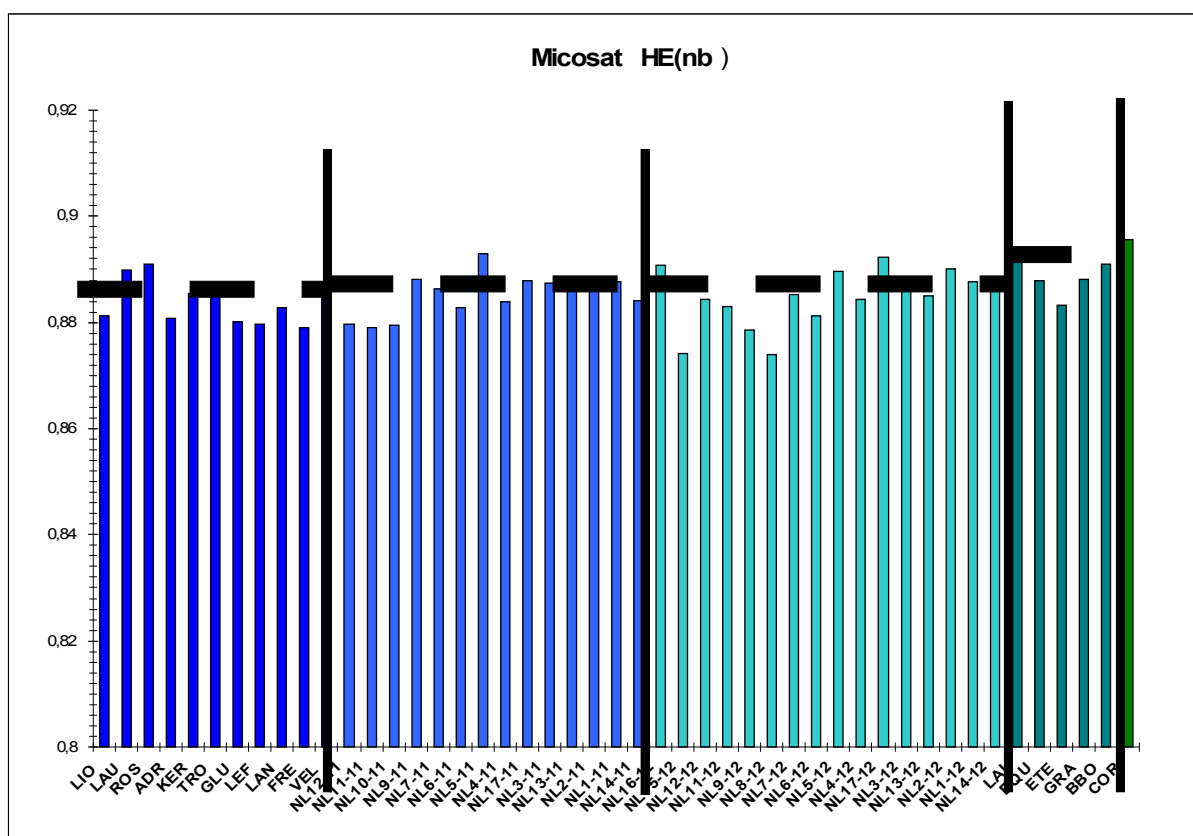


Figure 5. Paramètre de diversité (Hétérozygotie  $HE_{(nb)}$ ) estimé avec les marqueurs microsatellites

Cette diversité est proche de celle observée en Bretagne chez l'huître creuse (F. Cornette, com. pers.) mais supérieure à celle de la crépidule sur la même région (Dupont et al., 2007; Riquet 2012). Elle est totalement comparable au niveau de diversité observé à l'échelle européenne précédemment étudiée avec le même type de marqueurs (Harrang, 2012).

Les 119 locus SNPs, dont un des avantages est d'offrir une meilleure représentativité à l'échelle de l'ensemble du génome, donnent qualitativement les mêmes informations que celles obtenues avec les 11 microsatellites, en particulier confirment une diversité génétique élevée quels que soient les échantillons et donc leur localisation géographique (Figure 6).

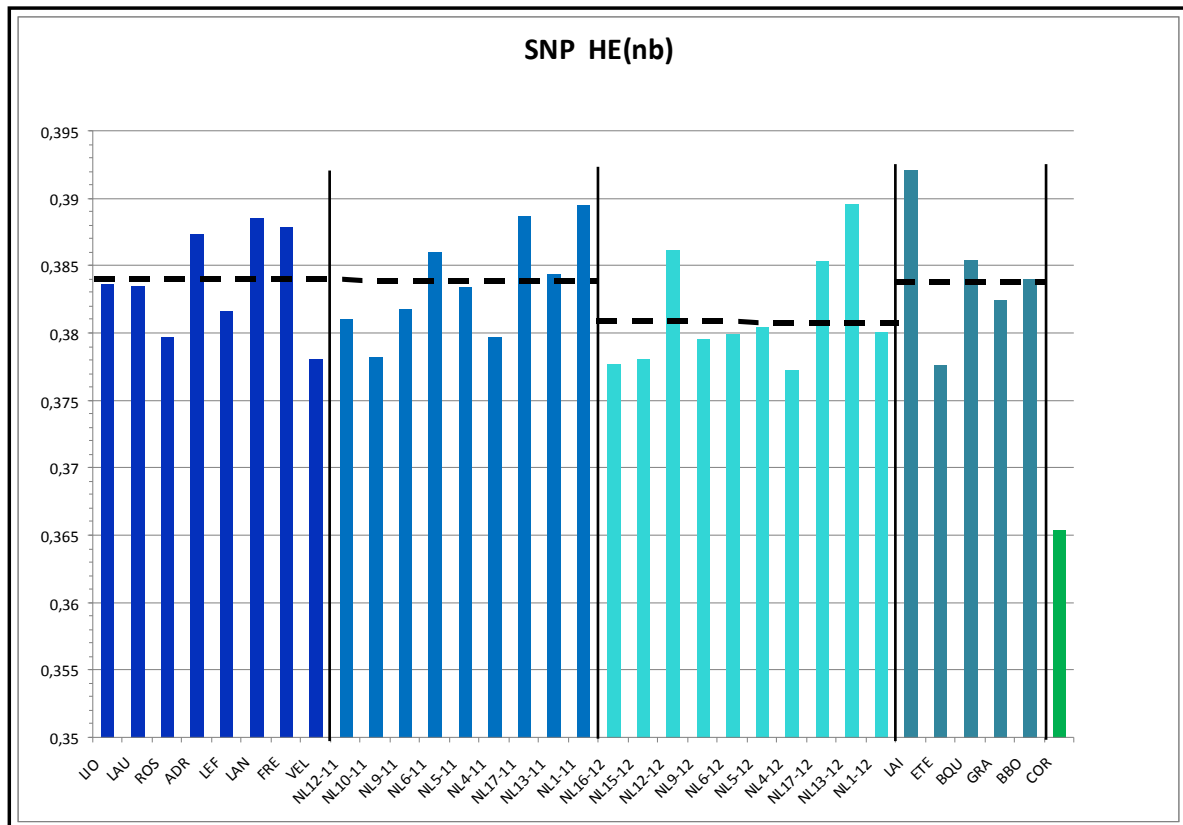


Figure 6. Paramètre de diversité (Hétérozygotie  $HE_{(nb)}$ ) estimé avec les marqueurs SNPs

**Globalement, pour les deux types de marqueurs, la diversité génétique est très similaire et élevée à l'échelle locale (rade de Brest) ou régionale.**

**De plus la diversité génétique des naissains est comparable à celle observée pour les adultes, ce qui signifie que les générations successives étudiées en 2011 et 2012 sont représentatives de la diversité génétique globale des populations adultes présentes dans chaque site, ce qui implique une contribution d'un nombre important de géniteurs à la production de chaque génération.**

**Ainsi nous pouvons conclure sur deux des objectifs poursuivis dans le cadre de ce projet:**

- les sites de la rade de Brest présentent des niveaux de diversité identiques de ceux d'autres zones de captage naturel (Quiberon),
- les naissains collectés en 2011 et 2012 reflètent la diversité génétique des adultes en place.

## *2 Répartition spatiale de la diversité et dynamique des populations en rade de Brest*

Après avoir qualifié la diversité dans les échantillons d'adultes et de naissains, nous avons étudié la répartition de cette diversité à l'intérieur et entre les échantillons de populations étudiés. Pour cela nous estimons, à partir des fréquences alléliques à chacun des marqueurs, un paramètre mesurant les différences génétiques, appelé le  $F_{ST}$ , qui mesure la part de la diversité qui se répartit entre les populations. Plus l'indice s'approche de la valeur zéro, plus les échantillons comparés sont ressemblants génétiquement. Des tests statistiques de la différence de ce paramètre à la valeur zéro sont réalisés afin de déterminer les échantillons qui sont génétiquement différents.



Les différents marqueurs n'apportent pas tout à fait la même information, en particulier certains présentent des valeurs « atypiques » qui peuvent être mises en relation avec des effets sélectifs (généralement indirects) ou parce qu'ils représentent un extremum de la distribution des valeurs attendues. Nous avons donc commencé par identifier les marqueurs qui se comportaient différemment des autres, ceux-ci sont caractérisés par des valeurs significativement plus élevées de  $F_{ST}$  que celles portées en moyenne.

La Figure 7 donne ainsi un exemple de détection de ce type de marqueur dit « outlier » sur l'ensemble des échantillons de populations d'huîtres adultes.

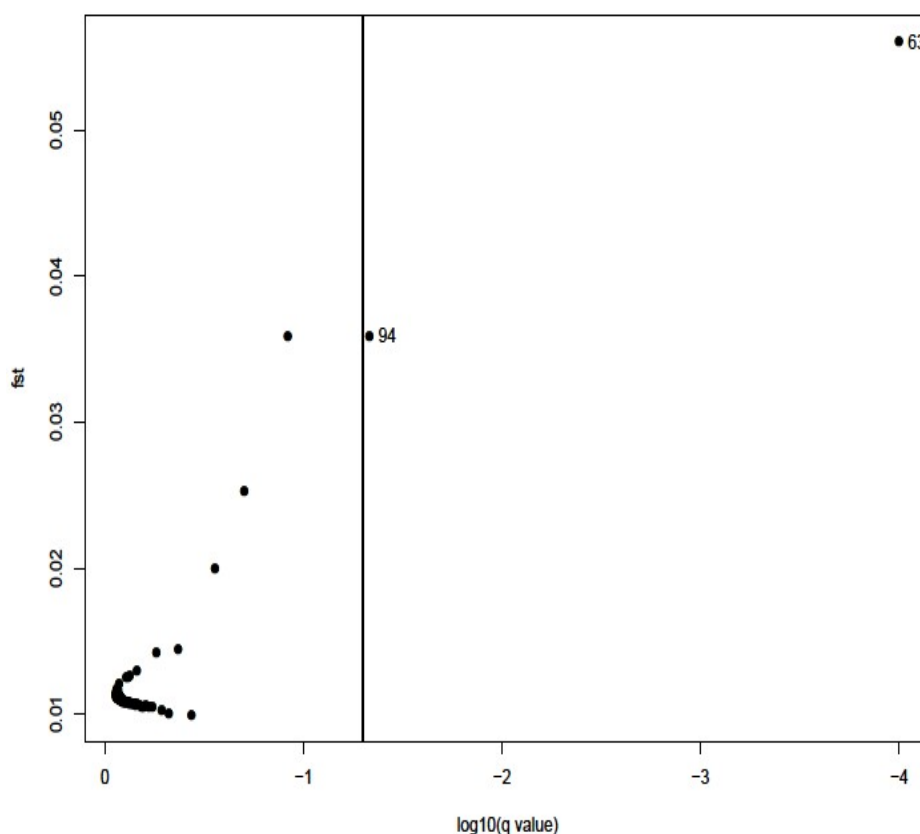


Figure 7. Détection de marqueurs outliers dans l'ensemble des échantillons de populations d'huîtres adultes

Dans cet exemple, les marqueurs SNPs 63 et 94 montrent un  $F_{ST}$  significativement supérieur aux autres marqueurs et pourraient indiquer un effet de la sélection sous hypothèse que le modèle de migration et dérive utilisé pour leur détection soit valide.

Sur l'ensemble des analyses réalisées, 4 marqueurs SNPs ont été détectés comme étant des outliers. Dans les résultats suivants, ils seront analysés de façon séparée.

Ainsi la première ligne du Tableau 2 met en évidence qu'il existe des différences génétiques faibles mais significatives entre les 14 échantillons de populations d'adultes étudiés, et cela quel que soit le type de marqueur analysé. Les valeurs de  $F_{ST}$  sont faibles mais significativement différentes de 0. Elles vont de 0.3% pour les marqueurs microsatellites à 2% pour les 4 marqueurs SNPs outliers. Ces valeurs sont inférieures aux valeurs rencontrées à l'échelle européenne (Harrang, 2012), ce qui est attendu compte-tenu de la petite échelle d'étude.

	Msat (11Locus)		119 SNP		115 SNP		4 SNP Outliers	
	F <sub>ST</sub>	P-value	F <sub>ST</sub>	P-value	F <sub>ST</sub>	P-value	F <sub>ST</sub>	P-value
Toutes les pop Adultes (14 )	<b>0.0029</b>	p < 0.000001	<b>0.0082</b>	p < 0.000001	<b>0.0063</b>	p < 0.000001	<b>0.0241</b>	p < 0.000001
Adultes de la rade de Brest (8 )	-0.0001	3.32E-01	<b>0.0028</b>	5.03E-06	<b>0.0019</b>	2.21E-03	<b>0.0241</b>	4.00E-08
Naissains 2011 (9)	0.0004	3.51E-01	-0.0002	6.04E-01	0.0003	6.48E-01	0.0014	4.14E-01
Naissains 2012 (10)	-0.0003	3.73E-01	<b>0.0013</b>	5.48E-03	0.0005	1.02E-01	<b>0.0103</b>	1.88E-03
<i>Naissains 2012 (sans NL15 et NL16)</i>	-0.0003	4.15E-01	0.0008	9.89E-02	0.0006	1.37E-01	0.0049	1.20E-01
Naissains 2011 2012 (19 )	0.0001	2.29E-01	<b>0.0008</b>	1.61E-02	0.0003	1.83E-01	<b>0.0075</b>	9.45E-04
<i>Naissains 2011 et 2012 (Lots Communs)</i>	0	3.71E-001	0.0004	2.28E-01	0.0002	2.29E-01	0.0035	1.16E-01

Tableau 2. Résultat de différenciation génétique (F<sub>ST</sub>) en fonction des échantillonnages et probabilités associées (les valeurs de F<sub>ST</sub> significativement différentes de zéro sont indiquées en gras)

Une analyse multivariée (Figure 8) permet de visualiser que les échantillons de populations d'adultes se ressemblent fortement et que seule celui de la Corse apparaît clairement se détacher sur l'axe 1 de l'analyse.

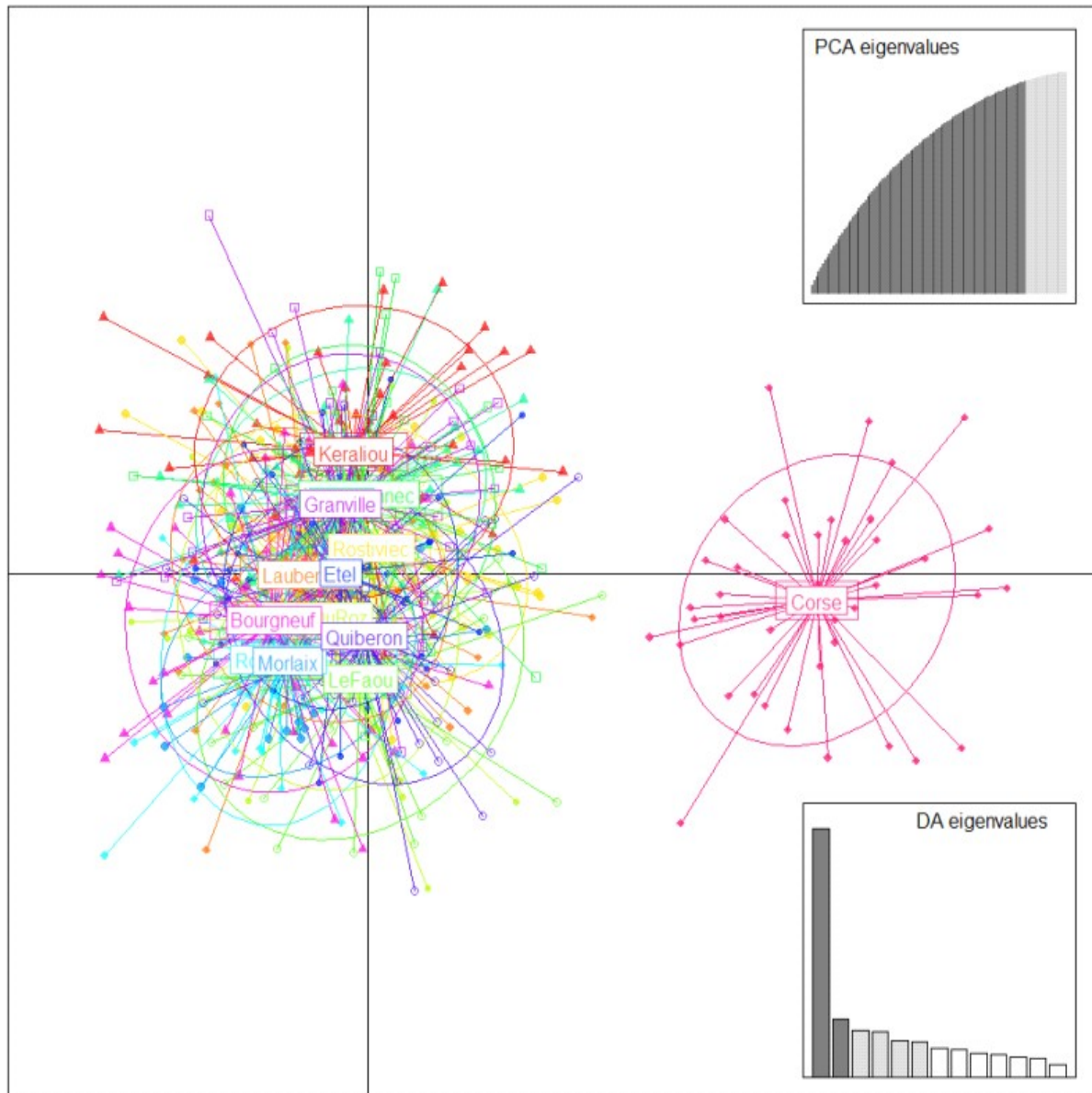


Figure 8. Analyse en Composantes Principales des fréquences alléliques des populations adultes échantillonnées

Lorsque l'on s'intéresse plus particulièrement aux échantillons adultes de la rade de Brest, la seconde ligne du tableau 2 met en évidence que l'on observe toujours une différence génétique entre ces échantillons, mais seulement avec les marqueurs de type SNPs, ce qui est attendu car leur grand nombre permet des tests plus puissants, et donc permettent de détecter des différences plus fines, ce qui est important à cette échelle d'étude.

