

Département Ressources Biologiques et Environnement
 - Unité SG2M, Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins ; Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie et Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture
 - Unité PFOM, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés
 - Unité IHPE Interaction Hôte Pathogène Environnement



MINISTÈRE
 DE L'AGRICULTURE
 DE L'AGROALIMENTAIRE
 ET DE LA FORÊT

Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes
 - Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais
 - Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire
 - Unité DYNECO, Laboratoire de Dynamique Hydro-Sédimentaire

ISEM, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), CNRS
 Université Montpellier2

Marie-Agnès Travers, Jean François Pépin, Patrick Soletchnik, Stéphane Guesdon, Olivier Le Moine, Nicolas Bierne, Abdellah Benabdelmouna, Alexandre Brunet, Annick Derrien, Jean Michel Chabirand, Sylvie Génaudeau, James Grizon, Pierre Polsenaère, Stéphane Robert, Anne Schmitt, Jean Luc Seugnet, Delphine Tourbiez, Benjamin Morga, Christophe Ledu, Hubert Palvadeau, Dominique Hervio-Heath, Arnaud Huvet, Julien De Lorgeril, Jean-Yves Stanisière, Franck Dumas, Philippe Souchu, Christian Béchemin, Sylvie Lapègue

Mars 2016 - R.INT.RBE/SG2M-LGPMM

Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés – MORBLEU

■ MORBLEU



Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés - MORBLEU

**Rapport scientifique de l'étude MORBLEU,
convention DPMA-Ifremer 2015**

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Christian BECHEMIN et Sylvie LAPEGUE Adresse électronique : sylvie.lapegue@ifremer.fr		date de publication : 2016 nombre de pages : 126 bibliographie : oui illustration(s) : 29 figures et 22 tableaux langue du rapport : français
Titre de l'article Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal(aux) : Marie-Agnès TRAVERS Jean-François PEPIN Patrick SOLETCHNIK Stéphane GUESDON Olivier LE MOINE	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins LGPMM ; Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie et Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture Ifremer / Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes/ Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais LERPC ; Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire ; Unité DYNECO, Laboratoire de Dynamique Hydro-Sédimentaire ISEM, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), CNRS Université Montpellier2	
Contributeur(s) : Nicolas Bierne, Abdellah Benabdelmouna, Benjamin Morga, Arnaud Huvet, Dominique Hervio-Heath, Alexandre Brunet, Annick Derrien, Jean Michel Chabirand, Sylvie Génauzeau, James Grizon, Pierre Polsenaëre, Stéphane Robert, Anne Schmitt, Jean Luc Seugnet, Delphine Tourbiez, Christophe Ledu, Hubert Palvadeau, Julien De Lorgeril, Jean-Yves Stanisière, Franck Dumas, Philippe Souchu, Christian Béchemin, Sylvie Lapègue		
Encadrement(s) :		
Cadre de la recherche : Action : A070219 – MORBLEU		
Destinataires : DPMA, DGA1, Ifremer		



Depuis 2014, des surmortalités anormales affectent les cheptels mytilicoles tant adultes que juvéniles avec des mortalités massives pouvant atteindre 100% (Béchemin et al. 2015). Les objectifs généraux de ce projet sont d'identifier des **facteurs potentiellement corrélés** avec les **mortalités de moules** observées dans les Pertuis Charentais: **facteurs environnementaux** (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques) et **facteurs intrinsèques aux animaux** (traits d'histoire de vie, qualité cytogénétique et physiologie). Après une introduction bibliographique complète, différentes questions sont ici abordées.

1. **Historique des mortalités 2014-2015 ?** Grâce à différentes sources d'information nous avons pu retracer les évènements de mortalités de 2014 et 2015 et valider l'échantillonnage réalisé en 2015 dans Morbleu (au niveau temporel et spatial).

2. **Les mortalités 2014 et 2015 sont-elles exceptionnelles ? Existe-t-il un lien avec les fluctuations environnementales ?** Pour cela, nous avons porté un regard rétrospectif sur 15 années de données acquises dans les réseaux portés par Ifremer afin de définir un niveau de mortalité « anormale » et d'explorer de potentiels liens avec les fluctuations environnementales. Nous avons pu observer que (1) les **épisodes de mortalités de 2014 et 2015 peuvent être qualifiés d'exceptionnels**, (2) ils sont survenus dans des **conditions climatiques plutôt chaudes et pluvieuses** associées à des **indices de diversité phytoplanctoniques bas** (nombre de taxons et équilibre quantitatif entre ces taxons).

3. **Dans quelles conditions les mortalités de moules sont-elles survenues en 2015 ?** Nous présentons ici dispositif mis en place sur nos 4 sites ateliers (Filière, Boyard, Eperon et Loix) et l'ensemble des échantillons et mesures collectées (environnement abiotique ou biotique, ou connectivité hydrodynamique des masses d'eaux). Cette action de recherche a nécessité 16 campagnes et aboutit à la bancarisation de **805 échantillons**, certains prélevés au cours des **mortalités observées sur les animaux déployés**.

Les mortalités observées en 2015 sont survenues dans un **contexte environnemental abiotique différent** de celui observé en 2014 (absence de dessalure comparable à celles observées en 2014, différence dans la contribution relative des fleuves aux masses d'eau). Néanmoins, les **conditions hydrodynamiques et la connectivité entre les sites du Pertuis Breton et les côtes vendéennes sont quant à elle comparables** entre ces 2 années.

4. **Quelle(s) ont été la(les) espèce(s) ou population(s) de moules affectée(s) ?** Différentes espèces et populations étant présentes sur les côtes française, nous avons cherché à préciser les ascendances génétiques sur des animaux moribonds et vivants prélevés (MORBLEU et mortalité déclarées MYTILOBS-2). Pour 99% d'entre eux, les animaux analysés ont pu être affiliés **au fond génétique *M. edulis* européen du Golf de Gascogne**. Toutefois la présence d'ascendance *trossulus* sur certains individus est à considérer. Avec les marqueurs utilisés, aucune différence génétique entre les animaux moribonds et survivants n'a pas être observée, **les mortalités touchant certains hybrides *edulis/galloprovincialis* en proportion identique à celle de *M. edulis***.

5. **Quelle était la qualité cytogénétique des animaux en 2015 ? Pourrait-il exister un lien avec les mortalités observées ?** Nous avons échantillonné des animaux prélevés sur 7 sites mytilicoles avant et après la mortalité de l'année 2015. Les analyses de la qualité cytogénétique de ces animaux est toujours en cours.

6. **Ces animaux étaient-ils dans des conditions physiologiques particulières ?** des échantillons de moules vivantes, collectés avant, après et au cours des mortalités, sur des sites impactés et peu/pas impactés ont été analysés par une approche transcriptomique à haut débit (RNA-seq). L'échantillonnage 2015 ayant été tardif dans l'année (prélèvements jusqu'en juillet 2015), la réalisation de l'approche transcriptomique a été retardée. Le traitement des données de séquençage est encore en cours d'analyse.

Ainsi cette année nous a permis (1) de confronter les données environnementales à 15 années de mesures, (2) de mettre en place un dispositif et d'échantillonner au cours d'un épisode de mortalité, (3) de préciser le fond génétique des animaux affectés. Cependant les prélèvements ayant été tardifs, de nombreuses analyses sont encore en cours de traitement.

Mots-clés - Moules, *Mytilus edulis*, Fluctuations environnementales, Connectivité hydrodynamique, Populations, Qualité cytogénétique, Immunité, Physiologie

Unités et réseaux :

-Réseau d'observation MYTILOBS

-LGPMM- Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins de la Tremblade, (domaines d'expertises mobilisés : pathologie, génétique, cytogénétique, écotoxicologie et immunité, épidémiologie)

-LERPC- Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais, l'Houmeau et La Tremblade, (domaines d'expertises mobilisés : hydrologie, hydrodynamique et modélisation, suivis environnementaux physico-chimiques et planctoniques, écologie, biostatistique, biométrie)

-LSEM- Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie de Brest (domaines d'expertises mobilisés : microbiologie, écologie microbienne)

-LPI- Laboratoire Physiologie des Invertébrés de Brest (domaines d'expertises mobilisés : écotoxicologie et immunité, physiologie)

Université de Montpellier II, CNRS-ISEM. UMR 5244 (domaines d'expertises mobilisés : génétique)

-LNR- Laboratoire National de Référence pour les maladies de mollusques marins de la Tremblade et le Réseau REPAMO (domaines d'expertises mobilisés : pathologie, diagnostic, épidémiologie)

-LER/MPL Nantes (domaines d'expertises mobilisés : analyses chimiques, nutriments)

Collaborations :

L'UMR 6539 LEMAR, Brest

INRA-GENOTOUL, plateforme de séquençage PlaGe, Toulouse,

Laboratoire EPOC de l'Université de Bordeaux1

Remerciements :

DDTM 85, 17, 44

Réseaux MYTILOBS, Repamo, Rephy, LNR

Direction des Phares & Balises de la Rochelle

Sommaire

Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
1. Introduction générale	15
1.1. Contexte	15
1.2. Objectifs	15
1.3. Elements de communication du projet MORBLEU vers l'extérieur	16
2. Introduction bibliographique.....	17
2.1. L'élevage de la moule et sa reproduction.....	17
2.2. Etat de l'art sur les causes de mortalités chez les moules.....	17
2.3. Les mortalités de moules 2014-2015 : des sources d'informations multiples complémentaires	20
2.3.1. Déclarations 2015.....	21
2.3.2. Les mortalités : Constats, mesures, signalements et saisines	22
2.4. Que retenir de tout cela ?	25
3. Objectif 1 : Regard sur 15 années	29
3.1. Historique des mortalités	29
3.2. Conditions environnementales : années atypiques	30
3.3. Conditions environnementales, flores planctoniques et mortalités de moules : des premières corrélations ?	32
3.4. Discussions.....	35
3.5. Conclusions	38
4. Résultats – Objectif 2 : Décrire les mortalités observées en 2015.....	41
4.1. Dispositif et ensemble des échantillons collectés.....	41
4.1.1. Protocole	42
4.1.2. Choix des sites.....	43
4.1.3. Ensemble des échantillons collectés au cours des campagnes	45
4.2. Mortalités mesurées sur nos différents sites	45
4.3. Conditions environnementales.....	47
4.3.1. Contextualisation de la période d'étude.....	47
4.3.2. Caractérisation hydrologique des 3 stations de l'étude	49
4.4. Connectivités hydrodynamiques	51
4.4.1. Simulation de la connectivité hydrodynamique en 2014 :	51
4.4.2. Simulation de l'effet de transfert en cascade par « points relais »	54
4.4.3. Conclusions intermédiaires	58
4.5. L'environnement abiotique.....	59
4.5.1. Contaminants chimiques: l'année 2015 a-t-elle été marquée par la présence de polluants ou nutriments particuliers qui auraient pu fragiliser les animaux ?	59
4.5.2. Apports d'eau douce : les apports par les différents fleuves pourraient-ils avoir contribué aux mortalités observées ?	64
4.6. L'environnement biotique.....	67
4.6.1. Flores phytoplanctoniques : écologie et dynamique	68
4.6.2. Flores phytoplanctoniques et bactériennes.....	70
5. Objectif 3 : Une part génétique ? Les animaux affectés en 2014 et 2015 : une espèce, une population particulière touchée ?	73

6. Objectif 4 : Qualité cytogénétique des cheptels mytilicoles en relation avec la mortalité 2015?	79
7. Objectif 5 : Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?	83
7.1. Résultats : état physiologique et réponse moléculaire des animaux	83
7.1.1. Granulomes inflammatoires et quantités de bactéries du groupe <i>Splendidus</i> dans les animaux.....	83
7.1.2. Analyse du transcriptome	84
8. Conclusions générales	85
9. Références bibliographiques	89
Annexe 1. Cycle d'élevage en Charente-Maritime	95
Annexe 2 : Organismes pathogènes des Mytilidae	97
Annexe 3 : Chronologie des épisodes de mortalités de moules sur le littoral français depuis le début du 20ème siècle	99
Annexe 4 : Mortalités « anormales » : quels niveaux de base ?	103
Annexe 5 : Chronologie des principaux constats et signalements de mortalités de moules (gisements et élevages)	107
Annexe 6 : Matériels et méthodes	109
1. Objectif 1 : Regard sur 15 années	109
1.1. Sites	109
1.2. Jeu de données.....	109
1.3. Indices de diversité	110
1.4. Analyse de données.....	110
2. Objectif 2, partie 4.1 Dispositif mis en place et échantillonnage	111
2.1 Animaux suivis :.....	111
2.2 Suivi des mortalités de moules.....	111
2.3 Dispositifs de mesures et de prélèvements in situ.....	112
3. Objectif 2, partie 4.3 Contexte environnemental.....	113
3.1. Sites d'étude	113
3.2. Jeu de données.....	113
3.3. Dates de début des épisodes de mortalité de moules observés en 2014 et en 2015.....	113
3.4. Analyse de données.....	114
4. Objectif 2, partie 4.5 Environnement abiotique	115
4.1. Nutriments	115
4.2. Polluants chimiques	115
5. Objectif 2, partie 4.6 Environnement biotique.....	117
5.1. Echantillonnage de l'eau de mer	117
5.2. Des filtrations spécifiques	118
5.3. Extraction des ADN totaux à partir des membranes filtrantes.....	118
5.4. Constitution des pools de filtres pour extraction des ADN totaux.....	118
5.5. Extraction des ADN à partir des filtres	119
5.6. Choix des gènes cibles et des amorces pour l'amplification par PCR.....	119
5.7. Optimisation des PCR 16S et 18S.....	119