Une analyse multivariée permet également d'identifier les populations qui se différencient davantage des autres. Ainsi, l'axe 1 permet de séparer les échantillons de Keraliou (LIO) et Roscanvel (VEL) entre eux et l'axe 2 ces deux échantillons de l'ensemble des autres. Ces deux populations se situent dans la partie est de la rade de Brest (Figure 10).

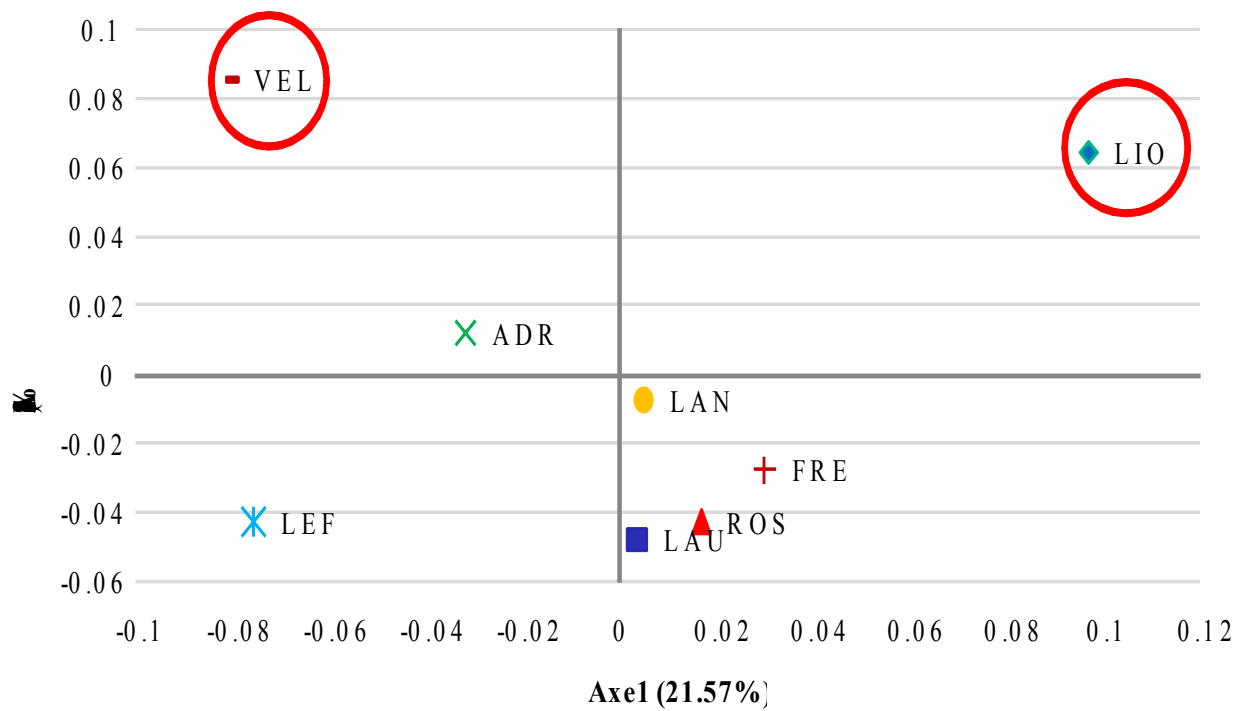


Figure 9. Analyse en Composantes Principales des fréquences alléliques des populations adultes échantillonnées dans la Rade de Brest

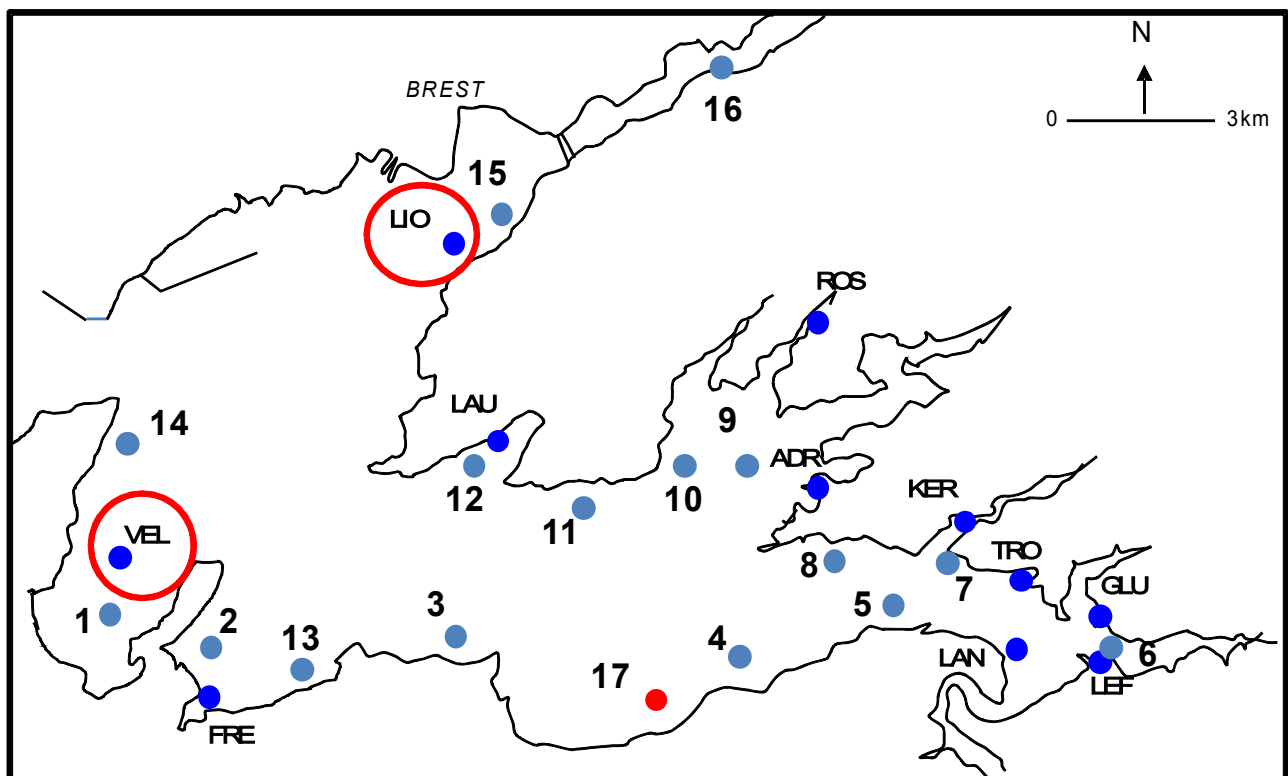


Figure 10. Localisation des populations adultes de Roscanvel (VEL) et Keraliou (LIO) au sein de la rade de Brest

L'analyse des échantillons de naissains captés en 2011 (ligne 3 du tableau 2) ne met en revanche pas en évidence de différenciation entre les différents échantillons. Cependant, l'analyse des échantillons de naissains captés en 2012 (ligne 4 du tableau 2) montre que l'on observe des valeurs significativement différentes de 0 pour les 119 SNPs (0,13%) et les 4 SNPs outliers (0,1%), mais pas pour les 115 SNPs non outliers.

Ainsi, les différences entre ces échantillons sont faibles mais significatives, et mises en évidence principalement par les 4 marqueurs outliers (inclus dans les 119 SNPs).

On retrouve ce même type de résultats lorsque l'on réalise l'analyse en mélangeant les naissains captés en 2011 et 2012 (ligne 6 du tableau 2).

Il semblerait donc que certains échantillons de naissains captés en 2012 se différencient génétiquement de l'ensemble des autres échantillons de naissains. Ceci est confirmé par deux analyses distinctes:

- l'analyse des naissains captés en 2012 en enlevant ceux qui n'ont pas été captés en 2011, soit les échantillons NL15 et NL16,
- l'analyse de l'ensemble des échantillons communs entre les années 2011 et 2012, soit à nouveau en enlevant les échantillons NL15 et NL16 captés seulement en 2012.

Ces deux analyses (lignes 5 et 7 du tableau 2) ne mettent pas en évidence de différence entre les échantillons de naissains.

Ainsi, ce sont les deux échantillons captés en 2012 nommés NL15 et NL16 qui se différencient des autres échantillons, et ceci principalement grâce aux 4 marqueurs SNPs outliers (parmi les 119).

Une représentation plus fine du paramètre  $F_{ST}$  estimé par paire de population permet de visualiser ce type de résultat. Tout d'abord, on s'aperçoit facilement que les  $F_{ST}$  les plus importants sont mesurés entre l'échantillon d'adultes de Corse et l'ensemble de tous les autres échantillons que ce soit avec les 119 SNPs (Figure 11) ou les 115 SNPs (après avoir enlevé les 4 SNPs outliers; Figure 12). Ainsi la couleur bleue foncée ( $F_{ST}$  de 4 à 5%) est retrouvée sur la première ligne montrant les valeurs entre l'échantillon d'adultes de Corse et les autres.

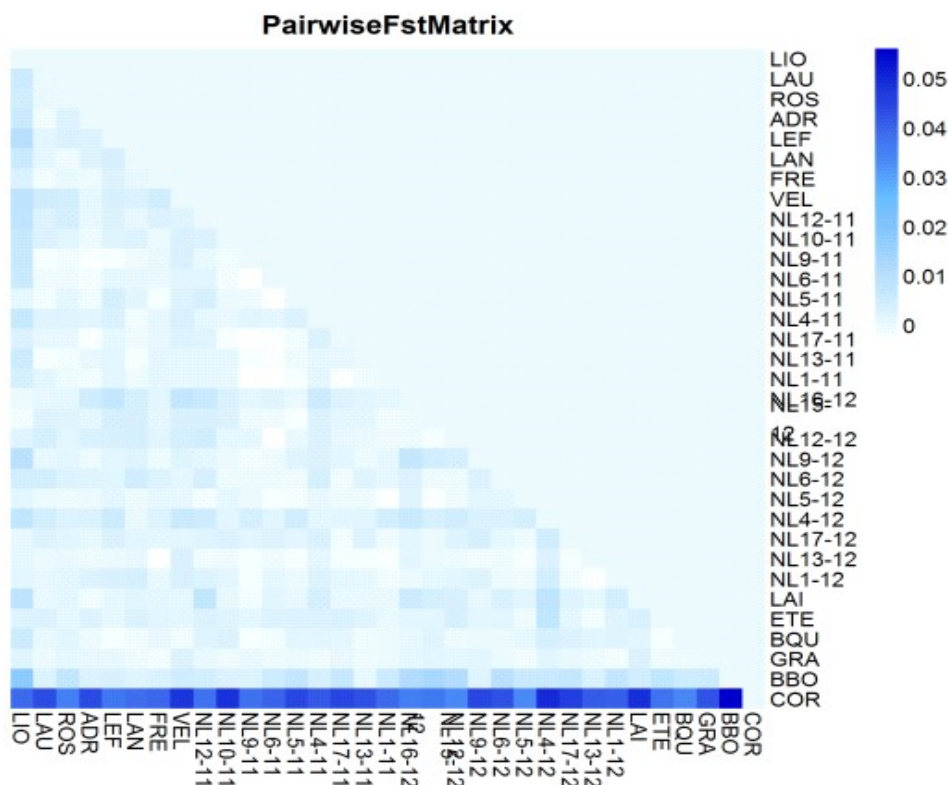


Figure 11.  $F_{ST}$  par paire d'échantillons de populations d'adultes et de naissains avec 119 SNPs

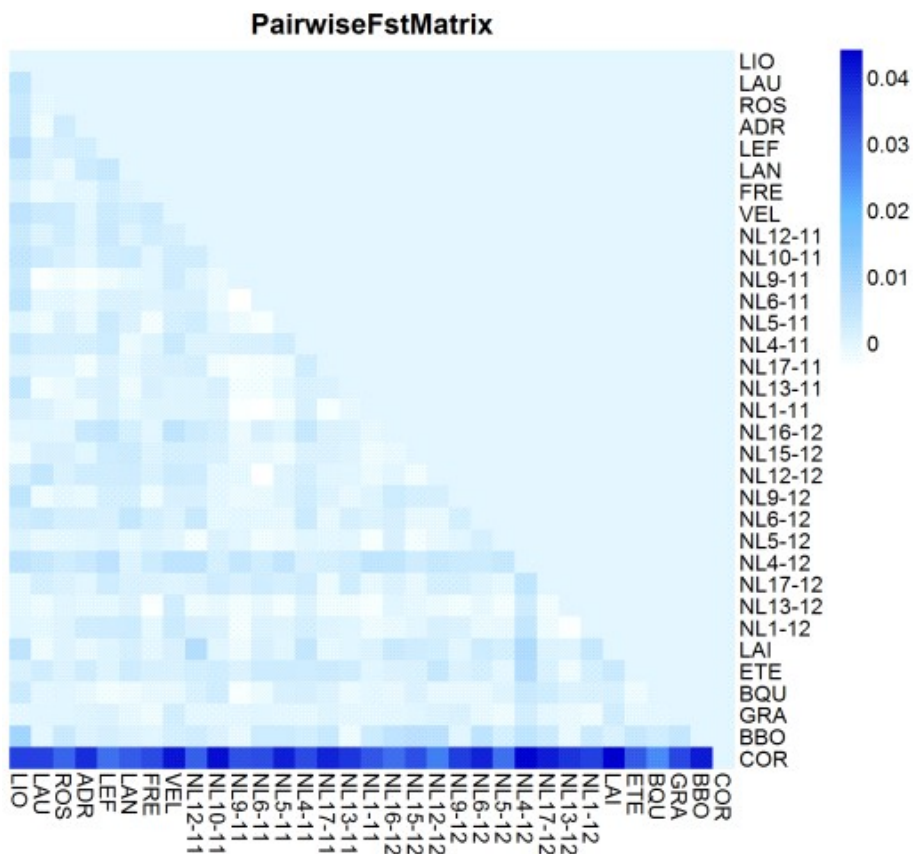


Figure 12.  $F_{ST}$  par paire d'échantillons de populations d'adultes et de naissains avec 115 SNPs

La même représentation avec seulement les 4 marqueurs SNPs (Figure 13) montre toujours la forte différenciation de la Corse des autres échantillons mais fait également apparaître les différences entre :

- les échantillons d'adultes de Roscanvel (VEL) et Keraliou (LIO) d'une part et les autres échantillons mais pas avec les échantillons de naissains NL15 et NL16 (Figure 13, flèches rouges),
- les échantillons des naissains NL15 et NL16 d'une part et les autres échantillons mais pas avec l'échantillon d'adulte de Keraliou (LIO) (Figure 13, flèches vertes).

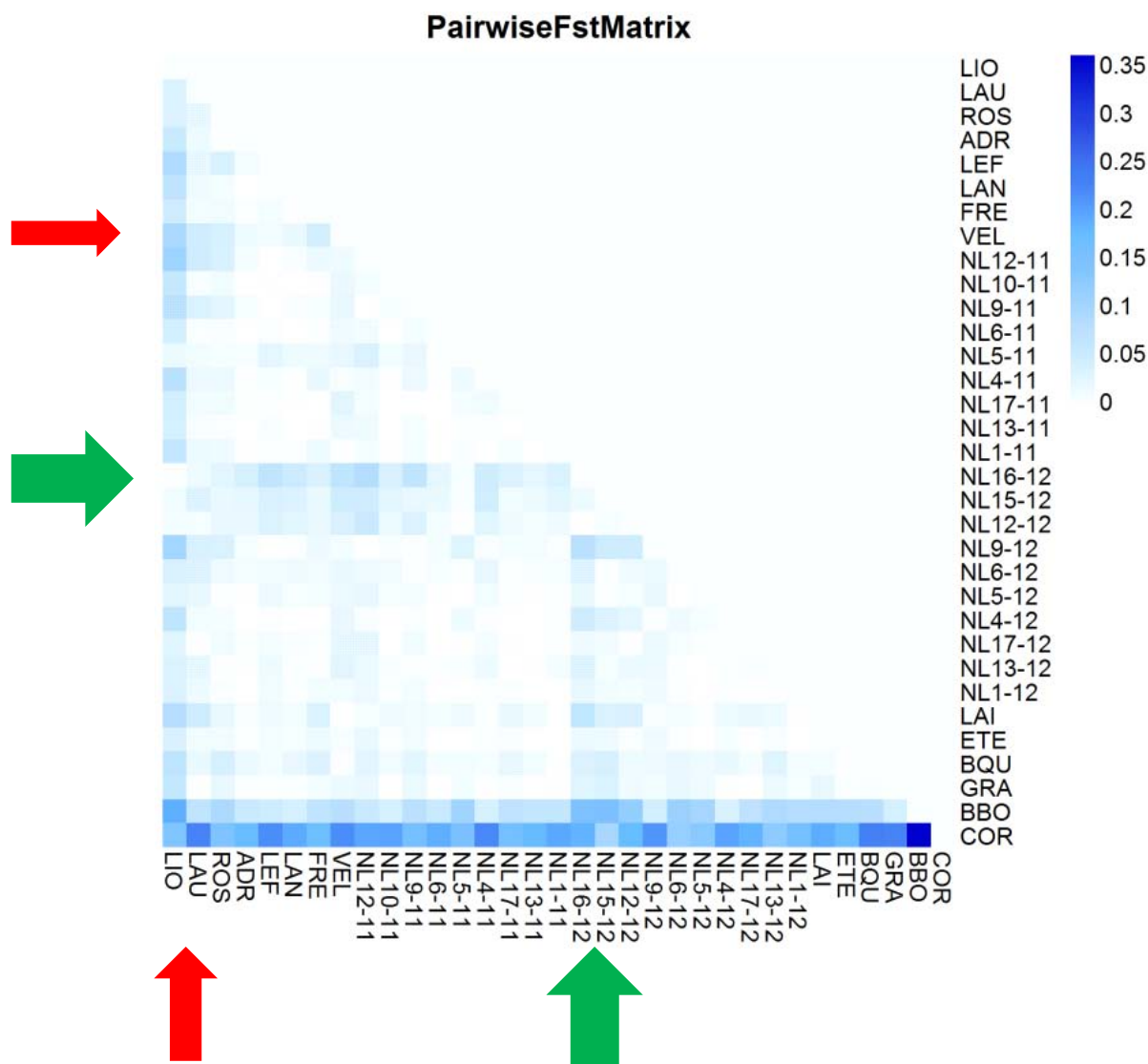


Figure 13.  $F_{ST}$  par paire d'échantillons de populations d'adultes et de naissains avec les 4 SNPs outliers. Les flèches rouges et vertes indiquent des observations remarquables.