5.8. Projet de séquençage haut débit des amplicons par la technique Miseq® Illumina sur la plateforme de séquençage du GenoToul (Toulouse) pour permettre l'approche en metabarcoding	120
6. Objectif 5, Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?	121
6.1. Matériel biologique.....	121
6.2. Mise en poudre et extractions d'ADN pour quantification des bactéries du groupe <i>Splendidus</i> et extraction d'ARN totaux.....	121
6.3. Séquençage RNA-seq	122
6.4. Traitement des données de RNAseq.....	122

Liste des figures

Figure 1 : Historique des taux de mortalité printanière observés entre les mois de mars et juin de 2000 à 2015 sur les stations Aiguillon, Boyard, Yves et Filière.....	30
Figure 2 : Situation des températures atmosphériques et précipitations annuelles hivernales (agrégation des mois de janvier, février et mars) relevées à la station "Chassiron" (Météo France) sur la période de 2000 à 2015.....	31
Figure 3 : 'Analyse Triadique Partielle sur les variables environnementales.....	33
Figure 4 : Diversité micro-phytoplanctonique sur 3 stations des Pertuis Charentais (Eperon, Cornard et Boyard, respectivement en colonne de 1 à 3).....	34
Figure 5 : Résultat du positionnement multidimensionnel (nMDS) sur les compositions floristiques au niveau du genre et de la classe.....	36
Figure 6 : A. carte des mortalités cumulées dans les pertuis à la fin de l'été 2014 (Béchemin et al 2015). B. Carte présentant les sites où ont été menés les suivis de l'action MORBLEU en 2015. Spots rouge, Filière W -1.375467E, 46.273729N, Loix -1.41304E, 46.226297N, Eperon -1.24376E, 46.263479N, Boyard -1.200971E, 45.978756N).....	43
Figure 7 : Chroniques des températures et des salinités à la station Filière de 2009 à 2016.....	47
Figure 8 : Distributions (représentées par des boxplots) des températures de chaque période estimée de début d'épisode de mortalités sur la zone des Filières du Pertuis Breton pour 2014 et 2015. La comparaison par un test de Mann-Whitney montre l'existence d'une différence significative ($p < 2.2e-16$).....	48
Figure 9 : Chroniques saisonnières des descripteurs hydrologiques (en moyenne journalière) température (a), salinité (c), pourcentage de saturation en oxygène (e) et turbidité (g).....	49
Figure 10 : Points analysés, du bassin de Marennes Oléron à la baie de Bourgneuf.....	51
Figure 11 : Evolution en concentration moyenne du traceur Filières sur les points des côtes Vendéennes.....	52
Figure 12 : Quantité cumulée de traceur estimée sur les différents points suivis : Pertuis Breton (Bas), Pertuis d'Antioche (centre), côtes Vendéennes (Haut).....	53
Figure 13 diffusion des traceurs émis ; cartographie à J5, J10, J15, J20, J30 de gauche à droite. De haut en bas : Filières, Roulières, Aiguillon, Olonne. NB: les échelles de couleurs sont propres à chaque imagerie.....	57
Figure 14 : Evolution de la teneur des sels nutritifs (Silicates, Nitrite+Nitrate, Phosphates, Ammonium) entre les sites Filière W (Bas), Eperon (Milieu) et Boyard (La Perrotine)(Haut).....	61
Figure 15 : Evolution du Carbone Organique Dissous au cours des campagnes MORBLEU-2015 entre les sites Filière W, Eperon et Boyard (La Perrotine).....	62
Figure 16 : Représentation en boîte à moustaches de la distribution des valeurs de concentration des métaux dissous de la colonne d'eau pour les 3 sites Filière W, Eperon et Boyard au cours de la campagne MORBLEU-2015 (février-juillet).....	63
Figure 17 : A. Importance relative des apports fluviaux sur les 3 sites ateliers au cours des années 2014, 2015. Les rectangles en pointillé représentent les périodes d'apparition des mortalités de moules. B. Apports fluviaux sur le site des Filières en 2013 et 2014. Contribution relative des principaux fleuves externes et internes aux Pertuis (%). Les rectangles en pointillé représentent les périodes d'apparition des mortalités de moules.	65
Figure 18 : Saisonnalité des apports fluviaux sur les 3 sites ateliers et contribution relative en apports (impact) des principaux fleuves (contribution > 1%) durant les périodes d'émergence des mortalités de moules en 2014 et 2015.....	66
Figure 19 : Evolution spatio-temporelle des abondances du microphytoplancton agrégé selon 5 classes taxonomiques sur les 3 sites (échelle des abscisses en Log).....	68
Figure 20 : Evolution spatio-temporelle d'indices de diversité basés sur le microphytoplancton aux trois sites.....	69
Figure 21 : Proportion d'ascendance génétique issue de quatre fonds génétiques différenciés (M. trossulus en vert, M. edulis Amérique en violet, M. edulis Europe en bleu et M. galloprovincialis en	

<i>rouge) pour 37 moules d'échantillons de référence. La carte rappelle la distribution géographique connue des moules sur la façade Ouest de l'Europe.</i>	74
<i>Figure 22 : Proportion d'ascendance génétique issue de quatre fonds génétiques différenciés (M. trossulus en vert, M. edulis Amérique en violet, M. edulis Europe en bleu et M. galloprovincialis en rouge) pour les 843 moules des échantillons MORBLEU.</i>	75
<i>Figure 23 : Répartition des sites échantillonnés en 2015 au niveau de la baie de Bourgneuf (LP, la plaine ; LF, le fiol ; MB, maison blanche) et des Pertuis Charentais (FN, filières ; BL, bouée du Lay ; AI, Aiguillon ; BD, Boyard).</i>	80
<i>Figure 24 : A. Evolution du pourcentage de granulomes observés en histologie sur 15 animaux prélevés sur les sites de Filière (en bleu), Yves (en rouge) et Roulière (en vert). B. Evolution de la quantité de bactéries (Log copies/ml) du groupe Splendidus au sein des animaux, sur les sites de Filière (ronds) et Yves (triangles). Les données individuelles (formes) ainsi que la moyenne (trait) sont ici représentées.</i>	84
<i>Figure 25: Avancement du traitement des données de RNAseq</i>	84
<i>Figure 26 : Comparaison des mortalités mesurées dans les Pertuis Charentais entre 1990 et 1994 (Dardignac, 2004) et entre 2000 et 2010 (d'après Robert, com.pers). Entre 1990 et 1994 : 15 stations sur Aiguillon et Marsilly. Entre 2000 et 2010, 3 stations (Filières W, Aiguillon et Boyard)</i>	106
<i>Figure 27 : Carte du site d'étude et stations de mesures</i>	109
<i>Figure 28 : A) bouée «G10 –SRC-17» marquant le sud du secteur des bouchots de l'Eperon, on distingue la cage inox et la paniers sur la chaine ; B) bouée cardinale Filière W (P&B), on distingue l'antenne et les batteries de l'émetteur GSM ainsi que la chaine du dispositif.</i>	112
<i>Figure 29: Workflow d'analyse des données de RNAseq comprenant assemblage, alignement, expression, annotation et statistiques</i>	122

Liste des tableaux

Tableau 1. Périodes de déclarations des mortalités (par secteurs géographiques). Début des déclarations comme indicateur des dates d'apparition des mortalités.....	21
Tableau 2. Estimations de mortalités issues des constats réalisés par les DDTMs (avec professionnels et Ifremer) (les sites sont classés géographiquement du sud vers le nord).....	22
Tableau 3. Evolution chronologique des mortalités dans les différentes régions de France ; Echelle semi quantitative de mortalité de 0 à 4 : 0 = pas de mortalités ; 1 si mortalité <25% ; 2 si 25%< mortalité<50% ; 3 si 50%< mortalité<75% et 4 si mortalité supérieure à 75%. (S) = « signalements » de mortalités et (carré bleu) = saisines.....	23
Tableau 4. dates des campagnes à la mer MORBLEU-2015 sur les sites Filière FI, Eperon EP, Loix LO, Boyard BO). Les sorties supplémentaires en période de mortalité sont indiquées en gras (20/04, 22/04, 28/04).....	42
Tableau 5. Liste des paramètres et facteurs suivis ou échantillonnés au cours des 16 campagnes Morbleu-2015.....	44
Tableau 6. Niveau de mortalité cumulée pour les lots MYTILOBS et MORBLEU entre janvier et juillet 2015 et prélèvements associés.....	46
Tableau 7. Différenciation des stations sur la base des descripteurs hydrologiques salinité, pourcentage de saturation en oxygène et turbidité (comparaisons multiples des distributions après test de Kruskal-Wallis avec $p < 0.01$).....	50
Tableau 8 : délai d'apparition en heures, et temps nécessaire à atteindre une quantité cumulée de 10^6 unités. Les sites sont classés dans l'ordre d'apparition.....	54
Tableau 9. Paramétrisation retenue pour l'évaluation de la connectivité hors du Pertuis Breton (simulation 2 en cours).....	56
Tableau 10. Données pour l'analyse des métaux lourds dans les chairs de moules entre trois sites.....	60
Tableau 11. Organismes pathogènes (listés à l'OIE) détectés chez des mytilidae et hôtes chez lesquels ils ont été décrits ; Adapté de Webb, 2007.....	97
Tableau 12. Organismes pathogènes (non listés à l'OIE) détectés chez des mytilidae et hôtes chez lesquels ils ont été décrits.....	97
Tableau 13. Principaux épisodes de mortalités massives de moules rencontrés dans les régions mytilicoles Françaises.....	100
Tableau 14. Mortalités de moules en Europe du Nord. Regroupement en « classes » (principales causes évoquées).....	101
Tableau 15. Mesures de mortalités sur pieux de bouchots mytilicoles dans Pertuis Breton (Dardignac 1996 ; Mille 2013) et dans la baie du Mont Saint Michel (Thomas 2004 ; Mazurié et al. 2005).....	104
Tableau 16. Mesures de mortalités en paniers sur des bouchots mytilicoles dans Pertuis Breton (Dardignac, 1996) ; dans les Pertuis Charentais (Robert et al. 2001) ; dans la baie du Mont Saint Michel (Mazurié et al. 2001) ; sur le littoral Cotentin (Blin et al. 2004 ; Blin 2010) et sur les côtes de France (Robert et Bédier 2013 ; Robert et al., 2014). Aux valeurs en « gras » sont associées des causes spécifiques de mortalités.....	105
Tableau 17. Chronologie des principaux constats et signalements de mortalités.....	107
Tableau 18. Caractéristiques initiales des lots de moules déployés sur les 4 sites MORBLEU.....	112
Tableau 19. Coordonnées des stations de mesures à haute fréquence d'acquisition.....	113
Tableau 20. Périodes estimées de début de mortalité sur le secteur des Filières du Pertuis Breton.....	114
Tableau 21 : Mortalités cumulées enregistrées sur les animaux déployés par MYTILOBS et utilisés ici pour l'étude transcriptomique (cases colorées en vert).....	121

1. Introduction générale

1.1. Contexte

Au cours des mois de mars et mai 2014, des mortalités exceptionnelles ont été observées sur les moules en élevage dans les Pertuis Charentais et plus spécifiquement dans le Pertuis Breton. Des constats de mortalités réalisés en avril révèlent des mortalités d'une ampleur sans précédents, et une spatialisation de l'intensité de ces mortalités, avec un secteur Nord-Ouest du Pertuis Breton, très impacté (>80 %), un secteur Est du Pertuis Breton, moins impacté (30 - 80 %), et un Pertuis d'Antioche considéré comme non impacté (<10 %) par les mortalités de moules, durant la période mars-avril 2014. Des travaux de recherche préliminaires menés dès l'été 2014 ont permis de:

(1) Mettre en évidence des conditions environnementales particulières: baisses successives de salinité, pics importants de turbidité (non spécifiques aux Pertuis Charentais) en relation avec les apports marins et terrigènes importants, et une **température** de l'eau supérieure de 1-2 °C par rapport à la médiane interannuelle dans le Pertuis Breton où le **temps de résidence des masses d'eau** est connu pour être élevé.

(2) Suggérer l'implication d'agents infectieux dans les tissus des animaux, transmissibles expérimentalement aux moules et non aux huîtres. Cet(ces) agent(s) reste(nt) néanmoins à identifier. 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. Cependant, la présence de bactéries appartenant au groupe bactérien *Splendidus*, et en particulier à l'espèce *V. splendidus* a été détectée dans l'ensemble des échantillons analysés. Des premiers résultats obtenus pour certains de ces isolats montrent qu'ils sont capables d'induire des mortalités massives de moules en conditions expérimentales.

(3) Suggérer l'absence de déséquilibre physiologique. Les premiers résultats acquis sur les réserves biochimiques et énergétiques des moules impactées et non impactées par la mortalité montrent des teneurs en réserves énergétiques similaires. Ces données ne permettent pas cependant de conclure à l'absence de déficit énergétique précédant la mort.

Dans ce contexte, nous avons mené des actions de recherche afin de (i) finir d'exploiter les données relatives à l'année 2014 et (ii) acquérir de nouvelles données (caractérisation environnementale et hôtes) et échantillons dans les Pertuis Charentais (Breton et Antioche).

1.2. Objectifs

Les objectifs généraux de ce projet sont d'identifier des facteurs potentiellement corrélés avec les mortalités de moules observées dans les Pertuis Charentais: facteurs environnementaux (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques), facteurs intrinsèques aux animaux (traits d'histoire de vie, qualité cytogénétique et physiologie) et agents infectieux potentiels (recherche réalisée dans le cadre du LNR).

Plus précisément, nous avons souhaité répondre aux questions suivantes :

- **Les mortalités 2014 et 2015 sont-elles exceptionnelles?** Existe-t-il un **lien avec les fluctuations environnementales**? Pour cela, nous avons porté un regard rétrospectif sur 15 années de données acquises dans les réseaux portés par Ifremer afin de définir un niveau de mortalité

« anormale » et d'explorer de potentiels liens avec fluctuations environnementales et dynamique du micro-phytoplancton.

- Dans quelles conditions les **mortalités de moules sont-elles survenues en 2015** ? Le dispositif mis en place et l'ensemble des échantillons et mesures collectées seront présentées et discutées, que ce soit concernant l'environnement abiotique ou biotique, ou la connectivité hydrodynamique des masses d'eaux.

- Quelle(s) a (ont) été **la(les) espèce(s) ou population(s) de moules affectée(s)** ?
- Quelle était la **qualité cytogénétique des animaux** en 2015 ? Pourrait-il exister un lien avec les mortalités observées ?
- Ces animaux étaient-ils dans des **conditions physiologiques particulières** ? La réponse transcriptomique des animaux prélevés à différents temps (avant/pendant/après les mortalités recensées) a été étudiée.

Après une présentation des éléments de communication et d'une introduction bibliographique complète sur l'élevage de la moule, les causes de mortalités connues et les moyens de mesurer ces mortalités, ces différentes questions seront abordées dans des chapitres dédiés, puis l'ensemble des données sera discuté.

1.3. Eléments de communication du projet MORBLEU vers l'extérieur

Présentations orales et poster

- Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais. Présentation orale. Salon Ostrécicole de la Tremblade, 14 avril 2015, La Tremblade, France.
- Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais et Vendée 2014-2015 : de l'expertise aux actions de recherche. Description des conditions associées aux épisodes de mortalité. Point d'information sur l'étude en cours. Présentation orale. Journée de la Santé des mollusques marins et Journées de l'Observation conchylicole. 02 au 04 février 2016, Ifremer, Nantes, France. <http://wwz.ifremer.fr/sg2m/Journees-de-la-Sante-des-mollusques-marins-et-Journees-de-l-Observation-conchylicole>
- Projet «MORBLEU» année 2015. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais : de l'expertise aux actions de recherche, description et étude des conditions associées aux épisodes de mortalité ou susceptibles de les favoriser. Poster. Colloque LITEAU "Observation et recherche en appui aux politiques du littoral et de la mer". 14 et 15 janvier 2016, Brest, France. <http://www1.liteau.net/index.php/agenda/colloque-liteau-janvier-2016-a-brest>

Plaquettes et page web :

- Fiche plaquette sur le projet MORBLEU-2015. Dec.2015, LERPC, 1p
- CREA-Ifremer. Flash Info Maline n°28. État sur les mortalités d'huîtres et de moules à la date du 02 juin 2015. http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/27_FIM.pdf.
- Page web dédiée à l'étude MORBLEU avec un document A4 téléchargeable en ligne sur le site du LERPC rubrique Etudes et Recherche (07/01/2016). <http://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Etudes-et-Recherche/MORBLEU>

Participation à des réunions

- Préfecture de la Vendée. Roche sur Yon : (4 mars 2016) (17 septembre 2015) (1^{er} juin 2015).

2. Introduction bibliographique

2.1. L'élevage de la moule et sa reproduction

En France, la moule est une espèce dont la présence remonte à plusieurs siècles. La pêche sur les gisements profonds était déjà pratiquée à la drague, au moyen âge. La mytiliculture est quant à elle beaucoup plus récente. Sous une forme traditionnelle sur bouchots, elle existe depuis les 17-18^{ème} siècles dans le Pertuis Breton (baie de l'Aiguillon) et s'est développée entre la fin du 19^{ème} siècle et la première moitié du 20^{ème}. Pour certaines régions, tel le Cotentin, la mytiliculture est une activité plus récente (deuxième moitié du 20^{ème} siècle). Dans les années 90, une nouvelle forme de mytiliculture sur filières a permis aux professionnels d'étendre leurs cultures plus au large.

La reproduction de *Mytilus edulis* se déroule pendant les mois d'hiver lorsque la température des eaux est suffisamment élevée. On constate des **pontes hivernales** (janvier, février, mars) pour des températures des eaux autour de 9-10° C. La ponte est partielle ou totale pour un individu donné ; si la ponte est partielle, la moule est prête à pondre à nouveau au bout de 15 jours ; si la ponte est totale, elle pondra à nouveau au bout d'un mois (Bouxin, 1954 ; Lubet, 1959). Mais comme la ponte est également « **partielle ou totale** » au sein d'une population de moules, en conditions favorables de température et de ressource trophique (souvent au printemps), **les pontes se succèdent sur une base de 15 jours**. Cette périodicité (15 jours à 1 mois) est à relier avec le cycle lunaire et les vives eaux en particulier qui induisent les stimuli nécessaires aux déclenchements des pontes. De plus, il a été montré que la **structure d'élevage** (bouchot ou filière), par ses spécificités (~ 70% d'immersion (bouchots) et 100% d'immersion (filières)), **influence la reproduction des moules : l'effort de reproduction** est effectivement **plus important** pour les **moules de filières** en **conditions marines** que pour celles en zone intertidale et plus euryhaline (Garen *et al.*, 2004 ; Robert *et al.*, 2007).

Le **cycle d'élevage est court** pour ce mollusque bivalve (un an seulement) qui est considéré comme peu sensible aux organismes infectieux comme aux variations environnementales (Annexe 1). Néanmoins, des mortalités ont été rapportées dans les élevages depuis de nombreuses années.

2.2. Etat de l'art sur les causes de mortalités chez les moules

« Le pire ennemi des moules c'est la nature » écrit Lambert en 1935. Dès le début du 20^{ème} siècle les « ennemis » de la mytiliculture sont listés (Lambert et Faideau, 1929). Hormis les **conditions climatiques extrêmes** (violentes tempêtes, fortes gelées et fortes chaleurs), il s'agit essentiellement à cette époque de **prédateurs** (étoiles de mer, raie pastenague, oiseaux de mer) et de **parasites** (crabe pinnothère) (Mahé, 1994).

La moule bleue (*Mytilus edulis*) présente une **grande tolérance** vis-à-vis des paramètres physico chimiques de l'eau de mer. Elle est euryhaline et peut vivre dans les eaux marines ou saumâtres de salinité aussi basse que 4‰. Elle ne se reproduit toutefois pas si la salinité est inférieure à 15‰ et sa croissance est réduite en dessous de 18‰. Pour Lubet (1959), les salinités les plus basses tolérées par *M. edulis* seraient de **7 à 10‰**. Les moules bleues sont également eurythermes et supportent même des conditions glaciales pendant plusieurs mois. L'espèce est bien acclimatée pour une gamme de température variant entre **5 et 20°C**, avec une limite de tolérance durable supérieure à 29°C pour les adultes (Bouxin, 1954).

En 1989-1991, les températures anormalement chaudes durant l'été sont suspectées responsables de la mortalité du naissain en périodes d'émergence alors que le naissain en zone subtidale est épargné (Dardignac *et al.*, 1990 ; Dardignac, 1994, 1996). De plus, des vents chauds, durant trois étés consécutifs, ont été désignés comme responsables de mortalités (Dardignac et Prou, 1995 ; Dardignac, 2004). Cette situation de température extrême s'est répétée au cours de la canicule de l'été 2003, entraînant des mortalités comprises entre 46 et 63% dans plusieurs secteurs des Pertuis Charentais (Antioche et Breton) (Robert et Le Moine, 2003).

De nombreux organismes infectieux ont été décrits à travers le monde chez les espèces de *Mytilidae*, même si ces descriptions ne sont pas toujours associées à des mortalités (Webb, 2007). Certains de ces organismes sont listés à l'OIE (Annexe 2, Tableau 11, p97), les principaux agents non listés sont également présentés dans le Tableau 12, p97. Certains de ces organismes ont été détectés en Europe et associés à des épisodes de mortalités. Une chronologie des épisodes de mortalités observés en Europe est présentée en Annexe 3. Les principaux agents infectieux sont détaillés ci-dessous.

Mortalités liées à la détection de *Mytilicola* sp. en Europe

Mytilicola intestinalis a été décrit au début du 20^{ème} siècle par Pesta (Pesta, 1907 ; d'après Korringa et Lambert, 1951). Il serait d'origine Méditerranéenne et ne semble pas affecter l'espèce *Mytilus galloprovincialis*, l'autre espèce endémique de nos côtes. Le copépode parasite aurait atteint les côtes **allemandes** en 1930, fixé sur la coque d'un bateau (Casper 1939 ; d'après Korringa et Lambert, 1951) puis les côtes **anglaises** en 1946 (Ellenby, 1947 ; d'après Korringa et Lambert, 1951) avant d'atteindre le littoral **hollandais** en 1949 où il sera associé à de **fortes mortalités en 1950**. En France, jusqu'en 1951, le « cop rouge » reste confiné au nord de la baie de Vilaine (Bretagne, Cotentin, Calvados, Seine Maritime) (Lambert, 1951). En 1961-1962 par contre, le parasite importé de l'embouchure de la Loire ou de la Vilaine via un transfert de cheptels est identifié en baie de l'Aiguillon (Brienne, 1960). Il est associé à des **mortalités de moules de l'ordre de 80-90%** qui vont s'étendre, en **1961**, au sud de la Vendée (pointes de l'Aiguillon, d'Arçay, embouchure Lay) (Brienne, 1964). Les mortalités sont alors de 30 à 90% selon les sites (Mahé, 1994). La production passe de 7000-8000 tonnes (référence des années 1952-1956) à 3000 tonnes environ en 1960 (Mahé, 1994). Cette première crise majeure de la mytiliculture en Charente-Maritime et Vendée forcera l'évolution de la mytiliculture traditionnelle (bouchots clayonnés) vers une mytiliculture plus moderne (restructurée, sans clayons, ...) au début des années 60.

Plus récemment *Mytilicola intestinalis* est encore désigné comme un agent responsable de mortalités chroniques dans un certain nombre de secteurs mytilicoles (Rodriguez, 2013). En Charente-Maritime, dans le secteur du Pertuis Breton, il a été observé entre 1972 et 1990 à faible densité par moule (Dardignac, 2004). En 2015, Robert (com. pers) le retrouve en plus forte abondance dans les bouchots que sur les filières.

Une autre région mytilicole d'importance, la Baie du Mont Saint Michel¹ a connu de fortes mortalités liées à *Mytilicola intestinalis* en 1965, 1970 et en 1982 (Blateau *et al.*, 1992, d'après Basuyaux *et al.*, 2011). En 1983-1984, la trop forte densité de moules aurait favorisé le développement du parasite, entraînant mortalités et baisse conséquente de la production de 10

¹Où la mytiliculture est née en 1954.

000 tonnes (1981) à 4 000 tonnes (1984) (secteur du Vivier/mer) (Gerla, 1990). Comme dans le cas de la crise mytilicole des années 61-62 dans la baie de l'Aiguillon la solution viendra également d'efforts de gestion. La baisse de la densité en élevage et la restructuration des parcs mytilicoles, entre 1985 et 1987, permettront de retrouver des niveaux corrects de production (Gérard, 2002). Cette restructuration, suivie d'une autre au début des années 2000, a permis de contenir les mortalités de moules (Mazurié *et al.*, 2005).

Mytilicola orientalis a, quant à lui, été identifié chez *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. californianus* and *M. crassitesta* (Bower 1996a) mais n'aurait qu'un impact minime sur la survie des animaux (Webb, 2007).

Mortalités liées à *Polydora ciliata* en Europe

Polydora ciliata (annélide polychète) a été associé à d'importantes pertes en Hollande (Korringa, 1963). Après l'hiver rigoureux de 1962-1963, la fixation sur les moulières de larves en quantités importantes puis les tubes de vase édifiés par ces animaux ont induit la formation d'une « couverture » gênant l'alimentation des mollusques en entraînant de fortes mortalités (Ropert et Olivési, 2002).

La même espèce : *Polydora ciliata*, compétiteur de la moule vis-à-vis du substrat (pieux), envahit en 1996 certains bouchots de Quend plage (Picardie, nord de la Baie de Somme). Des concentrations mesurées de 500000 polydores/m² formant des gangues de vase de 10-15 cm d'épaisseur entraînerent des mortalités de l'ordre de 80% (Ropert et Olivési, 2002). Ce même compétiteur sévit à nouveau au printemps 2001 sur la zone mytilicole de Quend-Plage (Nord de la Baie de Somme) (Ropert et Olivési, 2002).

Mortalités associées à la détection de virus

Des virus à ARN non enveloppés ont pu être observés dans les épithéliums digestifs (Diggles *et al.* 2002) et considérés comme un problème en Nouvelle Zélande (Jones *et al.* 1996; Diggles *et al.* 2002; Renault & Novoa 2004; Renault 2006). Ces infections sont parfois associées à des mortalités modérées à élevées. Au-delà de la Nouvelle Zélande, des virus similaires ont été rapportés en Australie, au Danemark et dans d'autres pays (Bower 2001).

Des néoplasies appelées « Disseminated haemic neoplasia » ont été rapportées en Europe. Cette néoplasie a pu être transmise par cohabitation (Bower 2006) et une participation virale a été suggérée (Renault *et al.*, 2006 et Renault & Novoa, 2004). Rapporté à des prévalences de 4 à 40% avec des mortalités de ~75%, cette néoplasie affecterait plutôt les moules adultes. Des prévalences plus importantes ont été rapportées chez les hybrides *M. edulis* - *M. galloprovincialis* par rapport aux espèces pures (Fuentes *et al.* 2002)

Ainsi, des mortalités et pertes de moules sont rapportées depuis de nombreuses années et seraient reliées à diverses causes (environnementales comme organismes infectieux).