Une analyse multivariée confirme ces observations (Figure 14) avec l'axe 1 qui éloigne les échantillons LIO (adulte Keraliou) et NL15 et NL16 (naissains seulement échantillonnés en 2012), et les axes 1 et 2 qui éloignent l'échantillon adulte de Roscanvel (VEL) de l'ensemble des autres échantillons.

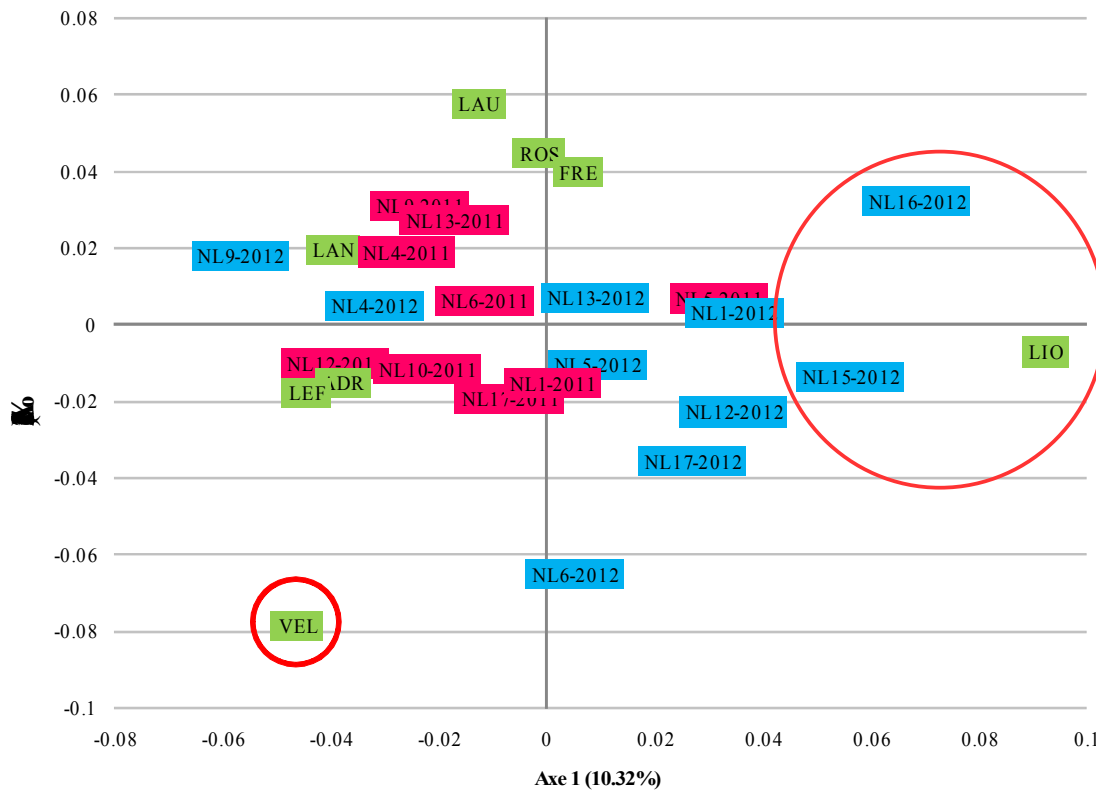


Figure 14. Analyse en Composantes Principales des fréquences alléliques de l'ensemble des échantillons de la rade de Brest. Les adultes sont en vert, les naissains captés en 2011 en rose et les naissains captés en 2012 en bleu.

Ces quatre échantillons particuliers se situent à l'est et nord-est de la rade de Brest avec en particulier les échantillons d'adulte LIO (Keraliou) et de naissains captés en 2012 NL15 et NL16 dans l'estuaire de l'Elorn (Figure 15).



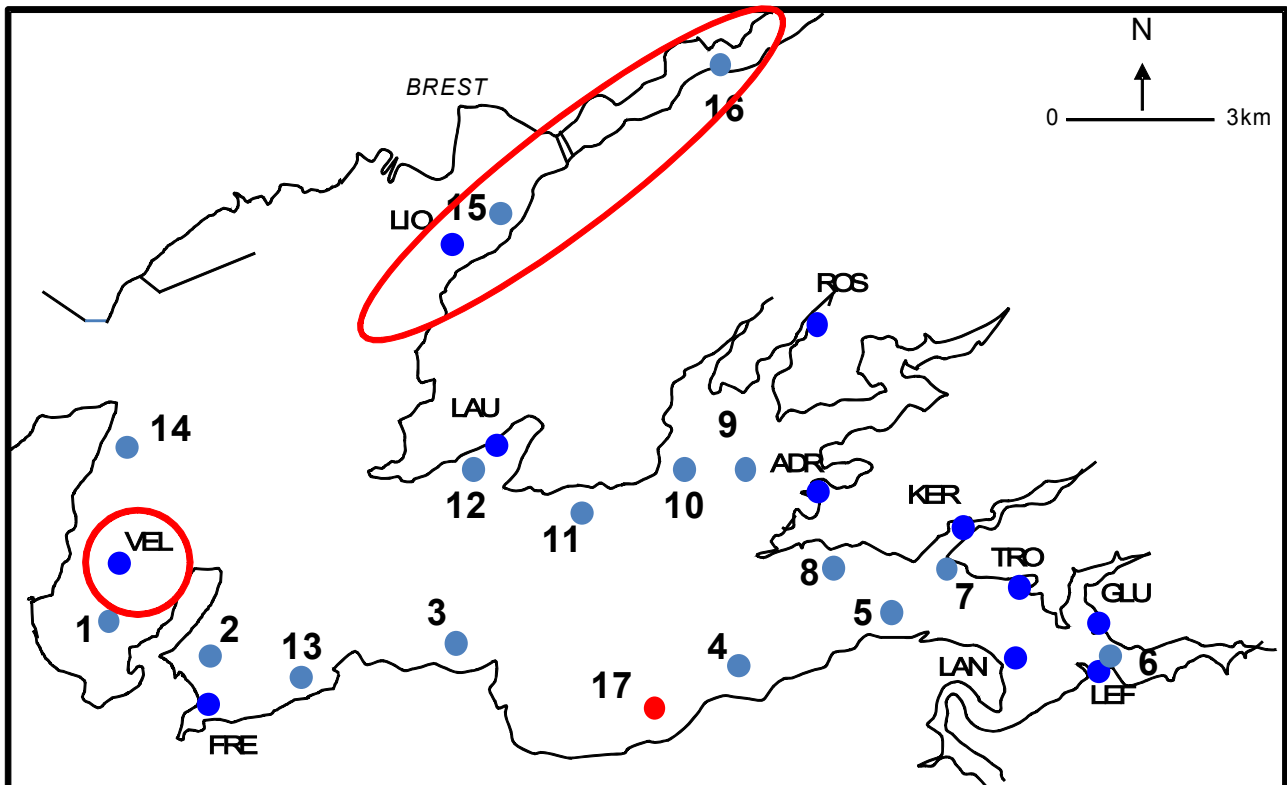


Figure 15. Localisation des populations adultes de Roscanvel (VEL) et Keraliou (LIO) et des naisains captés en 2012 (NL15 et NL16) au sein de la rade de Brest

Pour conclure sur cette analyse spatialisée de la distribution de la diversité et les deux derniers objectifs visés, il apparaît que:

- il existe un degré de similitude génétique très fort entre les sites colonisés et échantillonnés par des huîtres adultes au sein de la rade de Brest, avec des différences toutefois observées pour deux échantillons adultes situés dans l'est et le nord-est de la rade. Cette différence pourrait révéler soit des effets sélectifs dans cette zone ou plus probablement une faible barrière à la dispersion entre cette zone et les autres points de la rade. La barrière en question est cependant très faible car révélée uniquement avec les marqueurs les plus susceptibles de mettre en évidence des différences génétiques.
- dans sa grande majorité l'analyse temporelle réalisée sur des échantillons de naisains captés en 2011 et 2012 révèle une grande homogénéité spatiale et temporelle, sauf pour deux échantillons de l'estuaire de l'Elorn.

## Conclusion

Pour conclure, ces analyses génétiques ont permis de mettre en évidence que la diversité génétique des huîtres plates échantillonnées à l'échelle régionale est élevée, de même que à l'échelle locale de la rade de Brest. Ceci est vrai pour les échantillons d'adultes et de naissains au sein de la rade, montrant que les générations produites résultent de l'accouplement d'un nombre très important d'animaux.

Cette diversité se répartit de façon globalement homogène entre et à l'intérieur des populations, mettant en évidence un fort brassage génétique au sein de la rade de Brest. La différenciation la plus marquée se fait par comparaison de l'échantillon de la Corse avec les autres échantillons. Cependant les marqueurs SNPs apportent des informations fines, non détectées par les marqueurs microsatellites, concernant une différenciation apparente de deux groupes d'échantillons situés à l'est et le nord-est de la rade: l'échantillon d'adultes de Roscanvel (VEL) d'une part, et les échantillons d'adultes de Keraliou (LIO) et de naissains captés en 2012 (NL15 et NL16) d'autre part. Ces différences sont en particulier mises en évidence par 4 marqueurs SNPs sans qu'il ne soit possible d'identifier l'origine de cette différence.

Il est notable que ces deux groupes ont également été identifiés dans l'analyse spatiale de la connectivité par un modèle hydrodynamique 3D (SP1), ce qui permet de poser l'hypothèse de légères barrières à la dispersion en fonction de l'hydrodynamisme au sein de la rade de Brest.

Il serait dans ce contexte intéressant de pousser l'analyse de cette partie de la rade en échantillonnant de façon plus systématique et hiérarchique les stocks depuis le fond de l'Elorn jusqu'à l'Ouest et au Sud de la sortie de de l'Elorn.

## Références bibliographiques

- Diaz-Almela E., Boudry P., Launey S., Bonhomme F., Lapègue S., 2004. Reduced gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity*, 95(6):510-516.
- Dupont L., Ellien C., Viard F., 2007. Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Marine Ecology Progress Series*, 349: 125-138.
- Harrang E., 2012. Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle. Thèse de l'Université de La Rochelle. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00127/23785/>
- Harrang E., Lapègue S., Morga B., Bierne N., 2013. A high load of non-neutral amino-acid polymorphisms explains high protein diversity despite moderate effective population size in a marine bivalve with sweepstakes reproduction. *Genes Genomes Genetics*, 3, 333-341.
- Lallias D., Stockdale R., Boudry P., Beaumont A.R., Lapègue S., 2009. Characterization of 27 microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 960-963.
- Lapègue S., Harrang E., Heurtebise S., Flahauw E., Donnadiou C., Gayral P., Ballenghien M., Genestout L., Barbotte L., Mahla R., Haffray P., Klopp C., 2014. Development of SNP genotyping arrays in two shellfish species. *Molecular Ecology Resources*, 14: 820-830.
- Launey S., Ledu C., Boudry P., Bonhomme F., Naciri-Graven Y., 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity*, 93(5), 331-338.
- Riquet F., 2012. Processus micro-évolutifs chez l'espèce invasive *Crepidula fornicata*. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie.

## **WP1 - SP3 : Situation des populations naturelles vis-à-vis des maladies parasitaires (bonamiose et marteiliose)**

### Objectifs

Ce sous-programme de travail s'intéresse au suivi des infections à *Bonamiaostreae* et *Marteiliarefringens* chez les jeunes stades puis les stades adultes d'huître plate *Ostreaedulis* sur les deux sites principaux de captage, Rade de Brest et Baie de Quiberon, et un site de grossissement, Cancale.

Aussi les objectifs principaux étaient:

*O1 - Suivi de l'infection à Bonamia ostreae chez les jeunes stades d'huîtres plates sur Brest et Quiberon*

*O2 - Suivi de cohortes vis-à-vis des infections à Bonamia ostreae et Marteilia refringens sur Brest, Quiberon et Cancale*

*O3 – Etude de la diversité des parasites détectés*

Par ailleurs, un objectif complémentaire avait également été identifié:

*O4 -Etablir le statut de deux gisements naturels (Bourgneuf et Granville) vis-à-vis de ces deux maladies parasitaires*

### Méthodes

#### Prélèvements

Afin de répondre à l'objectif O1, il était envisagé de prélever sur Quiberon et Brest des géniteurs ardoisés ainsi que du naissain chaque mois entre octobre et mars.

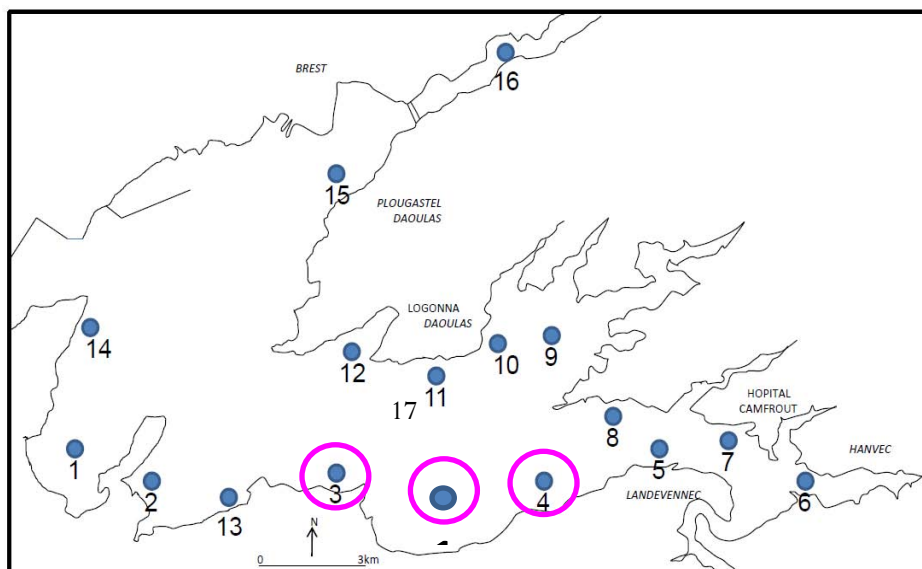
Le tableau 1 présente le nombre d'huîtres adultes et de pools de larves correspondants obtenus par site et par année.

		2011	2012	2013
Quiberon	Adultes	22	57	46
	Larves (pools)	22	57	46
Brest	Adultes	48 (3 ardoisés)	6	12
	Larves (pools)	3	6	12

*Tableau 1. Nombre de géniteurs ardoisés et de pools de larves correspondants obtenus par an et par site*

D'octobre 2011 à mars 2012, 30 à 50 naissains (captés en été 2011) ont été prélevés chaque mois sur Quiberon et sur différents points de la rade de Brest (Figure 1). Un prélèvement en Décembre 2011 n'a pu être réalisé sur Quiberon en raison du mauvais temps.

D'octobre à Décembre 2012, de nouveaux prélèvements de naissain capté en été 2012 ont été réalisés mensuellement sur Brest (point 17 = Lomergat) tandis que faute de captage satisfaisant en 2012, aucun prélèvement n'a pu être réalisé sur cette période à Quiberon.



Source : CRC Bretagne-Nord

Figure 1. Localisation des points de prélèvement en rade de Brest (cercles rouges)

Afin de répondre à l'objectif O2 il était envisagé de conditionner du naissain d'environ 9 mois capté à Brest et à Quiberon en 2011 (= cohorte 1) en demi-poches maintenues dans des cages (100 individus/poche, figure 2) et de positionner des poches de naissain des 2 origines sur Cancale et des poches de naissain local sur Brest et Quiberon.

Cette approche a été répétée en utilisant du naissain capté à Brest et à Quiberon en 2012 (= cohorte 2).

Le naissain 2011 a été positionné dans ces conditions en juin-juillet 2012 (21 juin à Brest, 18 juin à Quiberon et 4 juillet à Cancale) sur les 3 sites (figure 3).

Le naissain 2012 a été positionné de la même façon en avril-mai 2013 (16 mai à Brest, 25 avril à Quiberon et 24 mai à Cancale).



Source : CRC Bretagne-Nord

Figure 2. Cages accueillant les demi poches positionnées sur Cancale

Un prélèvement de naissain de chaque origine Brest et Quiberon a été effectué pour analyse lors de la mise sur site puis un prélèvement d'une poche par condition et site devait être réalisé tous les 3- 4 mois.