2.3. Les mortalités de moules 2014-2015 : des sources d'informations multiples complémentaires

En mytiliculture, les cheptels de moules peuvent subir une sélection forte au stade « juvénile » amenant à des mortalités jugées « importantes » (Dare et Davies, 1975 ; Aguirre, 1979). En éclosérie de mollusques, une survie de 5 à 50 % au stade larvaire est considérée comme largement supérieure à celle rencontrée dans le milieu naturel (captage) (Le Borgne, 1979). Les pertes de naissains sur cordes, entre le printemps et l'été, sont comprises entre 50% et 90% (avant mise sur bouchots) (Dardignac, 1996, Boromthanasarat et Deslous-Paoli, 1988). Aujourd'hui, la « perte » de rendement calculée entre la mise en place d'un boudin de naissain au cours de l'été (naissain de 1,5 à 2,0 cm de long sur cordes de coco) et la pêche l'année suivante (été) serait d'environ 82% à 86% (Mille, com. pers ; études 2013-2014). Ces pertes sont en partie liées aux pratiques culturales et en partie à des mortalités. Toutefois les **mortalités aux stades précoces de l'élevage sont souvent sans conséquence pour la production**.

Aujourd'hui, face à cette crise majeure de la mytiliculture contemporaine sur les côtes françaises, sans doute la plus importante depuis celle de 1960-62, des questions se posent : Quelles sont les mortalités et pertes « normales » et « anormales » au cours d'un cycle d'élevage professionnel ? Comment sont-elles estimées/mesurées ?

Les pratiques mytilicoles qui visent à optimiser des rendements économiques de production s'intéressent essentiellement à des biomasses ou des rendements (à l'hectare, par pieux, par descente de filière, ...). Les « pertes » de moules estimées par les professionnels au cours d'un cycle d'élevage, (Annexe 1) correspondent ainsi à la somme des mortalités et de l'échappement. Dans les écosystèmes estuarien, **l'accès aux populations sauvages de coquillages et l'observation des mortalités est difficile** (diversité des sites, zone subtidale et intertidale, marnage, météo, moyens d'accès, ...). La mortalité de coquillage peut facilement passer inaperçue.

En mytiliculture les **professionnels**, souvent présents sur les sites d'élevage, sont les premiers à voir la mortalité de coquillages. S'ils la jugent « anormale », ils la signalent aux autorités maritimes (**DDTMs**) à travers des fiches déclaratives. Les services de la DDTM sont habilités à provoquer des saisines **REPAMO**² (Ifremer) et à réaliser des **constats** de mortalités. Ces **saisines** conduisent à réaliser des analyses pour la recherche d'organismes pathogènes. Par ailleurs l'observatoire de la mytiliculture (réseau **MYTILOBS** opéré par Ifremer) qui suit les traits de vie de la moule sur la façade manche-atlantique réalise des **mesures** de mortalités.

- | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---|
| ○ mortalités signalées | par les professionnels | → fiches déclaratives |
| ○ mortalité estimée/évaluée | par les DDTMs ³ | → constats pouvant mener à des saisines |
| ○ mortalité mesurée | par l'IFREMER ⁴ | → réseaux ⁵ |

Un travail d'analyse des mortalités observées ces dernières années afin de définir au mieux des mortalités « anormales » est présenté en Annexe 4, p103.

² Réseau de Pathologie des Mollusques (IFREMER, surveillance des maladies coquillages).

³ Direction Départementale des Territoires et de la Mer.

⁴ et autres instituts scientifiques et techniques.

⁵ Mytilobs ; Repamo ; etc

De plus, un travail de recensement et de comparaison basé sur l'ensemble de ces sources d'informations (mesures, constats, déclaration et signalements⁶) a été ici réalisé afin **d'estimer au mieux la date initiale de départ des mortalités et la représentativité des prélèvements réalisés dans Morbleu**. Une synthèse est présentée ci-dessous mais l'ensemble des données réunies est présentée en Annexe 5, p101.

2.3.1. Déclarations 2015

Les déclarations de mortalités « anormales » correspondent à des signalements officiels que font les **professionnels** aux **autorités maritimes** pour signaler des problèmes sur leurs exploitations. Les fiches déclaratives permettent d'obtenir des informations sur la date d'apparition (déclarations) des mortalités⁷ et sur l'intensité (estimation) des mortalités au moment de leurs déclarations.

Dates d'apparition des mortalités en 2015 (données fournies par la DDTM₈₅) :

Sur la base des fiches déclaratives produites par les professionnels, les mortalités 2015 dans le **Pertuis Breton (PB)** sont signalées entre **15 avril et le 22 mai** (Tableau 1).

Pour les trois secteurs de Charente-Maritime/Vendée les déclarations ne sont pas simultanées ; elles commencent les **15 et 17 avril** pour les secteurs des **filières** et les **bouchots du nord-ouest** du Pertuis Breton (Ecluseaux et Roulières) et seulement en début **mai** pour les bouchots plus au **sud-est** (pointe de la Roche et Belle Henriette). Alors que les mortalités moyennes déclarées en avril-mai sur les filières et sur le secteur sud-est ne sont que de 13-14%, elles atteignent 24 % sur le secteur nord-ouest.

Dans la zone **Noirmoutier-Bourgneuf** deux secteurs sont analysés : la côte ouest-de Noirmoutier (bouchots de la Frandière et de la Guerinière) et la baie de Bourgneuf (bouchots de maison Blanche et du Fiol). Dans ces secteurs les mortalités sont déclarées à partir du **15 mars**. Elles sont respectivement de 53% et 60% pour les bouchots de la côte ouest de Noirmoutier et pour ceux de l'intérieur de la baie.

Tableau 1. Périodes de déclarations des mortalités (par secteurs géographiques). Début des déclarations comme indicateur des dates d'apparition des mortalités

Secteur	Période de déclarations	Nombre de déclarations	Mortalité moyenne déclarée (%)
Filières du Pertuis Breton	15 avril – 18 mai	10	13,8
Nord-ouest du Pertuis Breton	17 avril – 6 mai	14	23,9
Sud-est du Pertuis Breton	4 mai – 22 mai	3	13,3
Côte ouest de Noirmoutier	15 mars – 15 avril	8	53,2
Baie de Bourgneuf	15 mars – 18 avril	7	60,0

Ainsi sur la base des déclarations des professionnels auprès de la DDTM₈₅, la première zone impactée en 2015 serait Noirmoutier-Bourgneuf, avec de premières déclarations en mars, puis le Pertuis Breton en avril-mai.

⁶ Alors qu'une déclaration est officielle (cadre administratif précis), le signalement relève de sources diverses.

⁷ Sachant que cette mortalité est susceptible d'évoluer dans le temps

2.3.2. Les mortalités : Constats, mesures, signalements et saisines

Les DDTMs effectuent des « **constats** réguliers » pour fixer les conditions d'exploitation de gisements (moules, coquilles St Jacques, etc.) et des « constats irréguliers » en cas d'évènements jugés anormaux. En 2014 et 2015, des **constats** ont été réalisés par les autorités maritimes des départements de Charente-Maritime et de Vendée (DDTM₁₇ et DDTM₈₅) avec les CRC, les professionnels, et les scientifiques de l'IFREMER (Tableau 2). Les mesures de mortalités en panier sont effectuées par le réseau MYTILOBS et les résultats de mortalités du réseau MYTILOBS sont présentés en détail dans le rapport MYTILOBS 2014 (Robert *et al.*, 2015). Par ailleurs, des **signalements** (de sources diverses) apportent des informations complémentaires sur les mortalités 2014 et 2015. Enfin, trente **saisines** ont été réalisées en 2014 et 2015 en lien avec les mortalités de moules pour recherche d'agents infectieux (Réseau Repamo, rapport 2015) en Bretagne (Finistère), Normandie (Cotentin – Calvados), Loire Atlantique (La plaine sur mer), Nord Vendée (Noirmoutier et Baie de Bourgneuf, Charente-Maritime – sud Vendée (Pertuis Breton et d'Antioche) et Côtes d'Armor (Lannion)

signalements :	sources diverses et variées mais beaucoup d'informations à traiter qualité variable et nécessité de vérifier la source
constats :	bilan quantitatif des mortalités sur les zones sinistrées
saisines :	représentation qualitative des secteurs touchés recherche d'organismes pathogènes

Tableau 2. Estimations de mortalités issues des constats réalisés par les DDTMs (avec professionnels et Ifremer) (les sites sont classés géographiquement du sud vers le nord)

DDTM	secteurs	sites	2014			2015		
			mars-14	avr-14	mai-14	janv-15	avr-15	oct-15
17	Antioche	Boyard	<5					
85	Pertuis Breton	Aiguillon	15	65		0		
85	Pertuis Breton	Pertuis Breton	75	100		0	8,3	15
85	Pertuis Breton	Pointe de la Roche	30	90		0		3
85	Pertuis Breton	Pas de Tranchais	35	90		0		8
85	Pertuis Breton	Belle-Henriette	45	100		0		30
85	Pertuis Breton	Ecluseaux	75	100		0	7,5	30
85	Pertuis Breton	Roulières	55	100		0		30
85	Les Conches	Ile d'Yeu		10-15		0		25
85	ouest-noirmoutier	Frandièrre			50	0	95 (1 an) 92 (2 ans)	88 (1 an) 100 (2 ans)
85	ouest-noirmoutier	La Tresson			15	0	45 (1 an) 60 (2 ans)	45 (1 an) 60 (2 ans)
85	baie de Bourgneuf	gisements			0	1 an ans	2 70	70
85	baie de Bourgneuf	Maison Blanche			0	65 (1 an) 25 (2 ans)	100 (1 an) 90 (2 ans)	100 (1 an) 90 (2 ans)
85	baie de Bourgneuf	Fiol-Northe			0	1 an ans	2 80 (1 an) 70 (2 ans)	80 (1 an) 70 (2 ans)
44		La Plaine/mer			0	0	15	50

	filières
	gisements
	bouchots

Le paragraphe suivant présente de façon **chronologique** les principales mesures, constats, signalements en lien (ou potentiellement en lien) avec les mortalités de moules (Tableau 3 et données complètes en Annexe 5). **Signalement, constats et saisines sont ici combinés pour avoir une vision plus précise du déroulé des évènements.**

Le **5 février 2014** des mortalités anormales de moules sauvages captées sur tables ostréicoles sont signalées par un professionnel de la Fosse de Loix (Ile de Ré).

En **mars 2014** les moules du Pertuis Breton subissent un épisode de mortalités massives qui touche l'ensemble du pertuis en quelques semaines (Béchemin *et al.*, 2014, 2015) (constats). Ces mortalités sont apparues en fin d'hiver (mi-mars) sur les filières du Pertuis Breton (21%) et sur les bouchots de l'Aiguillon (8%) (mesures MYTILOBS). A cette période aucun autre secteur n'est touché (mesures) et les mortalités sont inférieures à 5% dans le Pertuis d'Antioche (Yves et Boyard).

Les mortalités atteindront des valeurs proches de 100% sur les sites Aiguillon et Filière au cours du mois **d'avril** (mesures). Au cours du printemps également, des mortalités apparaissent dans le sud (Pertuis d'Antioche) où les taux atteignent 20-50 % (constats, mesures) et plus au nord également sur la côte ouest de Noirmoutier (sites de La Tresson et La Frandière touchés à environ 70% (signalement puis constats). Ailleurs en France les mortalités restent inférieures à 5% (mesures).

Au cours de **l'automne 2014**, des mortalités sont signalées par les professionnels et la DDTM₈₅ à la fois sur des gisements naturels de la baie de Bourgneuf et sur les bouchots à l'Ouest (Maison Blanche) et à l'Est (Le Fiol) (signalements).

Le **12 janvier 2015**, des mortalités de moules sauvages sont à nouveau constatées à la Fosse de Loix (Ile de Ré) (signalement) (sur le même site qu'en février 2014). Durant **l'hiver 2015** les mortalités de moules atteignent 30 à 90% sur les principaux gisements naturels et sites d'élevage de la région de Bourgneuf-Noirmoutier alors que la mortalité reste inférieure à 10% dans les Pertuis Charentais (constats et mesures).

Au cours du **printemps 2015** la mortalité s'accroît encore dans la région de Bourgneuf pour atteindre 100% sur certains sites mytilicoles (valeurs comprises entre 20 et 100%) (constats et mesures). Une mortalité de 20-30% est par ailleurs observée sur les filières Est de l'île d'Aix (signalement).

A la fin **juin 2015**, des mortalités de 30% sur les Filières du Pertuis Breton (PB), 20% sur les bouchots de l'Aiguillon et des Roulières, 12% sur Boyard et 5% sur Yves, sont mesurées (MYTILOBS)

En **décembre 2015**, les mortalités sont de 22% et 15% respectivement sur les bouchots d'Aiguillon et de Boyard. Elles atteignent 50% sur le site des Filières du PB. Sur les autres sites du réseau MYTILOBS la mortalité cumulée est de 15%, 9% et 20% respectivement pour les sites de Pont Mahé (baie de Vilaine), du Vivier (baie du Mont St Michel) et d'Agon (Ouest Cotentin) ; sachant que la mortalité sur ce dernier site est régulièrement amplifiée par la prédation liée aux bigorneaux perceurs (mesures).