Les dates de prélèvements pour les deux cohortes sont précisées en annexe2.

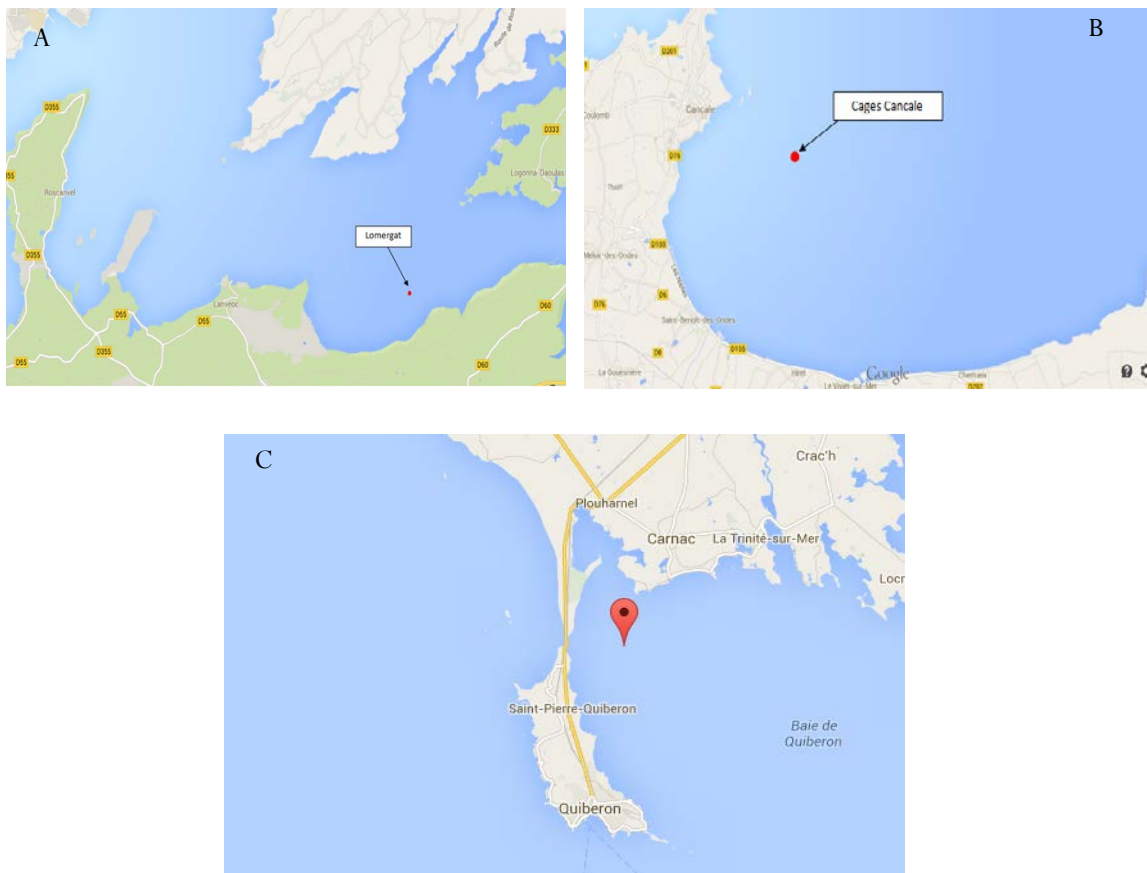


Figure 3. Position des cages en rade de Brest (A), baie de Cancale (B) et baie de Quiberon (C)

Afin de répondre à l'objectif O4 il était envisagé un prélèvement de 150 individus à Granville et 2 prélèvements de 150 individus à Bourgneuf (adultes de préférence).

Finalement, un prélèvement a été réalisé en avril 2012 sur le gisement de Granville et en février 2013 en Baie de Bourgneuf.

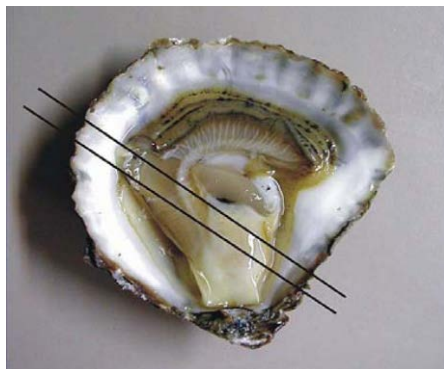
### Traitement des prélèvements

Dans le cadre des objectifs O1 et O2, 30 à 60 individus par prélèvement ont été traités de la façon suivante :

- ouverture de la coquille
- division des tissus en 2 parties égales
- fixation d'une partie en solution de Davidson pour des analyses en histologie
- fixation de l'autre partie en éthanol absolu pour des analyses en biologie moléculaire

Dans le cadre de l'objectif O4, 150 individus ont été traités de la façon suivante:

- ouverture de la coquille
- fixation d'une section de tissus (figure 4) en solution de Davidson pour des analyses en histologie
- fixation d'un morceau de branchies et de glande digestive en éthanol absolu pour des analyses en biologie moléculaire



Source : LGPMM Ifremer

Figure 4. Section de tissu prélevée pour les analyses en histologie

Les tissus fixés en Davidson ont été transvasés en éthanol 70 au bout de 48 heures puis inclus en paraffine et conservés pour des analyses en histologie.

Les tissus fixés en éthanol ont fait l'objet d'extraction d'ADN en utilisant le QIAamp DNA mini kit de QIAGEN. La concentration de l'ensemble des extraits d'ADN a été mesurée au NanoDrop et ajustée en eau à 100 ng/ $\mu$ l.

## Analyse des prélèvements

### 1. Analyses en biologie moléculaire

Dans le cadre des objectifs O1, O2 et O4, les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons ont été analysés en PCR en utilisant des amorces dites « universelles » dessinées pour amplifier une région conservée du gène 18S (Le Roux et al. 1999). Cette étape nous permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR et ainsi de vérifier qu'un résultat négatif obtenu par PCR spécifique n'est pas lié à la présence de ces inhibiteurs.

Les essais de PCR dite « universelle » réalisés ont en général permis d'observer une amplification pour l'ensemble des échantillons à 100 ng/ $\mu$ l. Lorsque ce n'était pas le cas, les concentrations d'ADN ont été ajustées à 50ng/ $\mu$ l et les essais de PCR universelle ont été réitérés de façon à vérifier l'absence d'inhibiteurs dans ces échantillons.

Les extraits d'ADN ont alors pu être analysés en PCR pour la détection :

des parasites du genre *Bonamia* (Cochennec et al. 2000)

du parasite *Marteilia refringens* (Le Roux et al. 2001)

du virus OsHV-1 (Martenot et al. 2010)

Les protocoles utilisés pour la détection de *Bonamia* sp. et *Marteilia refringens* par PCR sont accessibles sur le lien suivant : <http://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>;

Pour étudier la diversité des parasites détectés (objectif O3), des analyses complémentaires ont été réalisées en PCR de façon à amplifier certaines régions du génome parasitaire :

les amorces MT1-MT2 et MT1B-MT2B ont été utilisées en PCR nichée pour amplifier un fragment de la région IGS de *Marteiliarefringens* (Lopez-Flores et al. 2004)

les amorces Bo et LSUD (amorce universelle eucaryotes) ont été utilisées en PCR pour amplifier un fragment de la région 18S-ITS1-5.8S et ITS2 de *Bonamiasp.*

Certains échantillons de petit naissain ont également été testés en PCR pour vérifier s'il s'agissait d'*Ostrea edulis* ou de *Crassostrea gigas* (Wang & Guo, 2008). Un seul individu sur 375 analysés par cet outil s'est révélé être de l'huître creuse, ce qui n'a pas remis en question les analyses réalisées pour la détection de *Bonamiaostreae* et *Marteiliarefringens*.

Les produits de PCR obtenus ont fait l'objet d'analyses complémentaires en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les profils obtenus ont été analysés en gel d'agarose à 2% afin de préciser l'espèce de *Bonamia* et le type de *Marteiliarefringens* détectés.

Les protocoles utilisés pour la caractérisation et le typage de *Bonamiasp.* et *Marteiliarefringens* par RFLP sont accessibles sur le lien suivant : <http://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>

Enfin, dans le cadre de l'objectif O3, certains produits de PCR obtenus ont été séquencés afin d'évaluer la variabilité des parasites détectés dans les échantillons testés.

## 2. Analyses en histologie et hybridation *in situ*

Certains individus détectés positifs en PCR à *Bonamia* sp. et/ou *Marteilia refringens* ont été analysés en histologie et/ou hybridation *in situ* afin de décrire les niveaux d'infection et la distribution des parasites dans les huîtres.

Après fixation en Davidson, les tissus sont progressivement déshydratés puis inclus en paraffine. Des coupes (2µm d'épaisseur) de tissus sont alors préparées à partir de ces blocs de paraffine puis colorés à l'hémalun-éosine avant d'être observées au microscope photonique.

Certaines coupes (5µm d'épaisseur) ont été analysées en hybridation *in situ* afin de détecter et localiser *Marteilia refringens* (Le Roux et al. 1999) et *Bonamia* sp. (Cochennec et al. 2000).

Les protocoles utilisés pour la détection de *Bonamia* sp. et *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* et en histologie sont accessibles sur le lien suivant : <http://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>.

Résultats*O1 - Suivi de l'infection à Bonamia ostreae chez les jeunes stades d'huîtres plates sur Brest et Quiberon*

Les résultats obtenus en PCR pour la détection de *Bonamia* sp., de *Marteilia refringens* et d'OsHV-1 sont présentés en rouge, vert et orange dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 2 et 3).

Géniteurs ardoisés et larves

	Quiberon						Brest					
	2011		2012		2013		2011		2012		2013	
	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L
<i>Bonamia</i> sp.	0/22	0/22	2/57	0/57	1/46	2/46	5/48*	0/3	0/6	0/6	0/12	0/12
<i>Marteilia refringens</i>	0/22	0/22	0/57	0/57	0/46	0/46	26/48*	0/3	0/6	0/6	0/12	0/12
OSHV-1		0/22		2/20		1/20		1/3		2/6		0/12

\* sur ces 48 adultes, seuls 3 étaient ardoisés.

Tableau 2. Synthèse des résultats obtenus en PCR pour la détection de *Bonamia* sp., *Marteilia refringens* et *OsHV-1* sur les échantillons d'adultes ardoisés (A) et de pools de larves (L) prélevés à Quiberon et Brest en 2011, 2012 et 2013.

Ainsi on peut noter l'absence de détection de *Marteilia refringens* sur l'ensemble des échantillons testés à l'exception du lot d'adultes prélevés en rade de Brest en été 2011 qui présente une prévalence de 54%. Ce même lot présentait une prévalence d'infection à *Bonamia* sp. de 10%.

Trois adultes ardoisés prélevés à Quiberon ont été détectés positifs en PCR à *Bonamia* sp., 2 en 2012 et 1 en 2013. Deux pools de larves obtenus à Quiberon en 2013 sont également apparus positifs en PCR dont un pool correspondant à un géniteur positif.

Ces résultats confirment des résultats précédemment obtenus sur les larves d'huître plate : *Bonamia* sp. peut infecter les stades larvaires notamment pendant leur phase d'incubation dans l'huître adulte (Arzul et al. 2011). Cependant, considérant les faibles fréquences de détection, la transmission du parasite adulte-larves ne semble pas fréquente.

Les produits de PCR obtenus ont fait l'objet de digestion enzymatique afin d'orienter le diagnostic de *Bonamia* sp. vers une espèce et *Marteilia refringens* vers un génotype. Les profils obtenus suggèrent que les huîtres positives en PCR *Bonamia* sp. sont infectées par *Bonamia ostreae* et que les huîtres positives en PCR *Marteilia refringens* sont infectées par *M. refringens* type O. Cependant, certains produits de PCR ont également été séquencés afin de confirmer ces premiers résultats et d'évaluer la variabilité des parasites détectés (voir partie O3).

Enfin, les pools de larves ont été analysés en PCR pour la détection d'OsHV-1. Plusieurs de ces pools apparaissent positifs sur les deux sites. Des travaux sont en cours pour caractériser le génotype d'OsHV-1. Les charges virales détectées sont faibles (< 100 copies de virus par réaction de PCR) à l'exception du pool de larves de Quiberon détecté positif en 2013 qui présente une charge virale supérieure à 10 000 virus par réaction de PCR.



Suivi mensuel du naissain

	Quiberon 2011	Brest 2011 *	Brest 2011 **	Brest 2012 *
Octobre	0/30	0/50	0/50	4/50
Novembre	0/30	0/50	1/50	1/50
Décembre	-	0/50	0/50	4/50
Janvier	0/500/10	0/500/10	0/50	0/36
Février	0/500/10	0/500/10	1/46	1/50
Mars	0/5016/20	0/4916/20	0/47	1 - 8/500/20

\* Brest : point 17

\*\* Brest : points 3 &amp; 4

Tableau 3- Prélèvements réalisés et résultats obtenus en PCR pour la détection de *Bonamia* sp. (rouge), de *Marteilia refringens* (vert) et *OshV-1* (orange) dans le cadre de l'objectif O1

En 2011, quelle que soit l'origine du naissain, les jeunes huîtres de moins de 1 an analysées sont apparues négatives en PCR vis-à-vis de *Bonamia* sp. et *Marteilia refringens* à l'exception du lot prélevé sur les points 3-4 (voir figure 1) en rade de Brest qui présentait 1/50 (2%) individu positif vis-à-vis de *Marteilia refringens* en Novembre 2011 et 1/46 (2%) individu positif vis à vis de *Bonamia* sp. en février 2012.

En 2012, les jeunes huîtres testées apparaissent positives en PCR pour la détection de *Marteilia refringens* dès le mois d'octobre (≈ 3 mois). *Bonamia* sp. est détecté sur 1 individu (2%) en mars 2013.

Les profils obtenus après digestion enzymatique des produits de PCR suggèrent que les huîtres positives en PCR *Bonamia* sp. sont infectées par *Bonamia ostreae* et que les huîtres positives en PCR *Marteilia refringens* sont infectées par *M. refringens* type O. Les produits de PCR les plus intenses ont également été séquencés afin de confirmer ces premiers résultats et d'évaluer la variabilité des parasites détectés (voir partie O3).

OshV-1 apparaît présent dans de nombreux animaux testés (80%) en mars 2011 sur les deux sites Quiberon et Brest tandis qu'il n'est pas détecté sur le naissain de Brest en mars 2012. Afin d'identifier la période à laquelle le naissain 2011 s'est infecté, des animaux prélevés en janvier et février 2012 ont été testés et sont apparus négatifs suggérant donc que l'apparition d'OshV-1 dans ces huîtres se produit entre février et mars. De même que pour les pools de larves, des travaux en biologie moléculaire sont en cours pour caractériser OshV-1. Les charges virales détectées sont généralement comprises entre 500 et 1000 copies par réaction de PCR.

D'autres points de la rade de Brest ont fait l'objet d'analyses en PCR vis-à-vis de la présence de *Marteilia refringens* et *Bonamiasp.* Certains prélèvements sont apparus positifs, cependant, au vu de la ponctualité de ces prélèvements, l'absence de détection des parasites ne nous permet pas de conclure quant à leur réelle absence sur ces sites. Les résultats obtenus sont présentés en annexe (Annexe 1) à titre d'information.

### Description de la dynamique d'infection à *Marteilia refringens*

Le suivi mensuel réalisé sur le naissain capté en 2012 à Lomergat, en rade de Brest (point 17, figure 1) ayant révélé la présence d'ADN de *Marteilia refringens* dès le mois d'octobre, nous avons souhaité décrire l'évolution du parasite en histologie. Les animaux détectés positifs en PCR ont alors fait l'objet d'observation au microscope.

Certains animaux positifs en PCR n'ont pas été retrouvés infectés en histologie ce qui peut être dû à une sensibilité moindre de l'histologie en particulier lorsque les niveaux d'infection sont faibles. La présence de jeune stade ou stade primaire est surtout notée dans l'épithélium de l'estomac (figures 5A et F) à l'automne puis au printemps. Les stades les plus matures ou stades réfringents sont observés dans l'épithélium, voire la lumière des diverticules digestifs (figures 5B et E) en novembre - décembre.

La figure 6 synthétise les données disponibles concernant la dynamique de *Marteilia refringens* sur le naissain suivi à Brest en 2012-2013 : les fréquences de détection du parasite *Marteilia refringens* en PCR, en histologie ainsi que la fréquence d'observation de stades avancés du parasite (stades dits « C3 »). La présence de ces stades de parasite indique que l'infection est avancée et que le parasite peut sortir de son hôte.

Ainsi en automne 2012, il est possible d'observer une augmentation de la fréquence de détection du parasite, notamment des stades matures, ce qui suggère que de nouvelles huîtres sont infectées et que l'infection se développe au sein des huîtres parasitées. Puis le parasite n'est plus ou très peu détecté en janvier-février ce qui peut s'expliquer par d'éventuelles mortalités des huîtres infectées ou par un relargage complet des parasites entre décembre et janvier. Enfin, de nouvelles infections surviennent entre février et mars 2013.

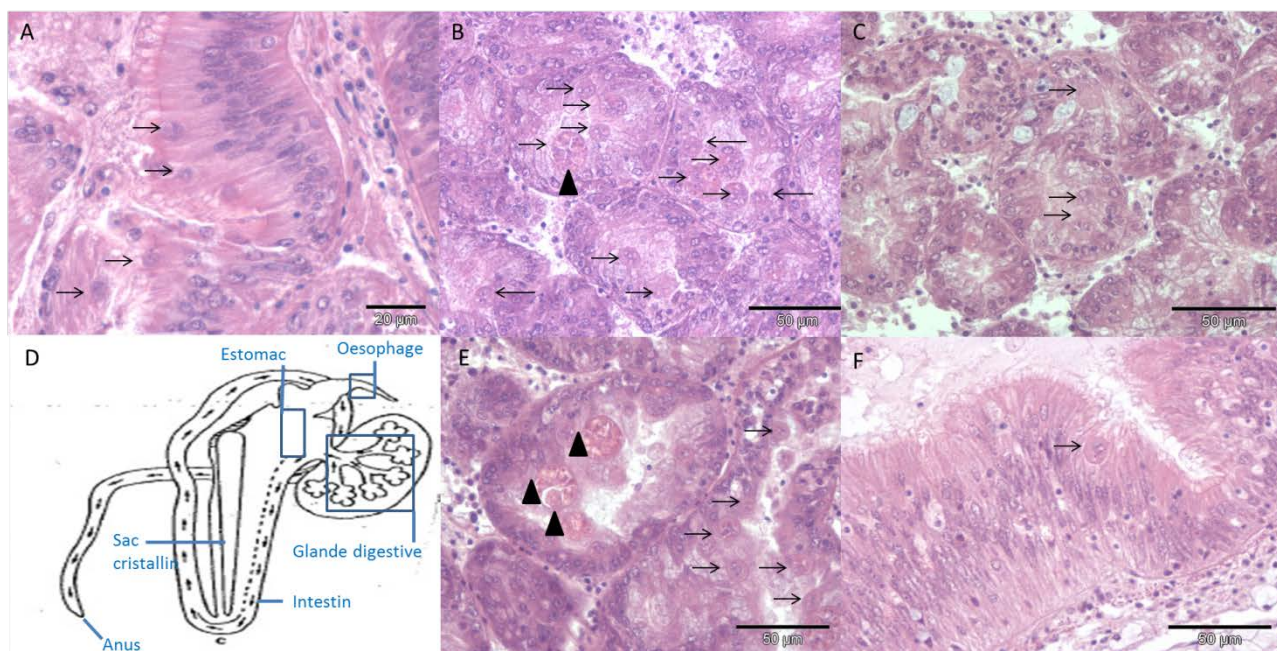


Figure 5. Sections histologiques colorées en hémalun et éosine. Présence de parasites *Marteilia refringens* (stades non matures → et stades réfringents ▲) dans du naissain collecté à Lomergat en octobre 2012 (A), novembre-décembre 2012 (B et E) et mars 2013 (C et F). D = Représentation schématique de l'appareil digestif d'huître (d'après Lebesnerais, 1985)

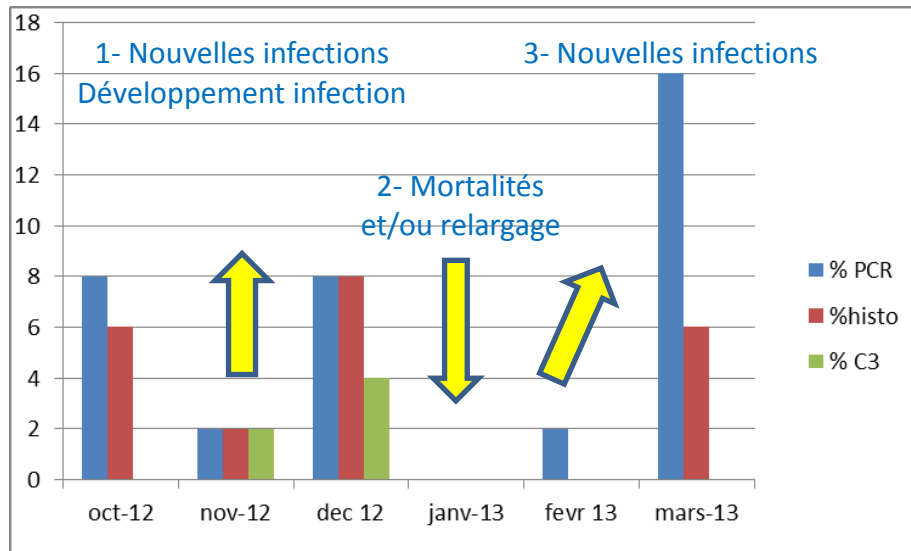


Figure 6. Evolution des fréquences de détection de *Marteilia refringens* en PCR, en histologie et des stades matures du parasite (C3) en fonction des mois de prélèvement sur le site de Lomergat (rade de Brest)

Considérant l'absence de détection de *M. refringens* dans les prélèvements réalisés en 2011-2012 et la détection presque continue du parasite en 2012-2013, nous avons comparé les données de température et de salinité disponibles au plus près du naissain, à savoir sur le site de Lanvéoc (point 13 figure 1) pour les années 2011 et 2012 (Figure 7) plus particulièrement entre août et octobre. Contrairement à la température, la salinité ne présente pas de différence sur cette période de l'année entre 2011 et 2012. La température relevée en 2011 ne dépasse pas 17°C alors qu'en 2012 elle est au-dessus de ce seuil thermique de juillet à septembre. Cette différence peut expliquer la différence de détection du parasite observée entre 2011 et 2012. En effet, des précédents travaux réalisés en culture ostréicole avaient montré que l'infection d'huîtres survenait lorsque la température était au-dessus de 17°C (Audemard et al. 2001). La moyenne et l'écart type des températures relevées sur ce site entre 1993 et 2013 suggèrent que 2011 est une année « atypique » (= plus froide) sur cette période de l'année.

### Évolution annuelle de la température et de la salinité à Brest

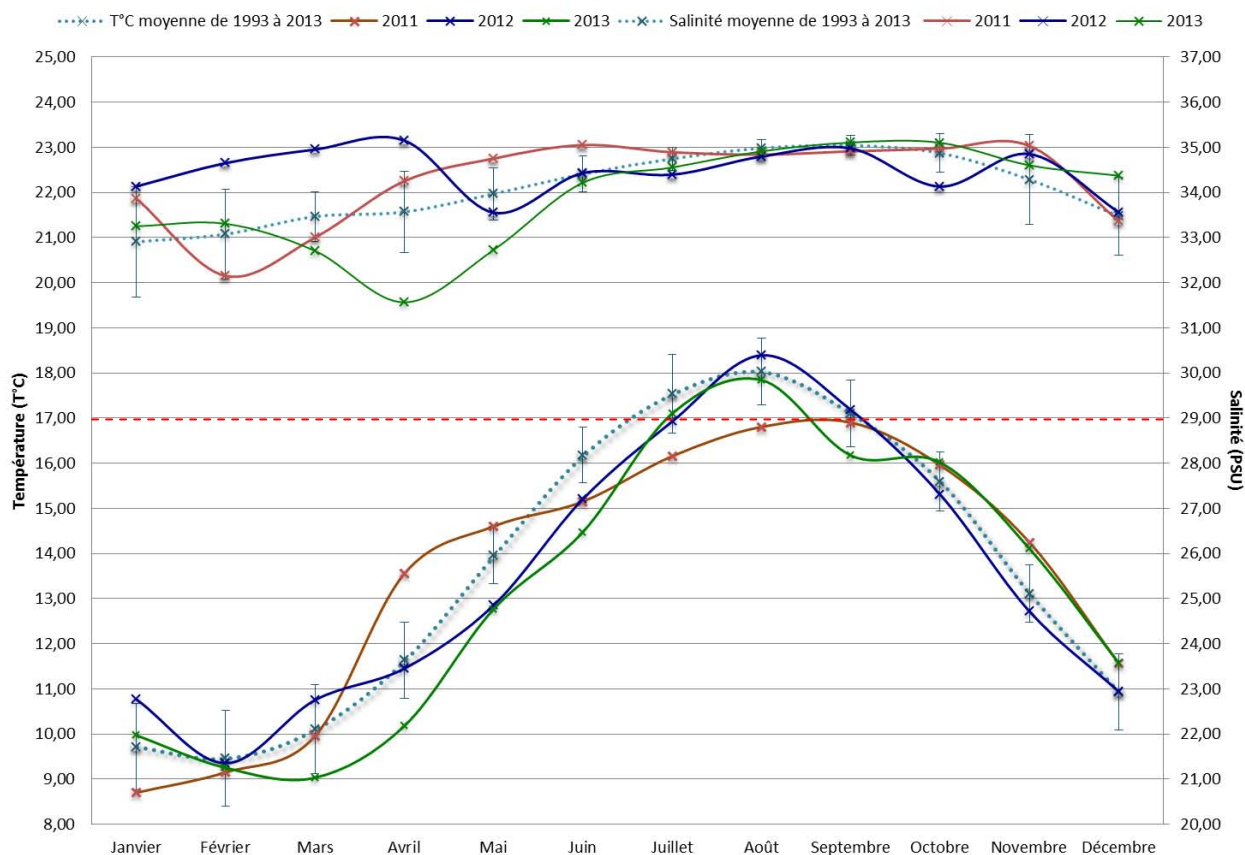


Figure 7. Evolution mensuelle de la température et de la salinité à Lanvéoc (rade de Brest) en 2011, 2012, 2013 ainsi que les moyennes et écart types sur 1993-2013 (données REPHY). Le seuil de température de 17°C est indiqué en pointillés rouges.

#### O2 Suivi de cohortes vis-à-vis des infections à *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*

Les dates des prélèvements réalisés dans le cadre de cet objectif sont présentées en Annexe 2

#### Suivi des mortalités

Le naissain originaire de Brest et de Quiberon a été déployé en juin-juillet 2012 (= cohorte 1) puis en avril-mai 2013 (= cohorte 2) sur Brest, Cancale ou Quiberon et Cancale en demi poches contenant entre 100 et 150 individus par poche. Une poche de chaque condition a été prélevée tous les 3-4 mois environ. Le nombre d'huîtres mortes et vivantes a été compté afin d'évaluer le pourcentage de mortalité pour chaque poche.

La figure 8 présente les pourcentages de mortalité observés dans chaque condition pour les cohortes 1 et 2.

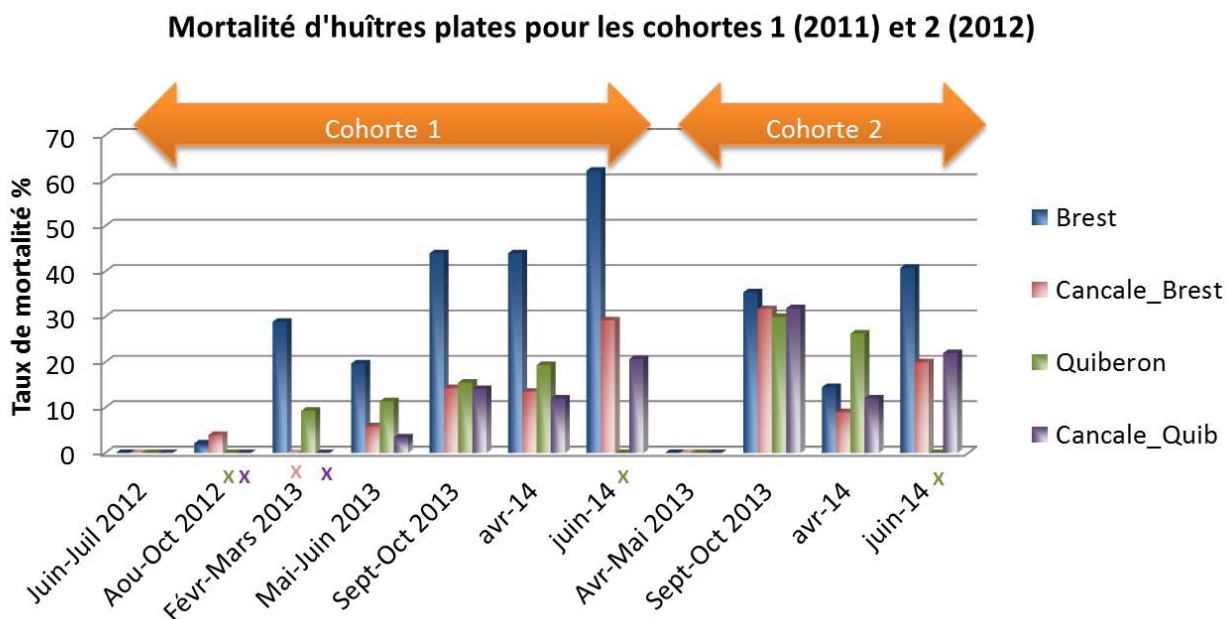


Figure 8. Evolution des mortalités (%) pour les cohortes 1 et 2 en fonction des périodes de prélèvement et des conditions testées (Brest, Quiberon, Cancale origine Brest et Cancale origine Quiberon). X = prélèvements non réalisés

Quels que soient la cohorte et la date de prélèvement, les mortalités observées sur Brest sont supérieures à celles des autres sites ( $p=0,0719$ ), elles atteignent 40% lorsque les huîtres de la cohorte 1 ont 2 ans et 60% 9 mois plus tard. Les deux origines de naissain sur Cancale ne présentent pas de mortalités significativement différentes ( $p=0,95$ ). Enfin, les données disponibles (données manquantes pour la période de juin 2014) ne nous permettent pas d'observer des différences significatives entre Quiberon et Cancale.

Les mortalités observées sur la cohorte 2 semblent augmenter plus rapidement que pour la cohorte 1. En effet, les 4 conditions testées présentent 30% de mortalité dès le premier prélèvement (sept-oct 2013) c'est-à-dire lorsque les huîtres ont environ 1 an.

#### Suivi des infections à *Bonamia* sp. Et *Marteilia refringens* au sein de la cohorte 1

Pour chaque poche prélevée, 50 animaux ont fait l'objet d'analyses en PCR pour estimer la prévalence de *Bonamia* sp. Et *Marteilia refringens*. Les résultats de ces analyses ainsi que les pourcentages de mortalité sont présentés sur la figure 9.

Avant d'être déployé sur les trois sites, le naissain de Brest et de Quiberon a été analysé afin d'établir un point de référence. Les analyses étaient toutes négatives.

*Marteilia refringens* (représenté par les triangles verts) n'a été détecté que sur le naissain de Brest pour les prélèvements réalisés en septembre 2012 et 2013. Les prévalences restent modérées atteignant 12% en septembre 2012.

*Bonamia* sp. (représenté par les ronds rouges) a été détecté dans les trois sites et sur les deux origines de naissain. Des différences de dynamique d'évolution et d'intensité de prévalence sont cependant observées. La majorité (62%) des huîtres de Brest apparaissent infectées lorsque les huîtres ont 2 ans (mai-juin 2013).

Les huîtres de Quiberon s'infectent très peu et tardivement (2% à 2 ans et demi). Enfin, après 2 mois de séjour sur Cancale, 7% des huîtres originaires de Brest sont détectées positives en PCR. De nouvelles infections surviennent au cours de la 2ème année pour atteindre 14% de fréquence de détection en octobre 2013. En raison de l'absence de prélèvements d'huîtres originaires de Quiberon sur Cancale en août-octobre 2012 et février-mars 2013, nous ne pouvons conclure quant à la situation de ces huîtres au cours de leur première année sur Cancale. Néanmoins, nous pouvons noter qu'en 2ème année, ces huîtres s'infectent plus tardivement et plus fortement que celles originaires de Brest.

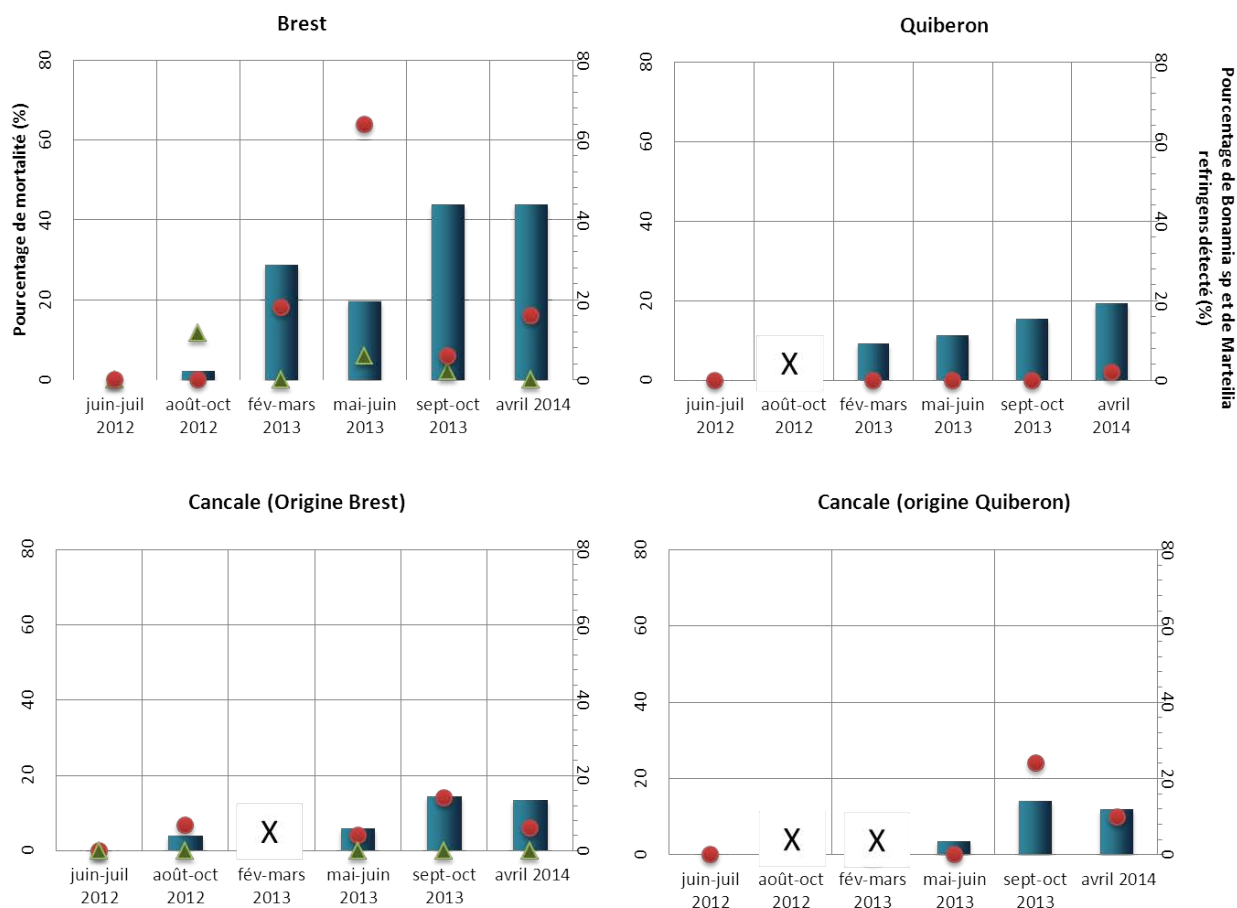


Figure 9. Evolution des mortalités (%), des fréquences de détection de *Marteilia refringens* (% ▲) et de *Bonamia sp.* (% ●) en fonction des périodes de prélèvement et des conditions testées (Brest, Quiberon, Cancale origine Brest et Cancale origine Quiberon). X = prélèvements non réalisés

Les profils obtenus après digestion enzymatique des produits de PCR suggèrent que les huîtres positives en PCR *Bonamia sp.* sont infectées par *Bonamia ostreae* et que les huîtres positives en PCR *Marteilia refringens* sont infectées par *M. refringens* type O. Les produits de PCR les plus intenses ont également été séquencés afin de confirmer ces premiers résultats et d'évaluer la variabilité des parasites détectés (voir partie O3).