Sur le site de **Loix en Ré** (site d'origine des premières mortalités de moules 2014), la mortalité atteint 55% (mesures Morbleu). C'est la plus forte mortalité observée en 2015 dans les Pertuis Charentais (Breton et Antioche). L'été et l'automne 2015 semblent marqués (signalements et constats) par la persistance de mortalités chroniques sur plusieurs sites mytilicoles et par l'apparition de mortalités dans d'autres secteurs (octobre en particulier) tels que La Plaine sur mer (bouchots), les Iles Chausey (sites de filières) et Lannion (site de filières) (signalements et constats).

2.4. Que retenir de tout cela ?

Mortalités normales et anormales

Les pratiques de la mytiliculture ne permettent pas un suivi des effectifs de moules en élevage. La pratique est orientée vers la croissance et la production. De plus, le dégrappage des moules moribondes (et moules associées) et la disparition rapide des chairs d'animaux rendent difficiles l'estimation des mortalités. Les pertes de naissains sur cordes, entre le printemps et l'été, sont comprises entre 50% et 90% (avant mise sur bouchots). Puis les pertes peuvent encore concerner 25 à 85% des cheptels au cours de l'élevage sur bouchots. Les pertes maximales relèvent à la fois des pratiques culturales, des conditions météorologiques, de la prédation, de la compétition spatiale et d'éventuelles maladies. **Les causes possibles de mortalités sont nombreuses et les pertes sont souvent le résultat d'une association d'éléments.**

Des sources d'informations multiples pour estimer, quantifier et dater

Face aux difficultés de mesurer des effectifs dans les élevages professionnels et du fait des pratiques culturales propres à la filière moule, les scientifiques ont mis en place depuis les années 1990 des « paniers » permettant des mesures de mortalités sur les sites mytilicoles. La mise en place de réseaux d'observation mytilicole dans certaines régions telles que la Charente-Maritime, la Vendée et la Normandie) a permis de mesurer des mortalités (au lieu d'estimer des pertes). Les séries historiques constituées depuis 1990 dans le Pertuis Breton permettent de quantifier les mortalités «en paniers ».

Les constats réalisés par les DDTMs apportent une estimation quantitative des mortalités. Ces données n'ont pas la précision des mesures des réseaux, en raison des contraintes techniques propres à la filière moule, déjà évoquées précédemment. Toutefois ces constats ponctuels, conduits sur 2-3 jours et 2-3 fois au cours des années 2014 et 2015 concernent une grande partie des secteurs impactés par les mortalités.

Grâce à ces différentes sources d'information nous avons pu **retracer les évènements de mortalités de 2014 et 2015 et valider l'échantillonnage réalisé dans Morbleu** (au niveau temporel et spatial). L'analyse des échantillons collectés a ainsi été réalisée afin de caractériser les conditions environnementales dans lesquelles ces évènements ont eu lieu ainsi que les animaux impactés.

Les analyses du contexte environnemental (4.3, 4.4 et 4.5) ont également tenu compte de ces données afin de rechercher des paramètres qui seraient communs aux premiers temps de mortalités en 2014 et 2015, sur les sites impactés.

OBJECTIF 1 : REGARD SUR 15 ANNEES

3. Objectif 1 : Regard sur 15 années

Au printemps 2014, la mytiliculture de Charente-Maritime a connu une crise sans précédent; un épisode d'intenses mortalités de moules a touché les zones d'élevage, décimant sur certains secteurs jusqu'à 100% de la production (Béchemin *et al.*, 2015). Le contexte environnemental rencontré en début d'année 2014 est caractérisé par une période aux **températures plutôt douces** et un **régime pluviométrique fort** induisant d'importants apports en eau douce accompagnés d'une charge élevée en matière en suspension (dessalement et turbidité plus élevées qu'à l'accoutumée sur les zones d'élevage, notamment les plus maritimes).

Ce contexte hydroclimatique très particulier et l'identification d'agents infectieux retrouvés dans les animaux moribonds (bactéries appartenant au genre *Vibrio* sp. dont certaines souches peuvent présenter un caractère pathogène pour les moules (Ben Cheikh *et al.*, 2016)) pourraient être en partie associés au déclenchement de ce phénomène (Béchemin *et al.*, 2015).

Cet épisode de mortalité survient dans une **période climatique perturbée**, où la hausse des températures est significative. Ces hausses de température provoquent des modifications écologiques certaines, notamment sur le compartiment microbien des écosystèmes marins : on note ainsi que les conditions environnementales deviennent de plus en plus favorables aux bactéries du genre *Vibrio* sp. (Vezzulli *et al.*, 2012), que les interactions entre bactérie et phytoplancton entraînent des modifications de la structure de leurs communautés souvent à la faveur de l'hétérotrophie (Degerman *et al.*, 2013), avec notamment l'apparition de nouveaux taxons bactériens (Von Scheibner *et al.*, 2014). La **dynamique microbienne** reste gouvernée par la succession saisonnière de communautés (phytoplancton-bactéries-consommateurs primaires), néanmoins l'évolution des abondances et des compositions spécifiques du phytoplancton peuvent privilégier le développement de certains types bactériens (Buchan *et al.*, 2014).

Ce travail a pour objectifs (1) **d'analyser les données de mortalité de moules observées depuis une quinzaine d'années** afin de faire ressortir les années de mortalités « anormales », et (2), sur la base de ce regroupement d'années, **d'identifier des recoupements entre les fluctuations environnementales** (juste avant les premiers événements) **et les mortalités** en s'appuyant sur des indicateurs climatiques très globaux (température atmosphérique et précipitation) et un proxy des équilibres microbiens (flore micro-phytoplanctonique). Enfin, **la dynamique du micro-phytoplancton** (composition floristique) est analysée de telle manière à identifier d'éventuelles relations avec les phénomènes de mortalités « anormales ».

Le 'matériel et méthodes' correspondant est présenté en Annexe 6, p109.

3.1. Historique des mortalités

Un suivi des productions mytilicoles dans les Pertuis Charentais a été initié au début des années 2000 ; Dans ce cadre, différents traits de vie sont suivis : la croissance (coquille, poids de chair), la reproduction et le niveau de mortalité.

La Figure 1a1 illustre l'évolution des taux de mortalités printanières et souligne **l'importance du phénomène rencontré en 2014** : Aiguillon 83% [75% - 89%], Filière 76% [68% - 83%] et Yves 44% [35% - 53%]. Quel que soit le site (exception faite de Boyard), l'année 2014 fait figure d'année exceptionnelle en termes de mortalité printanière (Figure 1a2).

Les séries historiques de chaque station font apparaître une **variabilité inter-annuelle** plus ou moins marquée (Figure 1a2). Ces fluctuations spatio-temporelles permettent de regrouper certaines années en fonction de l'intensité des mortalités. Outre l'année 2014, atypique, 2015 et le groupe d'années 2001, 2003 et 2005 se distinguent du reste de la série (Figure 1b). Ce dernier groupe de 3 années est caractérisé par des taux de mortalité légèrement supérieurs (~ 8 à 14% en moyenne suivant la station, groupe rouge de la Figure 1b) à ceux les plus souvent observés (~ 2 à 5% en moyenne suivant la station, groupe noir de la Figure 1b), notamment sur les stations Aiguillon et Yves.

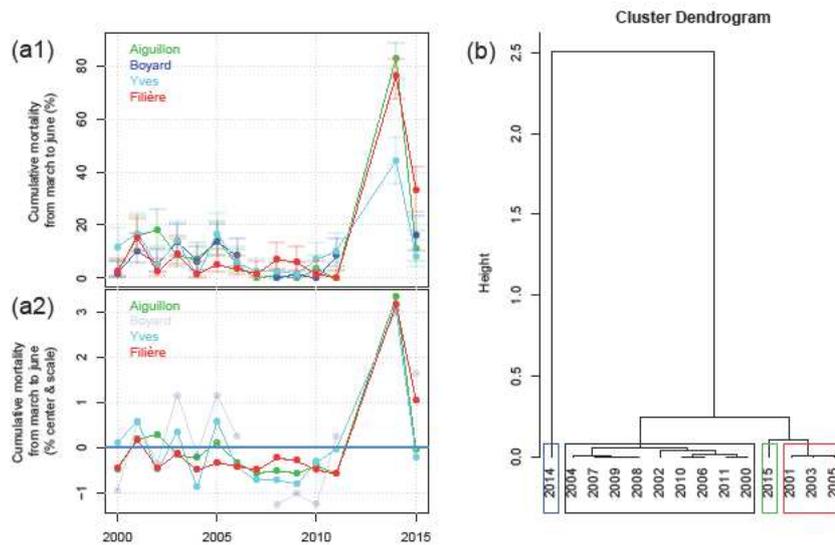


Figure 1 : Historique des taux de mortalité printanière observés entre les mois de mars et juin de 2000 à 2015 sur les stations Aiguillon, Boyard, Yves et Filière.

L'évolution inter-annuelle (et intervalles de confiance Logit à 95%) est représentée par station sur les graphiques (a1) et (a2) (taux de mortalités centrés réduits). Le graphique (b) illustre le regroupement des années (cluster) sur la base des taux de mortalités des sites Aiguillon, Yves et Filière (distance euclidienne et méthode de Ward). Données Remoula et MYTILOBS.

Ainsi 2015 est marqué par **(1) de faibles mortalités** sur les stations **Aiguillon et Yves** s'inscrivant dans le groupe intermédiaire (groupe rouge de la figure 1b) avec des taux respectifs de 11% [6.5% - 18%] et de 8% [4.3% - 14.4%] de mortalité, et **(2) des mortalités plus élevées pour la station Filière** (33% [25.2% - 41.9%] de mortalité). En 2015, seule cette station **Filière** présente des **taux de mortalité significatifs** contrairement à 2014 où des mortalités printanières significatives ont été observées sur l'ensemble des sites suivis des Pertuis Charentais: mortalités néanmoins plus prononcées dans le nord des pertuis avec des taux > 68% aux stations Aiguillon et Filière (Figure 1a1).

3.2. Conditions environnementales : années atypiques

- Variables climatiques

Deux variables climatiques ont été sélectionnées pour représenter les fluctuations environnementales. D'une part, la **température atmosphérique** (servant de proxy de la température de l'eau de mer) a été choisie pour prendre en compte l'aspect "promoteur/driver" biologique et chimique de ce paramètre, et d'autre part, les **précipitations** qui symbolisent les apports naturels et anthropiques (nutriments, contaminant, matière en suspension,...) issus des fleuves. Les indicateurs de position (médiane et cumul) et l'indicateur de dispersion (écart type=SD) calculés pour chaque variable climatique permettent de discriminer les années entre

elles : la médiane et le cumul résumant une valeur caractéristique de l'année, respectivement pour la température et la pluviométrie et, l'écart type traduisant la variabilité ou la dynamique (intensité) rencontrée.

Les **températures atmosphériques hivernales** observées depuis le début des années 2000 présentent une **grande variabilité tant au niveau de la position que de la dispersion** (Figure 2a) : le faible ajustement entre ces 2 indicateurs l'atteste ($R^2=0.34$, $p=0.016$). Les années **2014 et 2007**, voire 2008 et 2002, apparaissent comme des années aux températures hivernales plutôt douces et plus homogènes que ne le sont les années 2005 et 2010 (plutôt froides et plus dispersées). L'année **2015** se situe quant à elle en **position intermédiaire** tout comme les années 2000, 2004, 2009 et 2011.

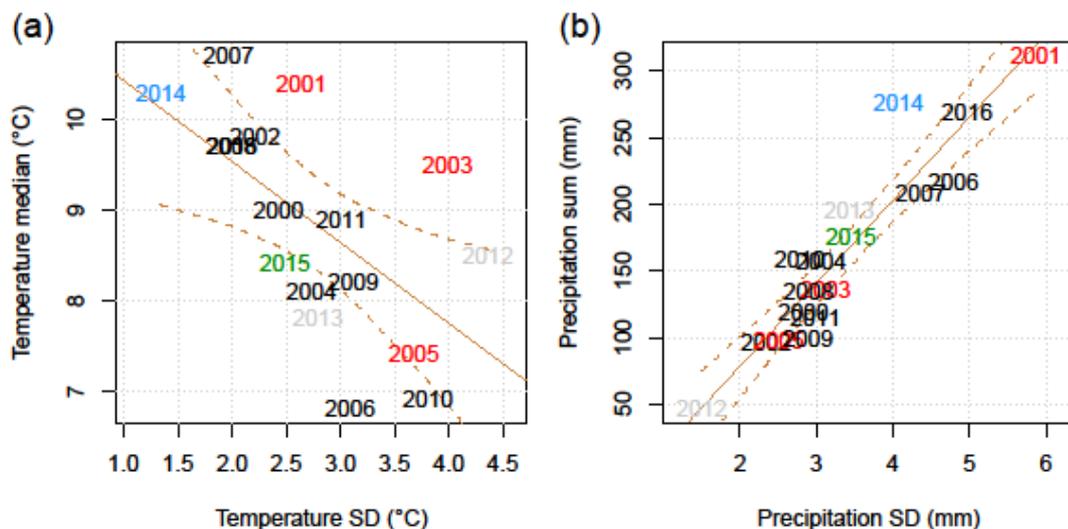


Figure 2 : Situation des températures atmosphériques et précipitations annuelles hivernales (agrégation des mois de janvier, février et mars) relevées à la station "Chassiron" (Météo France) sur la période de 2000 à 2015.