## Suivi des infections à *Bonamia* sp. et *Marteilia refringens* au sein de la cohorte 2

De même que pour la cohorte 1, pour chaque poche de la cohorte 2 prélevée, 50 animaux ont fait l'objet d'analyses en PCR pour estimer la prévalence de *Bonamia* sp. et *Marteilia refringens*.

Avant d'être déployé sur les trois sites, le naissain de Brest et de Quiberon a été analysé afin d'établir un point de référence. Les analyses ont révélé la présence de *Bonamia* sp. dans 2% des huîtres de Quiberon et la présence de *Marteilia refringens* dans 6% des huîtres de Brest.

Les analyses des prélèvements réalisés entre septembre 2013 et juin 2014 sont en cours.

### Description de la dynamique d'infection à *Marteilia refringens*

Les animaux de la cohorte 1 détectés positifs en PCR pour la détection de *Marteilia refringens* en rade de Brest (Lomergat) ont fait l'objet d'observation en microscopie photonique afin de décrire la dynamique d'infection du parasite. Il est à noter que le naissain de la cohorte 1 est le même que celui suivi mensuellement dans le cadre de l'Objectif 1. Pour rappel, ce naissain collecté en 2011 avait présenté des résultats négatifs sur l'ensemble de la période d'étude (Octobre 2012 à Mars 2013).

De même que ce que nous avons décrit précédemment, certains animaux positifs en PCR n'ont pas été retrouvés infectés en histologie ce qui peut être dû à une sensibilité moindre de l'histologie en particulier lorsque les niveaux d'infection sont faibles.

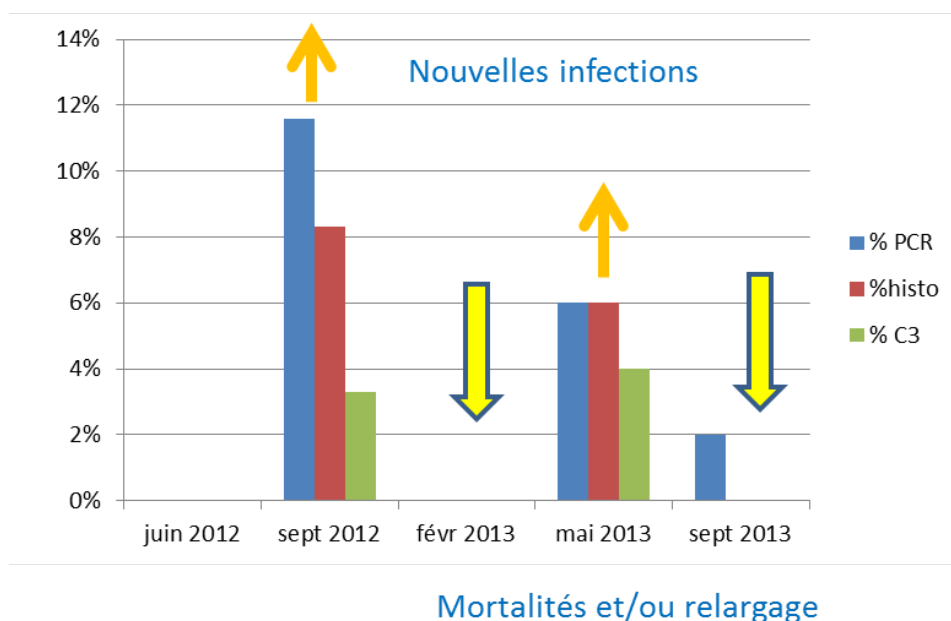


Figure 10. Evolution des fréquences de détection de *Marteilia refringens* en PCR, en histologie et des stades matures du parasite (C3) dans le naissain de la cohorte 1 en fonction des périodes de prélèvement sur le site de Lomergat (rade de Brest)

Entre juin et septembre 2012 (les huîtres ont alors 1 an), la fréquence de détection du parasite augmente et des stades matures du parasite sont observés ce qui indique que de nouvelles huîtres sont infectées et que

l'infection se développe au sein des huîtres parasitées (figure 10). Puis le parasite n'est plus détecté en février 2013. Cette absence d'observation du parasite dans les huîtres peut s'expliquer par l'augmentation de mortalité relevée dans les poches (voir figure 9) et / ou par un relargage de *Marteilia refringens* dans le milieu. De nouvelles infections surviennent entre février et mai 2013 et l'infection progresse comme l'indiquent l'augmentation de fréquence de détection et la présence de stades matures du parasite.

Si l'on considère la période de juin 2012 à juin 2013 on relève deux périodes d'infection : été 2012 et printemps 2013, ce qui coïncide avec la dynamique d'infection observée dans le naissain de Brest capté en 2012 et suivi entre octobre 2012 et mars 2013.

#### Description de la distribution tissulaire et dynamique d'infection à *Bonamia* sp.

Les animaux de la cohorte 1 détectés positifs en PCR pour la détection de *Bonamia* sp. en rade de Brest (Lomergat) et Cancale (origine Brest et Quiberon) ont fait l'objet d'observation en histologie ou en hybridation *in situ* afin de décrire la dynamique d'infection du parasite. Il est à noter que le naissain de la cohorte 1 est le même que celui suivi mensuellement dans le cadre de l'Objectif 1. Pour rappel, ce naissain collecté en 2011 avait présenté des résultats négatifs sur l'ensemble de la période d'étude (Octobre 2012 à Mars 2013).

A nouveau, certains animaux positifs en PCR n'ont pas été retrouvés infectés en histologie ce qui peut être dû à une sensibilité moindre de l'histologie en particulier lorsque les niveaux d'infection sont faibles.

En fonction de la répartition et de la charge parasitaire, les animaux ont été classés en trois catégories : animaux faiblement (1+), moyennement (2+) et fortement infectés (3+). D'avantage d'animaux ont été classés en 1+ qu'en 2 et 3+ (figure 11).

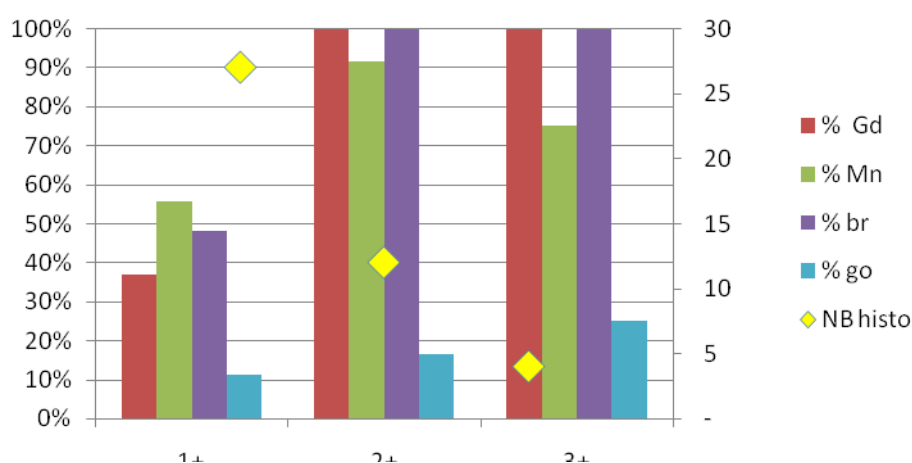


Figure 11. Niveaux d'infection relevés dans les individus positifs en histologie (losanges jaunes). Pourcentages d'animaux infectés ayant révélé la présence de parasites dans la glande digestive (GD), le Manteau (Mn), les branchies (br), et la gonade (go).

Dans les cas de faibles infections (1+), glande digestive et/ou manteau et/ou branchies paraissent infectés tandis que l'infection se généralise à la plupart des organes dans les cas d'infection modérée et forte (2+ et 3+, figure 11). La gonade apparaît moins souvent infectée que les autres organes mais la fréquence



d'observation de *Bonamia* sp. dans cet organe augmente avec le niveau d'infection (figure 11 et figure 12D). Le parasite a été observé dans d'autres organes tels que le cœur (figure 12B) et les palpes labiaux (figure 13B) mais ceux-ci n'étant pas systématiquement présents sur les coupes observées, ils n'ont pas été ici pris en compte.

La présence de parasites au niveau d'épithélium de plusieurs organes (exemples figures 12A, B, C et 13A, B), notamment dans les cas de moyennes et fortes infections, indique que *Bonamia* sp. peut être transmis avant que ne survienne la mort de l'huître infectée.

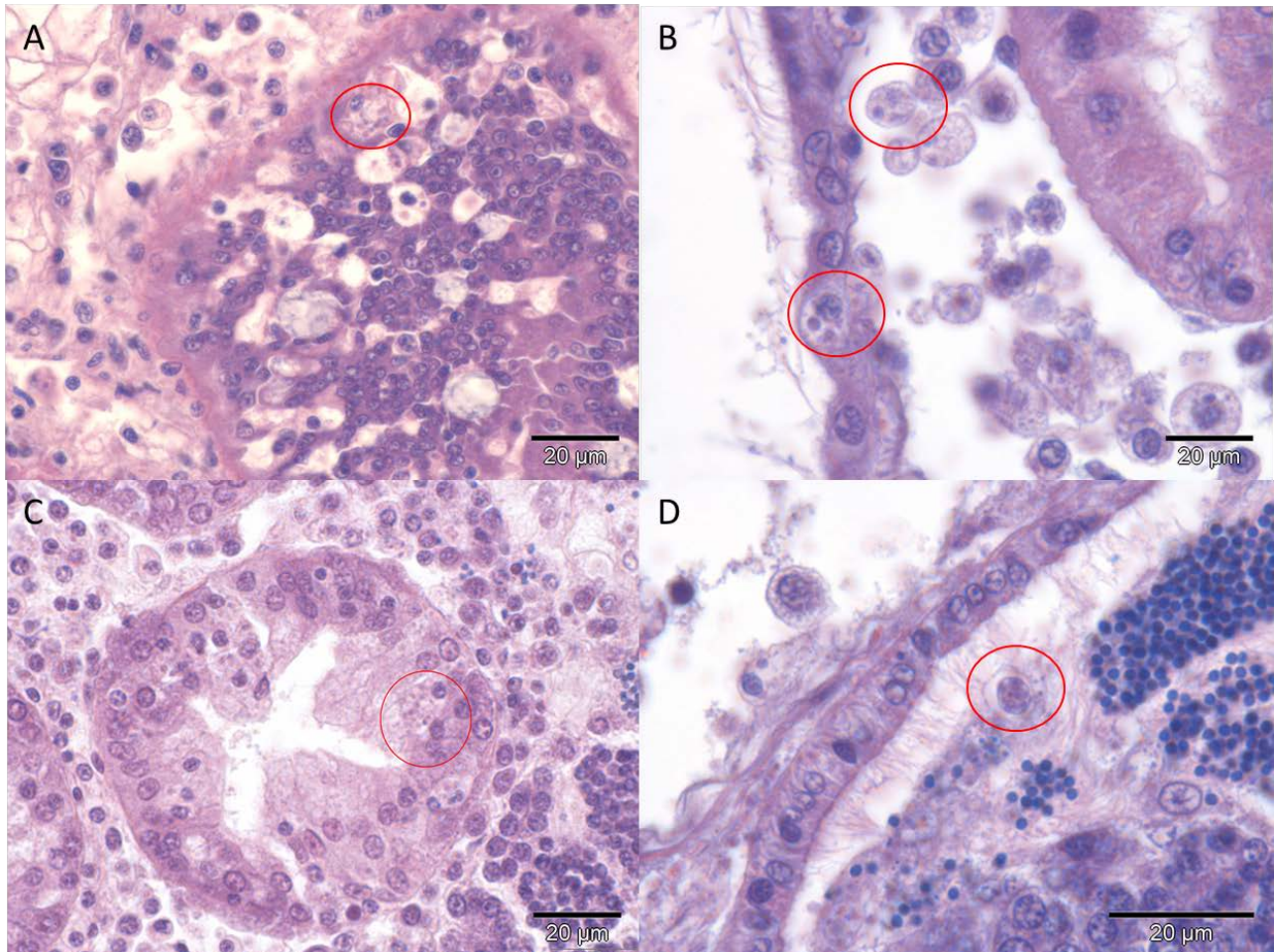


Figure 12. Sections histologiques colorées en hémalum et éosine. Présence de parasites *Bonamia* sp. (dans les cercles rouges) dans l'épithélium digestif (A et C), au niveau de l'épithélium du péricarde (B) et de la gonade (D)

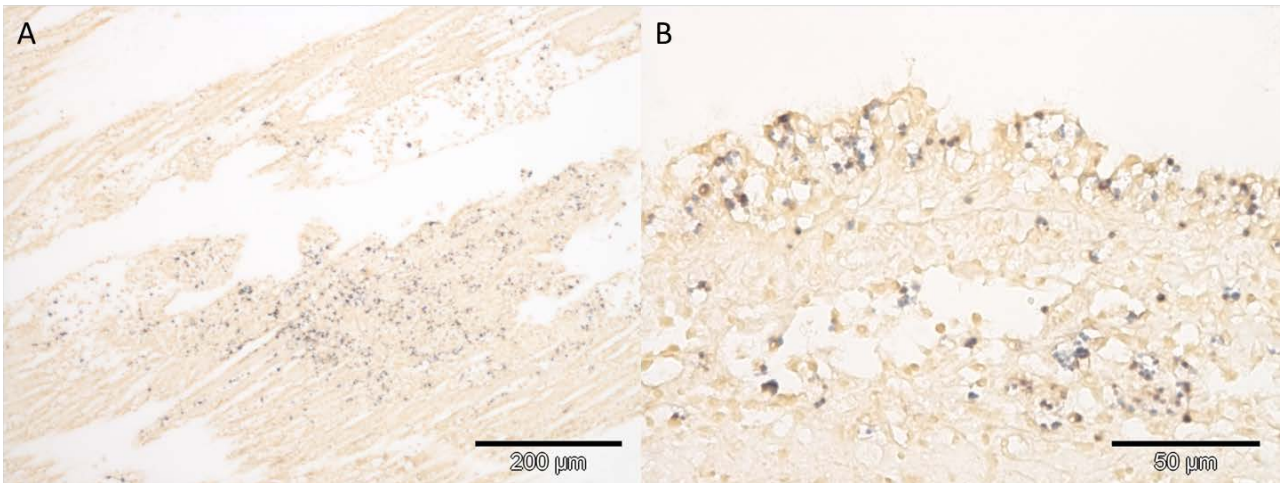


Figure 13. Observation de sections de tissus de branchies (A) et des palpes labiaux (B) après hybridation in situ pour la détection de *Bonamia* sp. La coloration bleu-sombre révèle la présence de parasite (contre coloration jaune de Bismark)

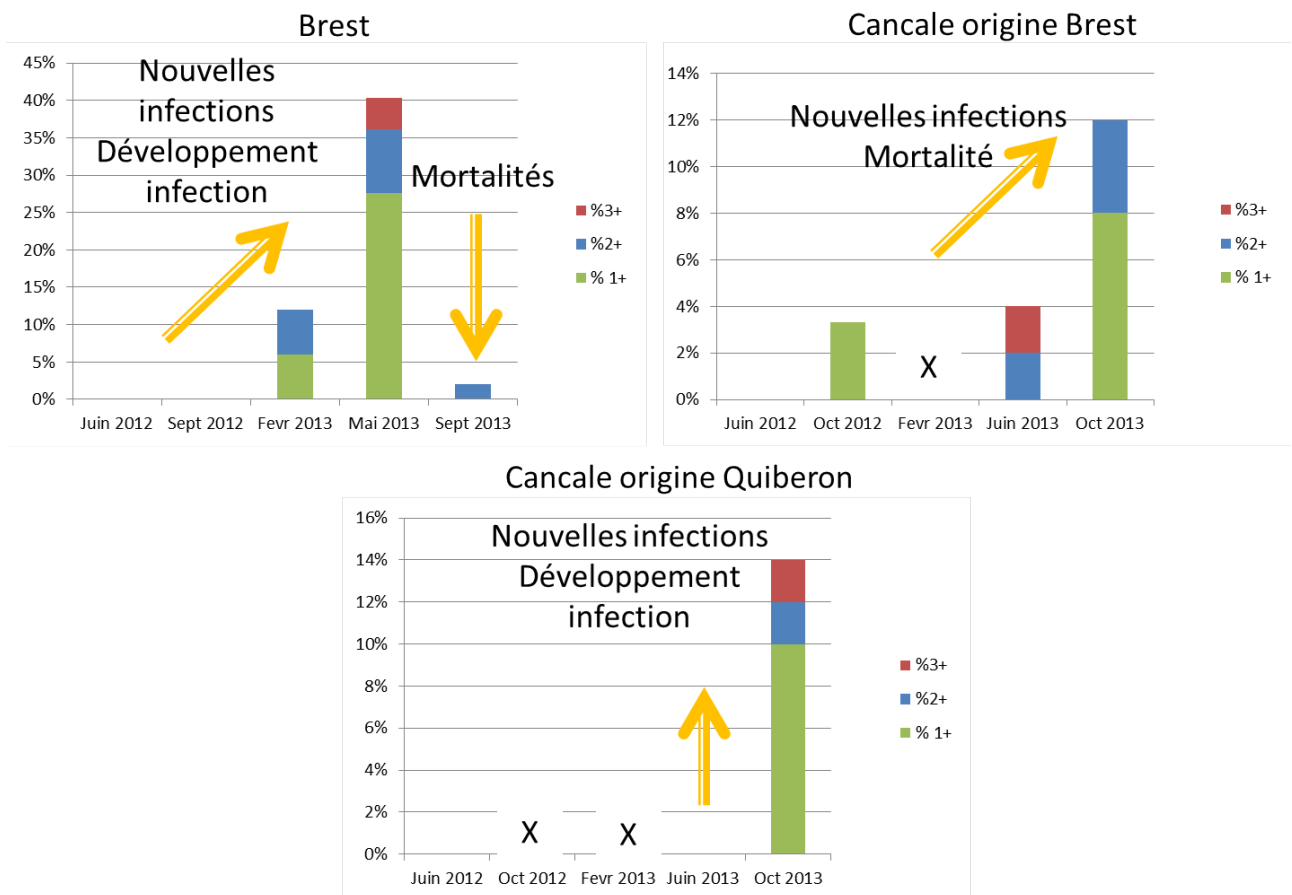


Figure 14. Evolution des fréquences de détection de *Bonamia* sp. en histologie dans le naissain de la cohorte 1 en fonction des périodes de prélèvement sur le site de Lomergat (rade de Brest), sur le site de Cancale pour le naissain originaire de Brest et de Quiberon. Les degrés d'infection à *Bonamia* sp. sont indiqués par un code couleur : 1+ (vert), 2+ (bleu) et 3+ (rouge). X = prélèvements non réalisés

Le naissain originaire de Brest s'infecte de façon plus importante lorsqu'il reste à Brest que lorsqu'il est transféré à Cancale. Sur le site de Lomergat (rade de Brest) les huîtres s'infectent en hiver et au printemps 2013 lorsque les huîtres ont environ 18 mois. Le parasite se multiplie dans les huîtres et l'infection se développe entre février et mai 2013. Le parasite n'est presque plus détecté dans les huîtres à la fin de l'été, suggérant que les huîtres infectées sont mortes entre mai et septembre 2013. Cette diminution de fréquence de détection coïncide avec une augmentation de mortalités de plus de 20% (figure 9), ce qui conforte notre hypothèse.