Le graphique (a) discrimine les années sur la base des médianes et des écarts type (SD) des températures atmosphériques calculés à partir des données journalières des 3 premiers mois de chaque année. La discrimination des précipitations hivernales s'appuyant sur les cumuls pluviométriques et les écarts types des 3 premiers mois de chaque année est représenté sur le graphique (b). Figurent également, les droites de régression (et d'intervalles de confiance à 95%) pour la température ($R^2=0.34$, $p=0.016$) et les précipitations ($R^2=0.85$, $p<0.01$). Pour chaque graphique, le code couleur propre aux années s'appuie sur les résultats du regroupement des années basé sur les taux de mortalité (Figure 1b): Couleur noire pour le groupe de plus basse mortalité, couleur rouge pour le groupe intermédiaire, couleur verte pour l'année 2015, couleur bleue pour l'année 2014 et grisée pour les années sans données de mortalité.

L'intensité des mortalités ne semble pas liée directement à la température et à ses fluctuations tant les années identifiées à partir des différents niveaux de mortalité (Figure 1b) n'apparaissent pas regroupées (Figure 2a, code couleur).

Le constat est identique pour les précipitations (Figure 2b), néanmoins le bon ajustement de relation linéaire entre le cumul et l'écart type des précipitations ($R^2=0.85$, $p<0.01$) permet de distinguer le **positionnement atypique de l'année 2014**. L'important cumul pluviométrique (276 mm) pour le niveau de variabilité (écart type) proportionnellement faible par rapport au modèle linéaire (écart-type observé (SD=4.04) < écart-type théorique (SD=4.93)) révèle que le régime des précipitations hivernales de 2014 a été plus stable que les autres années : le nombre de jour de pluie étant plus élevé que la normale, notamment en février (Météo France, 2014).

- Diversité phytoplanctonique

Les flores micro-phytoplanctoniques sont prises en compte dans ce travail comme proxy de la dynamique microbienne: la dynamique phytoplanctonique étant précurseur du réseau trophique pélagique et les interactions phytoplancton-bactérie étant nombreuses et fondamentales notamment dans ce type de réseau (Bertrand *et al.*, 2012). La diversité des communautés phytoplanctoniques peut donc se révéler être un indicateur de l'"ambiance" microbienne, et plus particulièrement sa diversité.

Les indices de diversité du micro-phytoplancton, richesse générique (generic richness) et équitabilité (equitability), sont présentés en Figure 4. Les graphiques 4a, 4b et 4c illustrent l'évolution de la diversité générique sur les stations Eperon, le Cornard et Boyard entre les années 2000 à 2015. **Sur cette période**, la richesse générique évolue de manière cyclique (composante saisonnière annuelle) avec des **tendances significatives** (estimées sur les séries désaisonnalisées) **à la baisse** quel que soit le secteur : $\text{Tau} = -0.26 / p < 0.01$ pour Eperon, $\text{Tau} = -0.201 / p < 0.01$ pour Cornard et $\text{Tau} = -0.35 / p < 0.01$ pour Boyard. L'équitabilité présente également une composante saisonnière annuelle. Néanmoins, seule une tendance à la baisse ($\text{Tau} = -0.125 / p = 0.01$) apparaît sur le site de Eperon.

A l'échelle des Pertuis Charentais, les indices de diversité du micro-phytoplancton ont tendance à baisser au regard des 15 dernières années. Ce constat est particulièrement marqué dans le Pertuis Breton en raison de **l'augmentation du déséquilibre entre les différents genres** présents dans la communauté micro-phytoplanctonique (équitabilité en baisse).

Les graphiques (g), (h) et (i) de la Figure 4 permettent de discriminer les années 2000 à 2015 au regard des deux indices de diversité calculés pour le mois de mars. Exception faite de la station Boyard, **les regroupements d'années par type de mortalité** (Figure 1) **n'apparaissent pas liés directement à la diversité du micro-phytoplancton**. On note cependant une proximité de positionnement entre **2014 et 2015** avec, généralement, des indices de **diversité plutôt faibles** (richesse générique < 15 et équitabilité < 0.4).

Les stations l'Eperon et le Cornard présentent les plus faibles richesses génériques (< 7 taxons), respectivement en 2015 et 2004-2001 (Figure 4g-h).

Quelle que soit la station, le positionnement relatif de 2015 souvent en bas à gauche des graphiques 4g, 4h et 4i, montre que les indices de diversité sont plutôt faibles. Cette situation est très prononcée pour la station l'Eperon avec une richesse générique et une équitabilité plus faibles que les autres mois de mars des 15 dernières années (Figure 4g).

3.3. Conditions environnementales, flores planctoniques et mortalités de moules : des premières corrélations ?

- Lien variables climatiques - mortalités de moules

L'analyse triadique partielle (PTA), réalisée à partir des variables climatiques (températures atmosphériques et précipitations) et de diversités phytoplanctoniques (richesses génériques et équitabilités) agrégées mensuellement de février à mai, permet une lecture intégrée de ces données (de fin d'hiver et de printemps) en positionnant chaque année (2000 à 2015) de manière relative. La Figure 3 en présente le résultat pour la station l'Eperon. Les 2 premiers axes de cette analyse intègrent plus de 66% de la variabilité (Figure 3a). Le premier axe (horizontal) illustre les variables climatiques avec

la température atmosphérique (Température) et les précipitations (Précipitation) vers la droite et l'écart type de la température atmosphérique (Température SD) vers la gauche (Figure 3b). Le second axe prend en compte la diversité : basse vers le haut et haute vers le bas (Figure 3b). Le compromis de la PTA (Figure 3c) peut ainsi être divisé en 4 zones : en haut à gauche en climat plutôt froid et sec (climat-) et diversité basse (diversity -), en haut à droite en climat plutôt chaud et humide (climat+) et diversité basse (diversity -), en bas à gauche en climat plutôt froid et sec (climat-) et diversité haute (diversity +) et en bas à droite en climat plutôt chaud et humide (climat+) et diversité haute (diversity +).

On note que **2011, 2014 et 2015** se situent en haut à droite symbolisant un climat **chaud et humide et des diversités plutôt faibles** ; 2015 apparaissant fortement marquée par ces derniers. Parmi ces 3 années, 2 d'entre elles (2014 et 2015) sont des années de surmortalité du Pertuis Breton.

Les années où des mortalités à des niveaux intermédiaires d'intensité ont été observées (2001, 2003 et 2005 signalées par 01, 03 et 05 en rouge / Figure 3c), apparaissent dans des ambiances environnementales très variées : climat+ / climat- et diversité+ voire indifférente de ce critère).

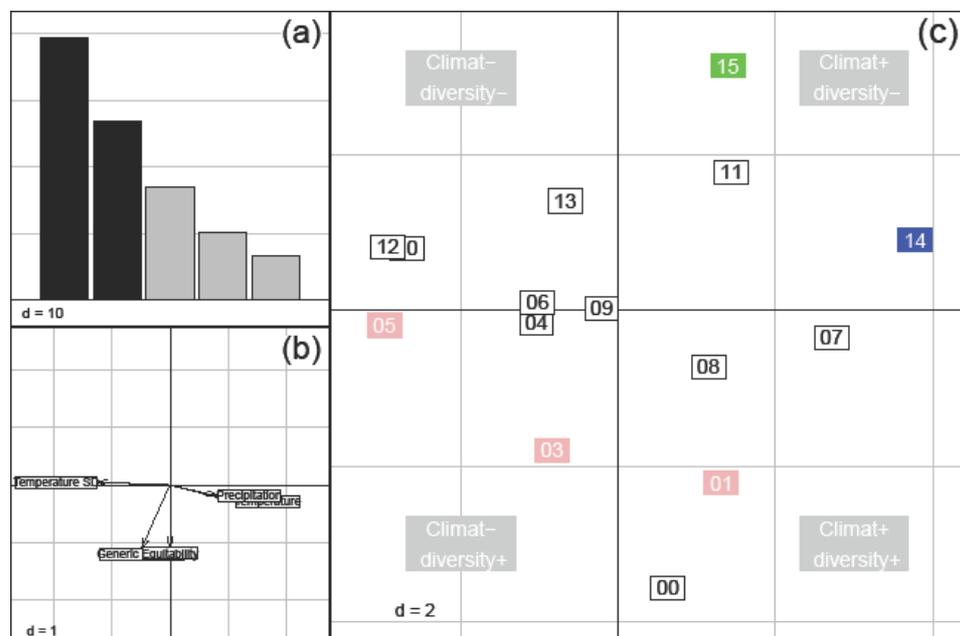


Figure 3 : 'Analyse Triadique Partielle sur les variables environnementales.

Le graphique (a) représente les valeurs propres de l'analyse pour chaque axe. Les graphiques (b) et (c) présentent les résultats du compromis respectivement, l'expression des variables (température atmosphérique (Température), écart type des températures atmosphériques (Température SD), précipitations (Précipitation), richesse générique (Generic rich.)) et des individus (les années de 2000 à 2015 représentées de 00 à 15). Sur ce dernier, le code couleur propre aux années s'appuie sur les résultats du regroupement des années basé sur les taux de mortalité (Figure 1b) : Couleur noire pour le groupe de plus basse mortalité, couleur rouge pour le groupe intermédiaire, couleur verte pour l'année 2015, couleur bleue pour l'année 2014 et grisée pour les années sans données de mortalité.

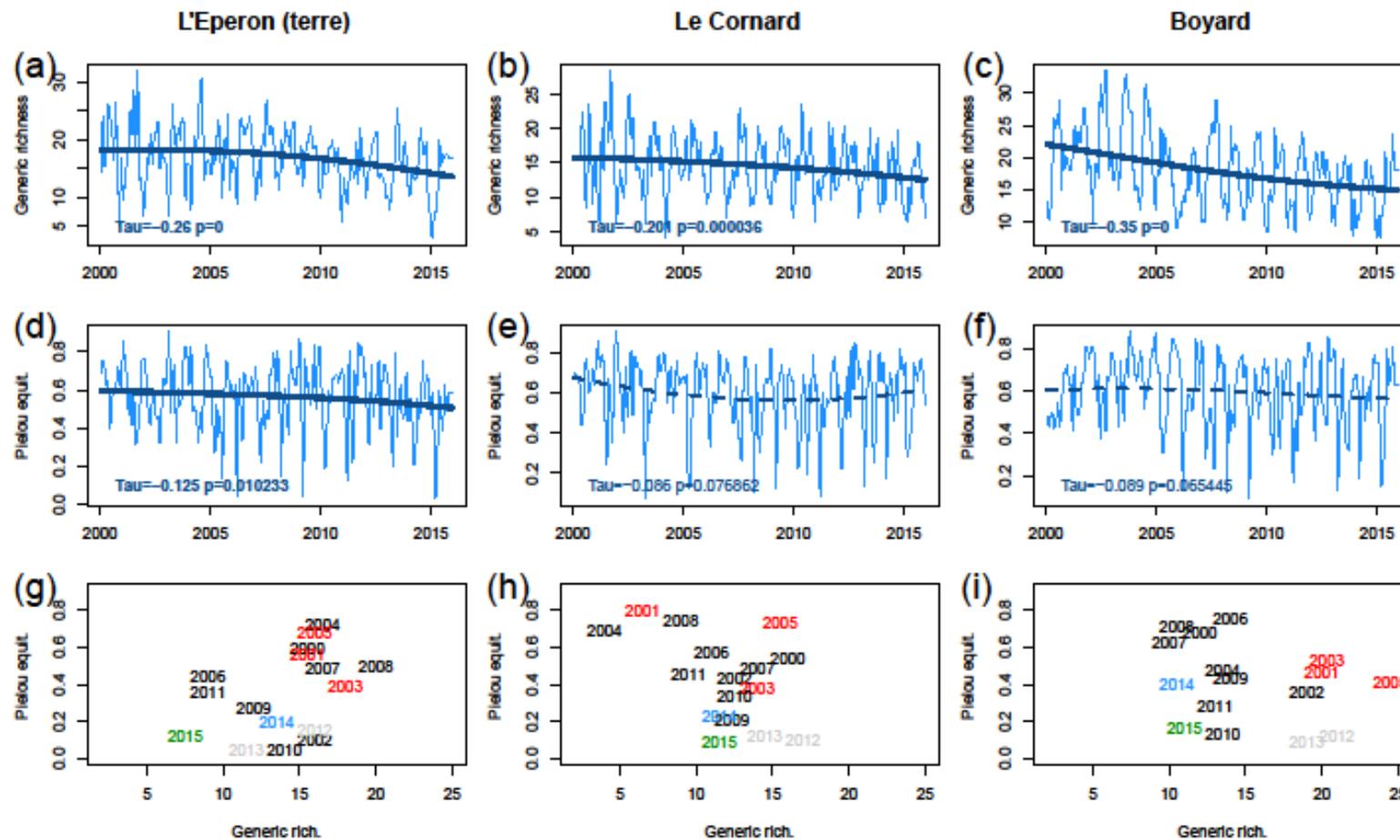


Figure 4 : Diversité micro-phytoplanctonique sur 3 stations des Pertuis Charentais (Eperon, Cornard et Boyard, respectivement en colonne de 1 à 3)

Les graphiques (a), (b) et (c) (1er ligne) représentent l'évolution de la richesse générique depuis le début des années 2000 ; Les graphiques (d), (e) et (f) (2e ligne) représentent l'évolution de l'équitabilité sur la même période. Sur chacun de ces graphiques apparaît une courbe illustrant la tendance (lissage Loess, span=3) : en trait plein lorsqu'elle est significative au seuil de 0.05 (établi à partir d'un test de Mann Kendall dont le Tau et la p-value sont signalés en bas à gauche) et en pointillé dans le cas contraire. Les graphiques (g), (h) et (i) (3e ligne) discriminent les 16 années (de 2000 à 2015) au regard de la richesse générique et de l'équitabilité. Pour chacun de ces graphiques, le code couleur propre aux années s'appuie sur les résultats du regroupement des années basé sur les taux de mortalité (Figure 1b) : Couleur noire pour le groupe de plus basse mortalité, couleur rouge pour le groupe intermédiaire, couleur verte pour l'année 2015, couleur bleue pour l'année 2014 et grisée pour les années sans données de mortalité.