L'augmentation de fréquence de détection du parasite sur Cancale survient plus tardivement et plus modérément que sur Brest. La disparition des huîtres fortement infectées entre juin et octobre sur le naissain originaire de Brest laisse penser que ces huîtres sont mortes au cours de l'été.

Nos observations mettent en évidence des différences d'intensité et de dynamique d'infection du parasite *Bonamia* sp. en fonction des sites et de l'origine du naissain.

Synthèse du suivi de cohorte sur le site de Lomergat (rade de Brest)

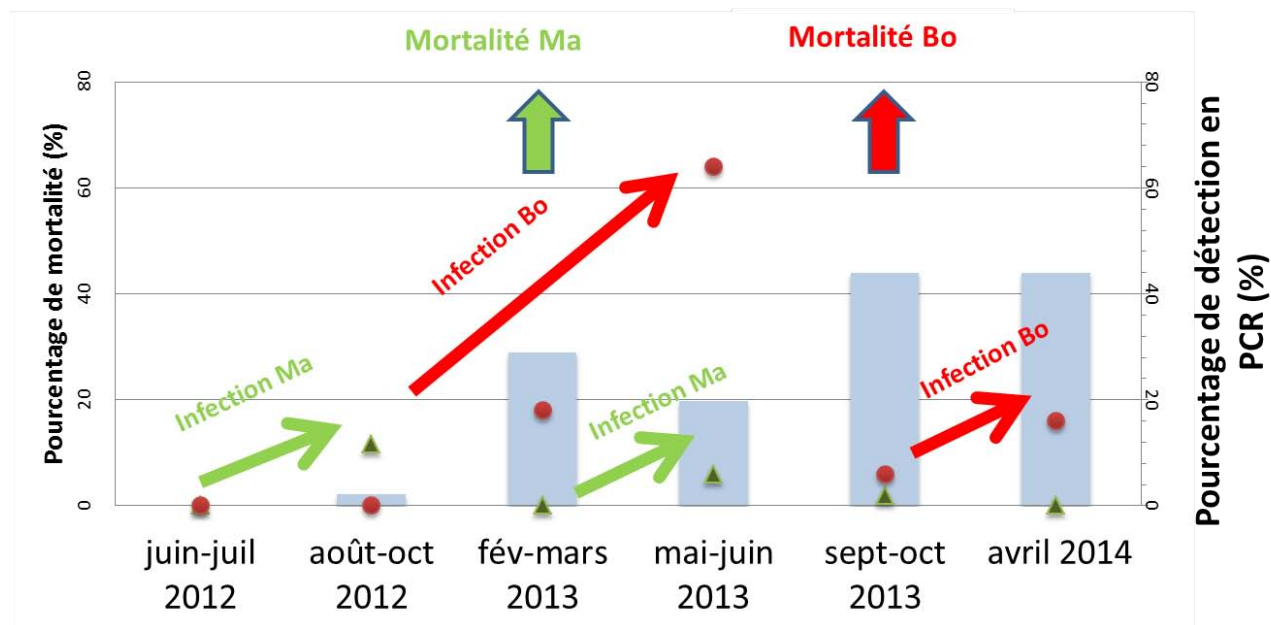


Figure 15. Synthèse des dynamiques d'évolution des mortalités (%), des fréquences de détection de *Marteilia refringens* (% ▲) et de *Bonamia* sp. (% ●) du naissain de Brest. Bo= *Bonamia* sp. Ma = *Marteilia refringens*

La figure 15 synthétise les données obtenues sur la rade de Brest pour la cohorte 1.

Ainsi, le naissain collecté à Lomergat en rade de Brest en 2011 n'a pas connu d'infection à *Bonamiasp.* et *Marteilia refringens* avant sa deuxième année. Il s'infecte à *M. refringens* au cours de l'été 2012, les huîtres infectées meurent probablement l'hiver qui suit. De nombreuses huîtres sont alors infectées par *Bonamia* sp et meurent au cours de l'été 2013 alors qu'elles ont 2 ans. Une nouvelle période d'infection par ce parasite survient en hiver –début de printemps 2014.

Il est à noter qu'aucun cas de co-infection (infection de la même huître par *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*) n'a été observé dans les individus de la cohorte 1.

### O3 – Etude de la diversité des parasites détectés

#### Etude de la diversité de *Marteilia refringens*

Pour étudier le polymorphisme chez *Marteilia refringens*, nous avons ciblé la région IGS (séquence inter génique). Des études antérieures, parmi lesquelles celles de Lopez-Flores et al. (2004), ont révélé l'existence de polymorphisme au sein de cette région.

Un fragment de 358 pb est obtenu après PCR nichée (Lopez-Flores et al. 2004) et a été séquencé directement ou après clonage (afin d'apprécier l'éventuelle variabilité du parasite au sein d'une huître). L'étude a porté sur le parasite détecté en rade de Brest, que ce soit dans du naissain, dans les juvéniles ou les adultes. A l'exception de trois animaux provenant du point 9 (figure 1), l'ensemble des échantillons a été collecté à Lomergat (point 17, figure 1).

Huit produits de PCR ont fait l'objet de clonage et 3 clones ont été séquencés pour chacun de ces amplicons.

Au total, 45 séquences ont été obtenues :

- 21 à partir de naissain suivi mensuellement sur Brest
- 18 à partir du suivi des cohortes 1 ou 2
- 6 à partir d'adultes prélevés en été 2011.

A ces 45 séquences ont été ajoutées des séquences obtenues par le laboratoire (LGPM) dans le cadre d'autres études sur *Marteilia refringens* (Arzul et al. 2013) : quatre séquences proviennent d'huîtres plates infectées, 38 séquences proviennent de moules infectées, quatre séquences ont été obtenues à partir de prélèvements de zooplanctons. Enfin, une séquence correspondant à *Marteilia cochillia* infectant la coque *Cerastoderma edule* et décrit dans des épisodes de mortalité de coques (Carrasco et al. 2013) a été inclus dans l'analyse.

Les 92 séquences ont été alignées à l'aide Clustal W (Thompson *et al.* 1994) inclus dans MEGA 6 avec les options de paramétrage par défaut. L'analyse phylogénétique de ces 92 séquences nucléotidiques a été réalisée en utilisant l'approche de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) et les distances d'évolution ont été générées en utilisant la méthode de Kimura à deux paramètres. Les valeurs de Bootstrap ont été calculées pour 500 répliques.

La figure 16 présente les résultats de cette analyse : les séquences obtenues dans le cadre de PERLE (en rouge) apparaissent pour la majorité dans le même groupe que les autres séquences de *Marteilia refringens* infectant des huîtres plates. Les séquences au sein de ce groupe présentent peu de variabilité (0.3%).

Deux séquences apparaissent dans le même groupe que les séquences de *M. refringens* infectant des moules *Mytilus galloprovincialis* ou *M. edulis*. Les séquences au sein de ce groupe présentent également très peu de variabilité (0.3%).

Enfin deux autres séquences provenant du même produit de PCR après clonage apparaissent proches d'autres séquences obtenues à partir de moules infectées mais ne se positionnent pas (3.5% de distance) dans le groupe précédent.

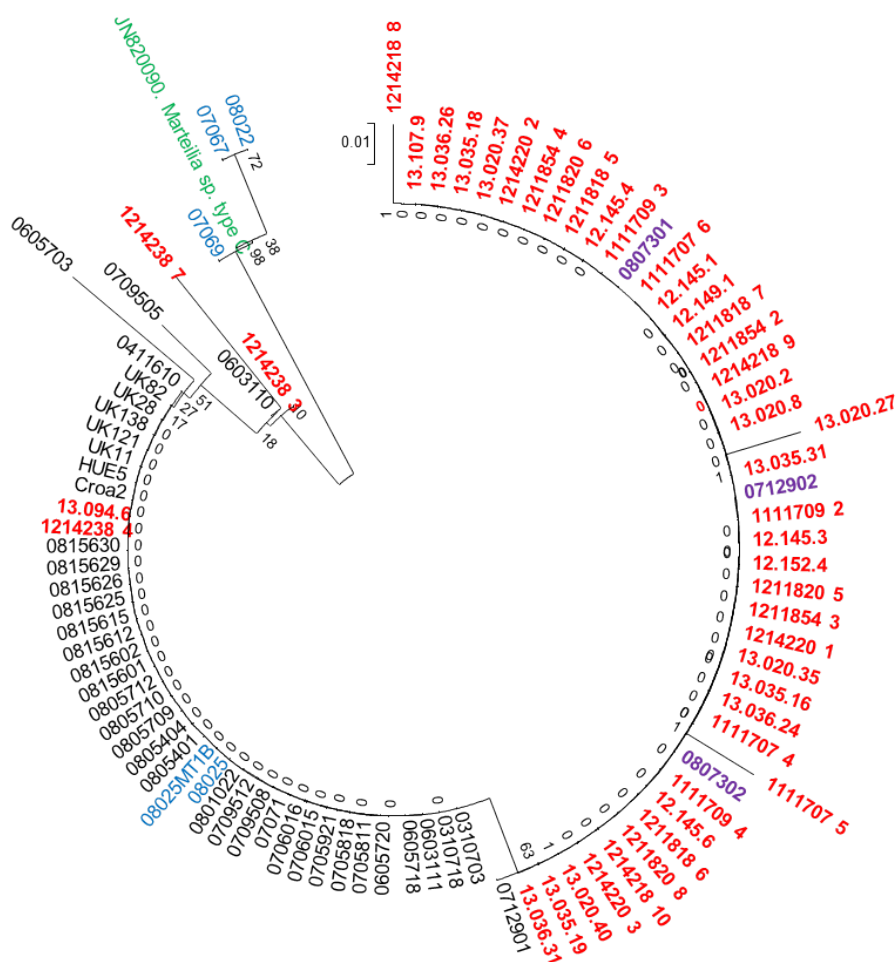


Figure 16. Analyse phylogénétique (Méthode de Neighbor-Joining) des séquences obtenues dans le cadre de PERLE (en rouge) en les comparant aux séquences obtenues dans le cadre d'autres études sur des huîtres plates infectées (en violet), sur des moules infectées (en noir), sur des prélèvements de zooplancton (en bleu) et une séquence de *Marteilia cochillia* chez la coque (en vert ; N° accession JN 820090)

Ces résultats indiquent que *Marteilia refringens* détecté en rade de Brest sur l'huître plate est homogène et identique à d'autres *M. refringens* détectés dans des huîtres plates. Ces résultats confirment donc les analyses en RFLP présentées précédemment. Cependant, ponctuellement certains parasites paraissent plus proches de *M. refringens* infectant les moules. Les quatre séquences concernées proviennent pour trois d'entre elles de clones obtenus à partir de la même huître prélevée sur le point 9 (figure 1) et pour la dernière séquence d'une huître prélevée sur Lomergat. Il est donc possible d'observer de la diversité au sein d'un lot d'huîtres (détection de *M. refringens* « type huître » et « type moule ») voire au sein d'une même huître (détection de différents *M. refringens* « type moule »).

La détection de *Marteilia refringens* « type moule » dans les huîtres plates a déjà été mise en évidence par des travaux réalisés sur la région ITS -1 du génome (Le Roux et al. 2001, Nova et al. 2005 et Lopez Flores et al. 2004). En fonction des sites étudiés ces situations paraissent rares (Le Roux et al. 2001) ou fréquentes (Lopez-Flores et al. 2004). Dans notre étude, seulement deux huîtres plates ont été détectées infectées par *M. refringens* « type moule ». La présence de ce dernier en rade de Brest peut s'expliquer par la présence d'élevages de moules dans la rade de Brest. Des cas d'infections à *M. refringens* ont déjà été rapportés sur des moules, notamment dans le cas de mortalités (Source : REPAMO, Réseau de Pathologie des mollusques).

### Etude de la diversité de *Bonamia* sp.

Pour étudier le polymorphisme chez *Bonamia* sp., nous avons ciblé la région des ARN ribosomiaux incluant une portion du 18S, l'ITS-1, le 5.8S et l'ITS-2. Les séquences internes transcrites 1 et 2 sont en effet considérées comme variables et susceptibles de révéler du polymorphisme intraspécifique.

Un fragment de 1300pb est obtenu après PCR en utilisant les amorces BO et LSUD et a été séquencé directement. L'étude a porté sur le parasite détecté en rade de Brest et Quiberon, que ce soit dans du naissain, dans les juvéniles, des adultes ou des larves.

Au total, 33 séquences de 500 pb environ ont été obtenues :

- 30 séquences à partir du suivi de la cohorte 1 ou 2 : 24 séquences ont été obtenues à partir d'huîtres de Brest, 3 séquences ont été obtenues à partir d'huîtres de Cancale originaires de Brest et 3 séquences ont été obtenues à partir d'huîtres de Cancale originaires de Quiberon
- 1 séquence à partir d'une huître ardoisée prélevée à Quiberon en été 2013
- 2 séquences à partir de pools de larves prélevés à Quiberon en été 2013

A ces 33 séquences ont été ajoutées des séquences obtenues par le laboratoire (LGPM) dans le cadre d'autres études sur *Bonamia* sp. : trois séquences proviennent d'huîtres plates infectées par *B. ostreae*, cinq séquences proviennent de diverses espèces d'huîtres infectées par des parasites du groupe *B. exitiosa*.

Enfin, une séquence obtenue à partir d'*Ostrea angasi* infectée par *Bonamia exitiosa* (Corbeil et al. 2006) a été inclus dans l'analyse (N° accession DQ312295).

Les 42 séquences ont été alignées à l'aide Clustal W (Thompson *et al.* 1994) inclus dans MEGA 6 avec les options de paramétrage par défaut. L'analyse phylogénétique de ces 42 séquences nucléotidiques a été réalisée en utilisant l'approche de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) et les distances d'évolution ont été générées en utilisant la méthode de Kimura à deux paramètres. Les valeurs de Bootstrap ont été calculées pour 500 réplicats.

La figure 17 présente les résultats de cette analyse : les séquences obtenues dans le cadre de PERLE (orange) apparaissent dans le même groupe que *Bonamia ostreae*. Les séquences au sein de ce groupe ne présentent aucune variabilité.

Les résultats obtenus mettent en évidence une très forte homogénéité de *Bonamia ostreae* dans les prélèvements analysés. Néanmoins, l'effort de séquençage a pour l'instant porté sur la région la moins variable du fragment amplifié (fragment du 18S). Des travaux complémentaires sont envisagés pour améliorer la longueur des fragments séquencés et ainsi comparer les régions ITS entre échantillons.

Nos résultats n'ont pas révélé la présence de *Bonamia exitiosa* dans les prélèvements analysés. Ce parasite a été détecté précédemment dans un prélèvement de larves de la Baie de Quiberon (Arzul et al. 2011) mais n'a à ce jour encore jamais été détecté en rade de Brest.