- Composition micro-phytoplanctonique et mortalités de moules

Afin de limiter le biais lié à l'effet cumulé de l'évolution rapide des abondances phytoplanctoniques dans le milieu naturel et de la stratégie d'échantillonnage du REPHY (tous les 15 jours), l'analyse de la composition floristique qui suit est établie sur la base des **abondances relatives de chaque taxon** (transformation des abondances en pourcentage). Deux niveaux taxinomiques sont pris en compte, le genre et la classe (voire phylum pour les ciliés). Pour rendre compte du lien entre la présence de certaines communautés (populations) micro-phytoplanctoniques et les mortalités de moules, les contrastes suivants ont été choisis : (1) un contraste temporel en analysant les données de fin d'hiver et début du printemps (février à avril) à la station l'Eperon en 2011 et 2014 : en 2011 absence de mortalité significative contrairement à 2014, et (2) un contraste spatial par l'analyse du même type de données uniquement sur 2015 sur 3 sites : Filière où des mortalités significatives ont été enregistrées en 2015 contrairement à l'Eperon et le Cornard.

D'un point de vue **temporel** (2011 vs 2014 à l'Eperon), on note que la composition phytoplanctonique évolue différemment d'une année à l'autre : au niveau du genre, **2014** semble marquée par une **plus grande stabilité de la communauté en fin d'hiver** (semaines 7, 8 et 10 très proches / cercle orangé Figure 5a) et les communautés de 2011 et 2014 évoluent très différemment post-bloom de *Skeletonema* sp. (2014 vers le haut et 2011 vers le bas). Au regard des classes (Figure 5b), on observe que la période dite de "grande stabilité" (semaines 7, 8 et 10 très proches / cercle orangé Figure 5a) est propice aux communautés de *Diatomophyceae* et particulièrement d'*Euglenoidea* et du phylum des *Ciliophora* (Ciliés).

D'un point de vue **spatial** (Filière 2015 vs Eperon 2015 et Filière 2015 vs Cornard 2015), on note également des **cortèges phytoplanctoniques différents** notamment lors des semaines 15 et 17 : la présence et/ou des abondances relatives plus importantes de genres particuliers (*Grammatophora* sp., *Cerataulina* sp. et *Leptocylindrus* sp.), de classes particulières comme celle d'*Euglenoidea* et du phylum *Ciliophora* sont observées à la station Filière (cercles orangés Figure 6d-f). Outre ces écarts, les compositions floristiques des stations Filière et Eperon apparaissent comme très voisines.

3.4. Discussions

- Evolution spatio-temporelle des mortalités

L'analyse de l'historique des mortalités permet d'identifier 4 groupes d'intensité variable; des **mortalités significatives généralisées** avec des taux élevés (> 44%) comme en 2014, des **mortalités significatives avec des taux moyens** (33%) et **localisées** (Filière uniquement) comme en 2015, et **deux autres groupes de faibles mortalités**. L'écart entre ces deux derniers groupes peut en partie s'expliquer par la variabilité de la qualité des lots déployés d'une année sur l'autre : la mortalité associée à ces groupes peut être qualifiée de mortalité naturelle ou résiduelle : mortalité < 15%.

- Mortalités et fluctuations environnementales

L'unique prise en compte des conditions climatiques ne permet pas de faire le lien avec les mortalités significatives: d'une part, **2014 et 2015** ne présentent **pas de caractéristiques thermiques et pluviométriques similaires** (Figure 2), et d'autre part des années climatiquement proches comme 2014, 2007 ou 2001 ne sont pas associées systématiquement à des mortalités significatives de moules.

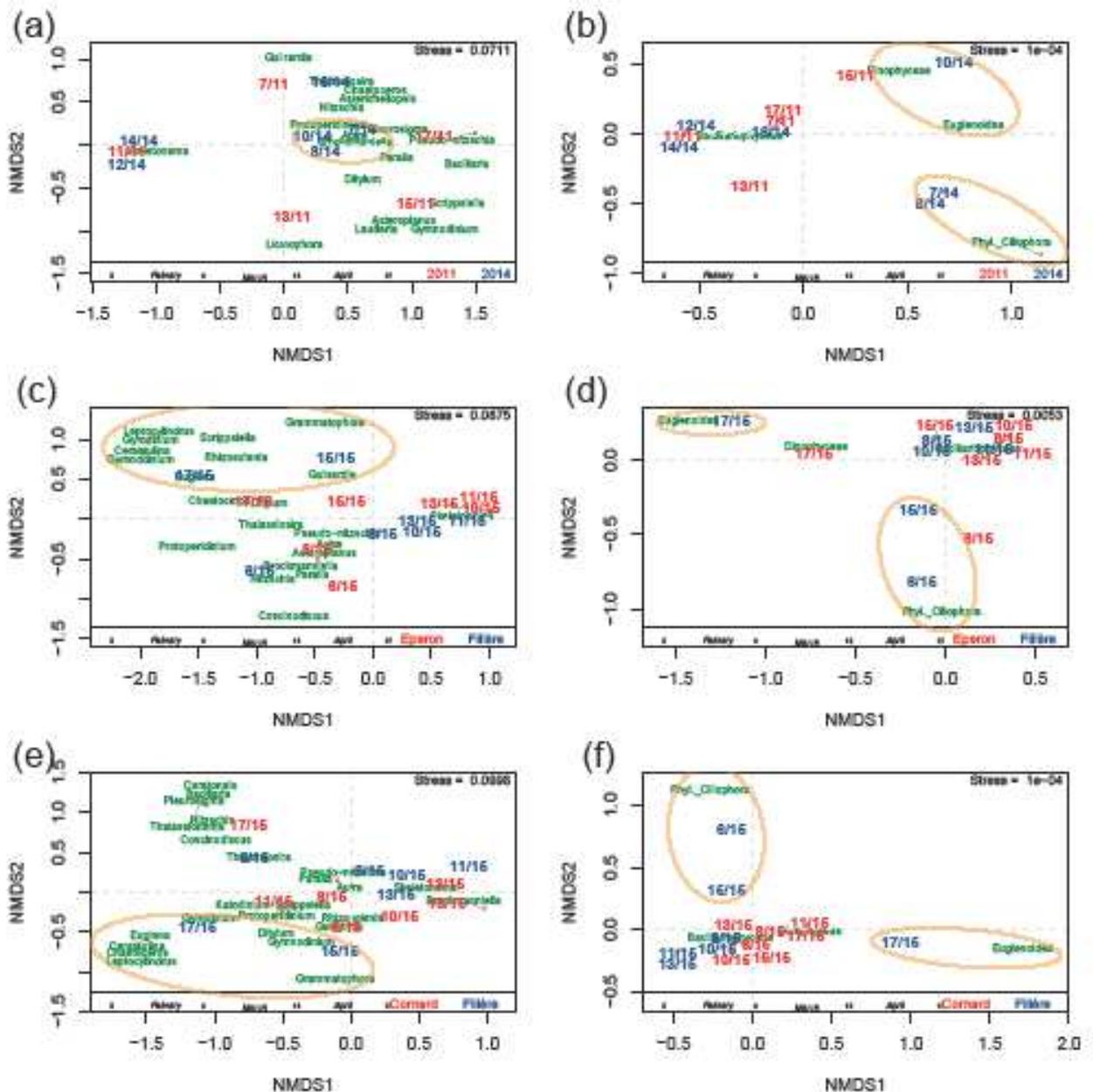


Figure 5 : Résultat du positionnement multidimensionnel (nMDS) sur les compositions floristiques au niveau du genre et de la classe.

Les graphiques (a) et (b) représentent et discriminent les positionnements de chaque échantillon (identifié par le numéro de semaine et l'année) en 2011 et 2014 à la station l'Eperon (contraste temporel). Sur la même forme, les graphiques (c) et (d) s'appuient sur les résultats de 2015 pour faire apparaître les contrastes spatiaux entre les stations Eperon et Filière. Idem pour les graphiques (e) et (f) avec les stations Cornard et Filière.

Bien que le cycle annuel du phytoplancton soit largement conditionné par le climat (bloom printanier de diatomées suivi par le développement de dinoflagellés), les cycles plus courts sont dépendants de phénomènes biologiques et biogéochimiques (Winder et Cloern, 2010). Ainsi, la dynamique du phytoplancton présente une part de variabilité indépendante des conditions météorologiques. La diversité micro-phytoplanctonique semble également présenter une certaine indépendance vis-à-vis du climat à l'échelle intra-saisonnière tant les variables climatiques et de diversité ne figurent pas sur les mêmes axes de la PTA (Figure 3). Dans tous les cas de figure, le positionnement inter-annuel des indices de diversité du mois de mars ne permet pas de distinguer un éventuel lien entre la diversité phytoplanctonique et les mortalités de moules (Figure 4). Néanmoins, **les années à mortalités significatives (2014 et 2015) sont des années où les indices de diversité sont faibles**, notamment en 2015 à l'Eperon.

Bien qu'individuellement, les fluctuations environnementales ne laissent pas apparaître de lien direct avec les mortalités de moules, leur **regroupement** permet de distinguer des **conditions environnementales** leur étant **favorables**. Ainsi, les années chaudes et pluvieuses où les indices de diversité (richesse générique et équitabilité) sont bas semblent plus propices aux mortalités printanières de moules (Figure 3).

L'orientation des tendances climatiques, avec l'augmentation des températures et du régime pluviométrique (Dore, 2005) et la baisse des indices de diversité (Figure 3), laisse présager d'autres perturbations de l'écosystème des pertuis. Les épisodes de mortalités de moules de 2014 et 2015 s'inscrivent non seulement dans ce schéma mais également dans une période où les Pertuis Charentais connaissent une augmentation significative des biomasses phytoplanctoniques. En effet, des analyses récentes menées dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) montrent que les tendances en biomasse phytoplanctonique augmentent significativement depuis quelques années dans les Pertuis Charentais (Auby *et al.*, 2015).

Ces augmentations suggèrent une très probable orientation des communautés phytoplanctoniques favorables aux cellules de plus grosse taille qui contribuent davantage à la biomasse globale et à l'intensité d'efflorescences mono-spécifiques qui sont susceptibles d'entraîner des baisses de diversité (Irigoien *et al.*, 2004). Ces hypothèses trouvent un écho particulier dans le Pertuis Breton où la richesse générique et l'équilibre entre les différents taxons baissent simultanément (Figure 4a-d). La masse d'eau de ce secteur classée en état écologique moyen au titre de l'indicateur macro-algue de la DCE (classement le plus dégradé des Pertuis Charentais) renforce la particularité du Pertuis Breton d'un point de vue de la production primaire. Ces évolutions de la diversité phytoplanctonique ne sont probablement pas sans conséquence sur les équilibres microbiens tant les interactions phytoplancton-bactérie (Droop, 2007 ; Buchan *et al.*, 2014) jouent un rôle important et nécessaire dans les réseaux trophiques pélagiques (Amin *et al.*, 2012).

- Structure de la communauté microbienne et mortalité de moules

Les interactions phytoplancton-bactérie constituent un élément fondamental des équilibres microbiens et contribuent à la structure de ces communautés. Ainsi la synergie ou la concurrence entre les espèces peut conduire la diversité d'un écosystème (Amin *et al.*, 2012). Les changements dans la composition des communautés de phytoplancton sont ainsi susceptibles d'influer la composition des communautés bactériennes, notamment lorsque ces dernières y sont attachées (Rooney-Varga *et al.*, 2005).

La présomption de responsabilité de bactéries pathogènes dans les épisodes récents de mortalités moules laisse présager une évolution de la structure de communauté microbienne favorable à l'émergence de certains taxons (pathogènes). Dans ce sens, l'analyse des compositions phytoplanctoniques réalisée dans des environnements "spatio-temporellement" contrastés montre que des **compositions phytoplanctoniques particulières apparaissent au début de chaque épisode de surmortalité** (Figure 5). Ainsi, on note aux **périodes où les premières mortalités ont été recensées** (Introduction, paragraphe 2.3.2, en février-mars (semaines 7, 8 et 10) 2014 et en avril 2015 (semaines 15 et 17)) des **abondances relatives plus élevées** appartenant aux communautés du phylum *Ciliophora* voire de la classe des *Euglenoidea* (Figure 5b-d-f). Au niveau du genre, on observe également des cortèges **très spécifiques aux dates correspondant au début des mortalités**: certaines populations, *Grammatophora* sp., *Cerataulina* sp. et *Leptocylindrus* sp. apparaissent entre autres comme très singulières de la station Filière, seul site des Pertuis Charentais où des mortalités significatives ont été enregistrées en 2015 (Figure 5c-e). On peut se demander si certaines de ces populations pourraient alors entretenir des liens spécifiques profitables à des populations de bactéries (Rooney-Varga *et al.*, 2005), dont certaines pourraient être pathogènes pour les moules. En outre, l'absence de populations de phytoplancton, ayant de propriété antibactérienne, pourrait également profiter à certains types bactériens (Scholz et Liebezeit, 2012).

Dans tous les cas de figure, les abondances relatives plus élevées de ciliés (phylum *Ciliophora*) concomitantes avec le début des mortalités laissent **présager d'une intense activité microbienne** avec la probable présence de bactéries ou de phytoplancton de petite taille favorable au développement de ces organismes hétéro- voire mixo-trophes.

3.5. Conclusions

Ce travail montre que les épisodes de surmortalité de 2014 et 2015 des Pertuis Charentais sont survenus dans des **conditions climatiques plutôt chaudes et pluvieuses** associées à des **indices de diversités phytoplanctoniques bas** (nombre de taxons et équilibre quantitatif entre ces taxons).