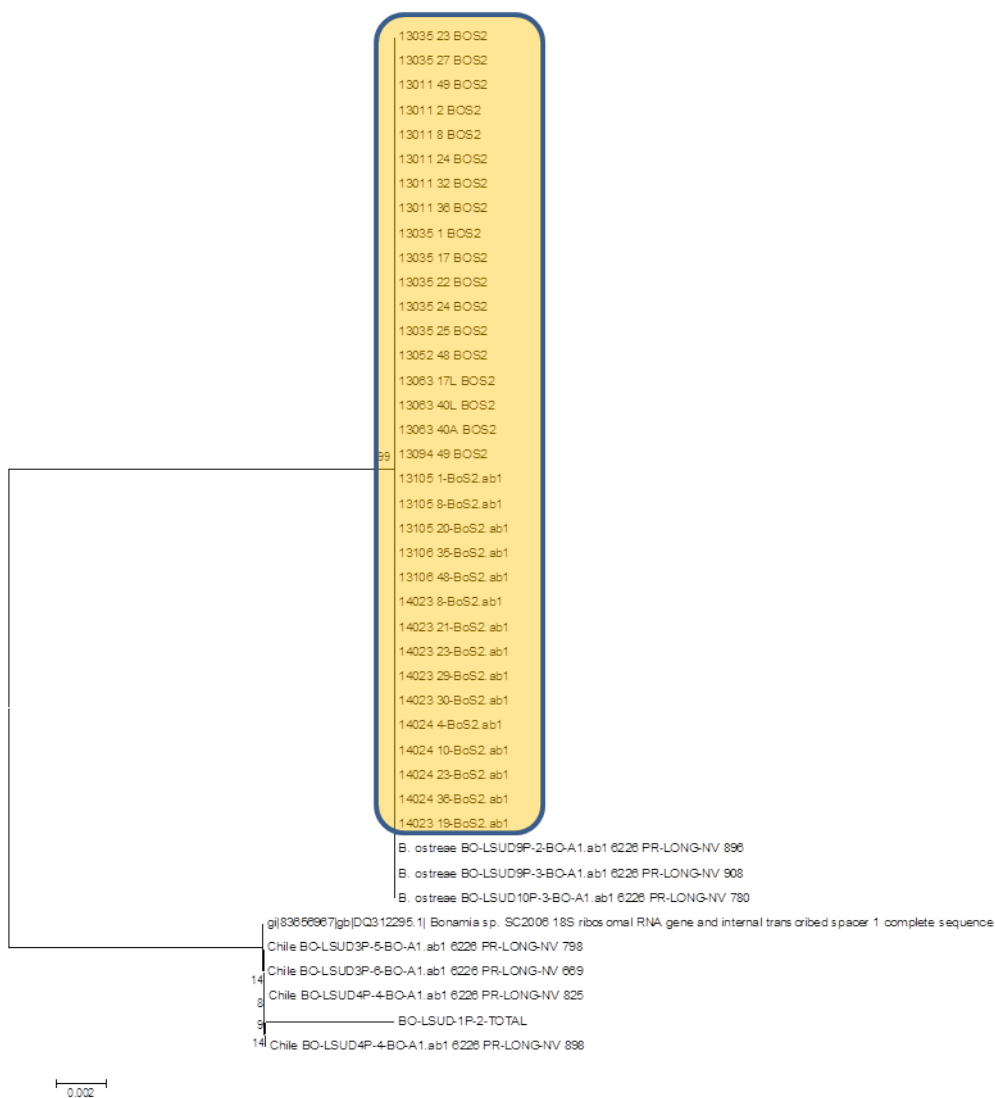


Figure 17. Analyse phylogénétique (Méthode de Neighbor-Joining) des séquences obtenues dans le cadre de PERLE (encadrées en orange) en les comparant à des séquences obtenues dans le cadre d'autres études sur *Bonamia ostreae* et *B. exitiosa*

#### O4 Etablir le statut de deux gisements naturels (Bourgneuf et Granville) vis-à-vis de ces deux maladies parasitaires

Les 149 individus prélevés en avril 2012 sur Granville ont présenté des résultats négatifs vis-à-vis de *Bonamia* sp. (*Marteilia refringens* n'ayant pas été recherché car il s'agit d'un gisement situé en eau profonde).

Les 150 huîtres prélevées en baie de Bourgneuf en février 2013 étaient négatives en PCR pour la détection de *Marteilia refringens* et une seule huître est apparue positive en PCR pour la détection de *Bonamia* sp.



## Conclusion et perspectives

### *O1 - Suivi de l'infection à *Bonamia ostreae* chez les jeunes stades d'huîtres plates sur Brest et Quiberon*

- *Bonamia ostreae* est détecté dans quelques adultes et pools de larves de la baie de Quiberon suggérant la transmission du parasite des adultes aux larves lors de la phase d'incubation et l'implication probable des larves, lors de leur phase planctonique, dans la dispersion du parasite. Néanmoins, la faible fréquence de détection du parasite dans les adultes à cette période de l'année (été) et dans les pools de larves testés laisse penser que ce mode de transmission/dispersion n'est pas majeur dans le cycle biologique de *B. ostreae*. L'absence de détection du parasite en rade de Brest est probablement due au nombre très réduit d'adultes ardoisés testés dans notre étude.
- Le suivi mensuel du naissain sur Quiberon n'a pu être réalisé qu'en 2011 et n'a pas révélé la présence de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*. L'absence de développement de *B. ostreae* sur les huîtres de moins de 1 an sur ce site peut être due à des conditions environnementales particulières de façon générale ou en 2011 en particulier. L'absence de suivi en 2012 ne nous permet pas de conclure.
- Le naissain capté à Brest (Lomergat) en 2011 apparaît indemne de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* tandis que les points adjacents (3 et 4 figure 1) présentent de faibles fréquences de détection à l'un ou l'autre des parasites (2% *M. refringens* en novembre 2012 et 2% *B. ostreae* en mars 2013).
- L'année 2012 est tout à fait différente pour le naissain capté à Lomergat : en effet, celui-ci apparaît infecté par *Marteilia refringens* dès 3 mois, la maladie progresse au cours de l'automne et semble induire des mortalités en hiver. Le cycle parasitaire reprend en mars.
- La différence observée sur ce site entre 2011 et 2012 peut être due à une évolution des températures différente entre les deux années. L'année 2011 n'a en effet pas présenté de température de l'eau supérieure à 17°C, température considérée comme seuil thermique pour l'infection à *Marteilia refringens*.
- Les résultats des analyses pour la détection d'OsHV-1 laissent apparaître des fréquences de détection élevées dans les prélèvements réalisés en Mars 2011 à Quiberon comme à Brest avec une période d'infection semblant se situer entre février et mars. Les charges virales détectées sont généralement faibles.

### *O2 - Suivi de cohortes vis-à-vis des infections à *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* sur Brest, Quiberon et Cancale*

- Bien que certains prélèvements n'aient pu être réalisés et que les dates de prélèvement ne coïncidaient pas toujours entre les trois sites étudiés, le suivi de cohorte nous a permis d'observer de nettes différences entre sites et origine du naissain en termes de mortalités et de dynamique d'infection.
- Le parasite *Marteilia refringens* n'est détecté que sur Brest. La dynamique observée sur la cohorte 1 ressemble à celle du naissain 2012 suivi sur le même site : les infections se produisent en automne et sont suivies du développement du parasite dans les huîtres infectées puis de mortalités. Le cycle du parasite semble reprendre au printemps suivant.
- Le parasite *Bonamia ostreae* est détecté dans toutes les conditions testées mais avec des dynamiques différentes. En rade de Brest, les huîtres s'infectent d'avantage que sur les autres sites. Les infections se produisent généralement en hiver, le parasite se multiplie et se développe au printemps induisant des mortalités en été.

- Le site de Lomergat présente les plus fortes mortalités, fréquences de détection et niveaux d'infection par les deux parasites. De même, le naissain originaire de Brest (Lomergat) présente d'avantage de mortalité et semble plus infecté par *B. ostreae* que le naissain de Quiberon une fois transféré sur Cancale.
- Les prélèvements réalisés sur la cohorte 2 n'ont pas encore tous été analysés à ce jour. Les résultats permettront de comparer les deux cohortes, sachant que le naissain 2012 de Brest était déjà infecté par les deux parasites avant la mise en poches.

### O3 – Etude de la diversité des parasites détectés

- L'étude de la diversité de *Marteilia refringens* dans les huîtres plates de la rade de Brest révèle la coexistence de deux types : l'un majoritaire dans nos prélèvements et connu pour infecter plutôt les huîtres plates et l'autre minoritaire dans notre étude, retrouvé plus fréquemment sur des moules *Mytilus edulis* ou *M. galloprovincialis*.
- Au vu de ces résultats, il serait intéressant de pouvoir recueillir des informations sur la situation des moules en rade de Brest et la connectivité des eaux entre élevages de moules et d'huîtres plates.
- L'étude de *B. ostreae* dans les huîtres plates de la rade de Brest et de Quiberon ne nous a pas permis de mettre en évidence de diversité sur la région séquencée. Cependant, des travaux complémentaires sont envisagés afin de compléter ces premières données.
- L'absence de détection de *B. exitiosa* dans les prélèvements analysés laisse penser que ce parasite n'est pas présent (ou à très faible prévalence) en rade de Brest et Quiberon. Il est donc fortement recommandé de ne pas importer des huîtres plates provenant de zones connues pour être infectées par ce parasite (e. g. Corse, Thau...)

### O4 -Etablir le statut de deux gisements naturels (Bourgneuf et Granville) vis-à-vis de ces deux maladies parasitaires

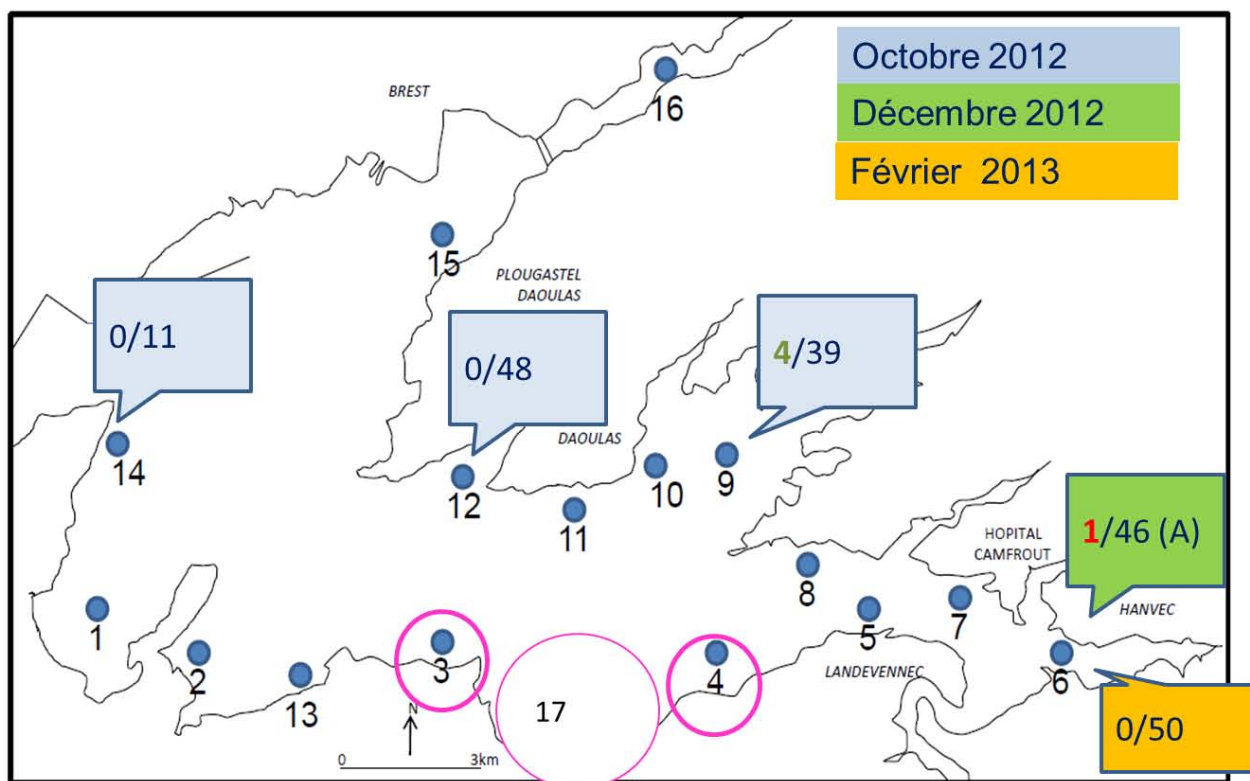
- L'analyse d'huîtres plates de Granville a révélé l'absence d'ADN de *Bonamia ostreae* sur ces huîtres. Ce gisement a fait l'objet d'un suivi régulier entre 1992 et 2007 et a longtemps été considéré indemne de bonamiose. Le parasite *B. ostreae* a été pour la première fois détecté en 2005 dans 2 huîtres (<1% de prévalence) puis à nouveau en 2006 avec une fréquence de détection de 2.6% en juillet. L'apparente émergence du parasite au sein de cette population d'huîtres plates a été attribuée à un déplacement du gisement qui se serait rapproché de la côte et déplacé vers le sud (source : REPAMO).
- L'analyse d'huîtres plates de la baie de Bourgneuf n'a été faite que sur un prélèvement réalisé en février. Une seule huître est apparue positive en PCR pour la détection de *B. ostreae*. L'absence de détection de *Marteilia refringens* peut être due à la période de prélèvement, l'hiver correspondant généralement aux prévalences les plus faibles (souvent nulles). Il est donc difficile de conclure quant au statut de cette population d'huîtres vis-à-vis de *M. refringens*.

Nous souhaitons préciser qu'à ce jour, 67 lots ont été prélevés dans le cadre du SP3, ce qui correspond à 3020 huîtres plates ayant fait l'objet d'extraction d'ADN, d'analyses en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae* et d'analyses en PCR pour la détection de *Marteilia refringens*.

### Références bibliographiques

- Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Ferrand S., Omnes E., Lerond S., Couraleau Y., Joly J.-P., François C., Garcia C. (2011) Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology* 179: 69-76
- Arzul I., Chollet B., Boyer S., Gaillard J., Baldi Y., Robert M., Joly J.P., Garcia C., Bouchouca M. (2013). Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*
- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Roux, F., Sauriau, P. G., Coustau, C., Blachier, P. and Berthe, F. C. J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257, 87–108.
- Carrasco, N., Hine, M., Durfort, M., Andree, K. B., Malchus, N., Lacuesta, B., González, M., Roque, A., Rodgers, C., Furones, M.D., 2013. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 413-414, 223-230.
- Cochennec N., Le Roux F., Berthe F. & Gérard A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.* 76:26-32.
- Corbeil S., Arzul I., Robert M., Berthe F.C.J., Besnard-Cochennec N. & Crane M.S.J. (2006). Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 81-85.
- Lebesnerais, C. (1985) Etude expérimentale de la digestion chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse de doctorat Université de Caen.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. and Berthe, F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1, 588–597.
- Le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audemard, C., Figueras, A., Vivares, C., Gouy, M. and Berthe, F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 449–454.
- Lopez-Flores, I., de la Herran, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz-Rejon, C. and Ruiz Rejon, M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129:411-419,
- Martenot C., Oden E., Travaille E., Malas J.P. & Houssin M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Virol. Methods*, 70 (1–2), 86–99.
- Novoa, B., Posada, D. and Figueras, A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *Journal of Fish Diseases* 2, 331–338.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22, 4673–4680
- Wang, Y. and X. Guo. 2008. ITS length polymorphism in oysters and its potential use in species identification. *J. Shellfish Res.*, 27(3):489-493.

Annexe 1. Résultats des analyses réalisées sur les prélèvements d'huîtres plates autres que ceux des points 17, 3 et 4 - Rouge : résultats concernant la détection de *Bonamia* sp. par PCR ; Vert : résultats concernant la détection de *Marteilia refringens* par PCR.



Annexe 2 : Prélèvements réalisés dans le cadre du suivi de la cohorte 1 (N°s de lot et dates des prélèvements)

Site	Quiberon	Brest	Cancalle	
			Quiberon	Brest
Mise en poche	18/06/2012	21/06/2012	04/07/2012	
Lots T0	<b>12/071</b>	<b>12/070</b>	<b>12/076</b>	
Lots 1 <sup>er</sup> prélèvement	<b>12/117</b>	<b>12/118</b>	poche égarée	<b>12/120</b>
	24/08/2012	06/09/2012		10/10/2012
Lots 2 <sup>ème</sup> prélèvement	<b>13/021</b>	<b>13/011</b>	pas de prélèvement	
	15/03/2013	18/02/2013		
Lots 3 <sup>ème</sup> prélèvement	<b>13/038</b>	<b>13/035</b>	<b>13/039</b>	<b>13/052</b>
	31/05/2013	16/05/2013	24/05/2013	25/06/2013
Lots 4 <sup>ème</sup> prélèvement	<b>13/096</b>	<b>13/094</b>	<b>13/105</b>	<b>13/106</b>
	10/09/2013	10/09/2013	17/10/2013	17/10/2013
Lots 5 <sup>ème</sup> prélèvement	<b>14/039</b>	<b>14/023</b>	<b>14/029</b>	<b>14/027</b>
	18/04/2014	02/04/2014	02/04/2014	02/04/2014
Lots 6 <sup>ème</sup> prélèvement		<b>14-070</b>	<b>14-073</b>	<b>14-071</b>
		11/06/2014	11/06/2014	11/06/2014

Prélèvements réalisés dans le cadre du suivi de la cohorte 2 (N°s de lot et dates des prélèvements)

Site	Quiberon	Brest	Cancalle	
			Quiberon	Brest
Mise en poche	25/04/2013	16/05/2013	24/05/2013	
Lots T0	<b>13/037</b>	<b>13/036</b>		
Lots 1 <sup>er</sup> prélèvement	<b>13/097</b>	<b>13/095</b>	<b>13/108</b>	<b>13/107</b>
	10/09/2013	10/09/2013	17/10/2013	17/10/2013
Lots 2 <sup>ème</sup> prélèvement	<b>14/040</b>	<b>14/024</b>	<b>14/030</b>	<b>14/028</b>
	18/04/2014	02/04/2014	02/04/2014	02/04/2014
Lots 3 <sup>ème</sup> prélèvement		<b>14-072</b>	<b>14-075</b>	<b>14-074</b>
		11/06/2014	11/06/2014	11/06/2014