La concomitance de (1) l'évolution de la diversité phytoplanctonique à l'échelle inter-annuelle, et (2) la spécificité de cortèges phytoplanctoniques dans la dynamique saisonnière avec l'apparition des mortalités des moules **laisse apparaître un lien entre les mortalités et la dynamique phytoplanctonique** observées dans les Pertuis Charentais. Ce constat et les liens étroits qui existent entre phytoplancton et bactérie confortent l'hypothèse d'une origine microbienne et plus particulièrement bactérienne dans ces épisodes de surmortalité de 2014 et de 2015 : la structure de la communauté phytoplanctonique ou la présence de certains taxons pouvant favoriser l'émergence de certains types bactériens potentiellement pathogènes pour les moules.

Ce travail souligne également l'évolution de la composante autotrophe des Pertuis Charentais et plus particulièrement celle du Pertuis Breton : des biomasses phytoplanctoniques à la hausse depuis 2009, des indices de diversité à la baisse depuis quelques années, un indicateur macro-algues dégradé.

Ces indicateurs sont autant d'éléments qui s'ajoutent voire s'associent aux crises environnementales récentes, comme celles des mortalités de moules ou d'épisodes prolongés d'algues toxiques. L'ensemble interpelle et suggère un regard plus ciblé sur cet écosystème dans un contexte climatique en profonde évolution.

**OBJECTIF 2 : DECRIRE LES MORTALITES
OBSERVEES EN 2015**

4. Résultats – Objectif 2 : Décrire les mortalités observées en 2015

Le suivi mis en place dans le cadre de l'action MORBLEU en 2015, a pour objectif de décrire le plus finement possible le contexte des mortalités de moules au sens large (celles rapportées en 2014 et celles qui pourraient être observées en 2015): conditions environnementales, animaux touchés et éventuels agents infectieux associés.

Stratégie : Une approche pluridisciplinaire

Afin d'avoir une approche la plus complète possible pour aborder ces objectifs une démarche pluridisciplinaire s'imposait et plusieurs équipes de différents laboratoires ont été mobilisées dans leur domaine d'expertise : quatre laboratoires de l'Ifremer, LGPMM, LERPC, LSEM, LPI, un laboratoire CNRS-UM2, l'ISEM.

L'action MORBLEU proposée en 2015, a été limitée à l'emprise des sites de mortalités massives de moules observées en 2014, entre le sud Vendée (85) et les Pertuis Charentais (17). La coordination générale a été assurée au niveau du LGPMM à La Tremblade, la coordination opérationnelle et terrain a été assurée par le LERPC.

Une mutualisation de moyens

Dès la conception du projet, une **stratégie particulière a été retenue pour minimiser les coûts tout en augmentant les moyens mobilisables**. L'étude a été structurée pour s'adosser à des réseaux Ifremer préexistants et pérennes (MYTILOBS, REPHY, RESCO, REPAMO) permettant de **mutualiser et renforcer les moyens et les données** nécessaires (mesures, prélèvements, sorties en mer, métrologie). Il a été fait également appel à des séries temporelles de l'Ifremer ou d'autres organismes (ex. base Quadrige, base REMOULA, PREVIMER, MétéoFrance; données physico-chimiques, climatiques, biométriques, hydrodynamiques, floristiques,...). Pour illustrer cette mutualisation on citera les sorties en mer communes dans les pertuis avec les embarquements des Phares et Balises pour le REPHY, la DCE et MORBLEU. De même, les lots sentinelles de moules et les sorties en mer du suivi MYTILOBS sont partagés avec MORBLEU.

Le 'matériel et méthodes' est présenté en Annexe 6, p111.

4.1. Dispositif et ensemble des échantillons collectés

De fait **chaque campagne de prélèvement en mer nécessite deux sorties (Pertuis Breton au Nord et Pertuis d'Antioche au Sud) et deux embarcations le même jour** où dans les 48h (**Phares et balises au Nord et Ifremer au sud**), selon les conditions de la météo marine.

La description des mortalités et des conditions associées s'adossera (1) au réseau MYTILOBS qui réalisera les échantillonnages sur le terrain et fournira les données de mortalité observées en temps réel sur les lots sentinelles déployés, et (2) aux actions liées à la surveillance des maladies des mollusques, pour caractériser les potentiels agents infectieux présents (actions proposées pour financement à la DGAI dans le cadre de la surveillance des moules, évoquée ici pour information).

Des analyses conditionnées

Les limites de l'étude ont été bornées par : un financement alloué pour un an avec deux étapes d'allocation, un versement dès le démarrage du projet pour sa mise en place, puis un deuxième versement conditionné à l'apparition de mortalités exceptionnelles dans le

cours de l'année sur les secteurs suivis. Ce dernier volet (avenant) était dédié au financement des analyses des échantillons collectés durant la campagne MORBLEU 2015. Ce contexte a imposé de limiter le périmètre de l'étude au suivi de stations situées dans les Pertuis Charentais et le secteur sud Vendée (3 ou 4 sites maximum).

La stratégie mise en place en terme d'échantillonnage a donc consisté à **collecter, prélever et bancariser des échantillons de moules et d'eau (conservation par fixation ou cryopréservation), a priori, pour réaliser des analyses selon les conditions et mortalités observées dans un deuxième temps**. Cette stratégie prospective devrait permettre de disposer de données et de matériel associé avant, pendant et après un ou des éventuels épisodes de mortalité, par nature ici encore imprévisibles.

4.1.1. Protocole

La mise en place opérationnelle du projet est basée sur l'hypothèse que comme en 2014, l'année 2015 pourrait présenter des mortalités anormales de moules dans les Pertuis Charentais. Dans ce contexte, il a été retenu de déployer l'ensemble des moyens d'observation et d'échantillonnage sur la période allant de janvier à juillet 2015 (Tableau 4). Le calendrier des campagnes à la mer a été calé sur celui des sorties du REPHY, avec des sorties bimensuelles. Si des mortalités étaient constatées sur les sites en mer, alors un sur-échantillonnage à pas de temps serré était planifié pour encadrer l'événement au plus près (3 dates en gras dans le Tableau 4).

Tableau 4. dates des campagnes à la mer MORBLEU-2015 sur les sites Filière FI, Eperon EP, Loix LO, Boyard BO).

Les sorties supplémentaires en période de mortalité sont indiquées en gras (20/04, 22/04, 28/04)

Dates campagnes	Nombre de jours entre campagnes	Numéros de sorties	Sites de prélèvements
27-janv-2015		campagne1	FI-EP-BO
9-févr-2015	13	campagne2	FI-EP-BO
26-févr-2015	17	campagne3	FI-EP-BO + LO
9-mars-2015	11	campagne4	FI-EP-BO
16-mars-2015	7	campagne5	FI-EP-BO + LO
1-avr-2015	16	campagne6	FI-EP-BO + LO
13-avr-2015	12	campagne7	FI-EP-BO
20-avr-2015	7	campagne8	FI-EP
22-avr-2015	2	campagne9	FI-EP-BO
28-avr-2015	6	campagne10	FI-EP-BO
11-mai-2015	13	campagne11	FI-EP-BO
26-mai-2015	15	campagne12	FI-EP-BO + LO
11-juin-2015	16	campagne13	FI-EP-BO
22-juin-2015	11	campagne14	FI-EP-BO
7-juil-2015	15	campagne15	FI-EP-BO
21-juil-2015	14	campagne16	FI-EP-BO + LO

Compte tenu de la spatialisation des niveaux de mortalités contrastées dans les pertuis en 2014, élément majeur dans le choix des sites suivis au cours du projet MORBLEU-2015, **l'essentiel de la stratégie d'analyse de l'ensemble des jeux de données (paramètres**

biotiques et abiotiques) sera basée sur la comparaison relative des conditions pour les différents sites entre eux en fonction du temps.

L'ensemble des paramètres et facteurs suivis ou échantillonnés sont résumés dans le Tableau 5. A cette liste il faut rajouter les paramètres de survie, croissance et index de qualité des moules qui sont collectés par le MYTILOBS.

4.1.2. Choix des sites

Sur la base des niveaux de mortalité observés en 2014 dans les pertuis (Figure 6A), il a été choisi de suivre **quatre sites contrastés** (Figure 6B) : 3 dans le Pertuis Breton, i) la station **Filière W** (bouée cardinale Filière W), au nord du secteur, site sous influence océanique où on pratique l'élevage en pleine mer de moules et huîtres sur filières suspendues (quasi 100% de mortalité des moules en 2014), ii) la station de **L'Eperon terre**, site côtier estuarien (bouée mytilicole de la limite sud des bouchots) à l'entrée de la baie de l'Aiguillon (élevage de moules sur bouchots, ~80% de mortalité en 2014), iii) le site de **Loix en Ré** (pointe du Grouin, site découvrant où les premières mortalités ont été décrites en 2014 sur des moules sauvages, secteur d'élevage d'huîtres creuses sur table), enfin le site de **Boyard** au sud (bouée de la Perrotine), situé dans le pertuis d'Antioche (secteur de bouchots considéré comme site « témoin » à faible mortalité en 2014, ~10%).

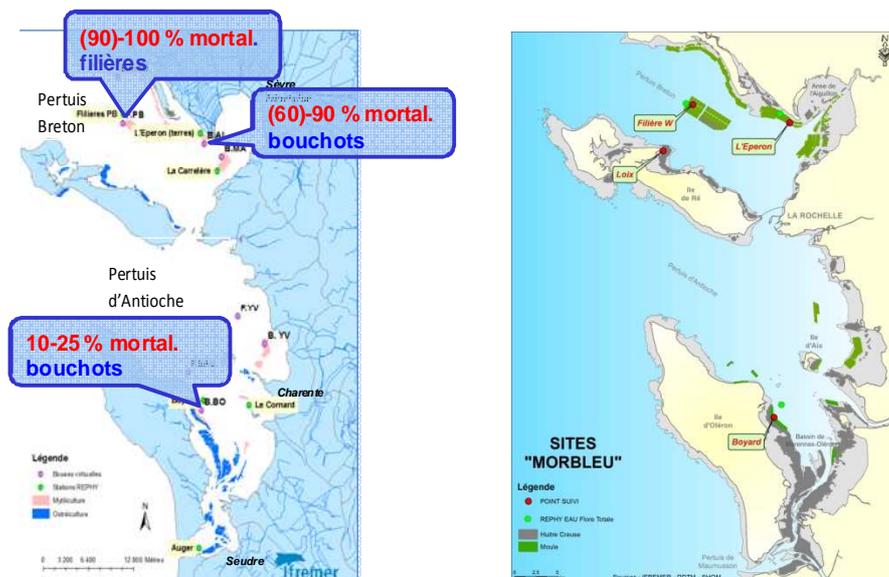


Figure 6 : A. carte des mortalités cumulées dans les pertuis à la fin de l'été 2014 (Béchemin et al 2015). B. Carte présentant les sites où ont été menés les suivis de l'action MORBLEU en 2015. Spots rouge, Filière W -1.375467E, 46.273729N, Loix -1.41304E, 46.226297N, Eperon -1.24376E, 46.263479N, Boyard -1.200971E, 45.978756N).

Les sites **Filière W**, **Eperon terre** et **Boyard** correspondent également à des stations suivies par réseau REPHY pour la caractérisation de la flore totale phytoplanctonique. Le réseau MYTILOBS dispose également de moules sentinelles sur ces mêmes sites. Le site de **Loix en Ré** correspond quant à lui à un site à terre suivi par le réseau RESCO. Seuls les sites **Filière W**, **Eperon terre** et **Boyard** ont fait l'objet d'un suivi complet des paramètres (animaux et colonne d'eau) aux cours des campagnes MORBLEU.

Tableau 5. Liste des paramètres et facteurs suivis ou échantillonnés au cours des 16 campagnes Morbleu-2015.

	Paramètres	Unité	Fréquence	Sites	Conservation Bancarisation	Nombre éch.	
Mesures physiques sur la colonne d'eau							
	Salinité		HF et bimens.	FI-EP-BO-LO	Base Access	série	
	Température	°C	HF et bimens.	FI-EP-BO-LO	Base Access	série	
	Turbidité	FTU	HF et bimens.	FI-EP-BO	Base Access	série	
	Oxygène dissous	mg/l	HF et bimens.	FI-EP-BO	Base Access	série	
Chimie sur la colonne d'eau							
	Nutriments	Silicates	µmol/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré et +4°C	40
		Nitrites+Nitrates	µmol/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré et -20°C	40
		Phosphates	µmol/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré et -20°C	40
		Ammonium	µmol/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré et -20°C	40
		Carbone organique dissous	mg/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré+acide et -20°C	37
	Métaux	Cr, Mn, Fe, Co, ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sb, Ba, Hg, Pb	µg/l	bimens.	FI-EP-BO	filtré+acide et -20°C	37
	Contaminants hydrophiles sur membranes POCIS	Herbicides, pesticides et phytosanitaires (50 molécules)	µg/l	bimens.	FI-EP-BO	-20°C	30
	Contaminants lipophiles sur membranes SPMD	PCB (7), HAP (16), OCP (15, DDTs, HCHs, HCB, Chlordanes)	µg/l	bimens.	FI-EP-BO	-20°C	24
Chimie sur matrice chair							
	Métaux	As, Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, V	mg/kg	T0 et final	FI-EP-LO	-20°C	4
	Contaminants	Pesticides organochlorés, organophosphorés, PCB (62 mol.)	µg/Kg PS	T0 et avril	FI-EP-BO-LO	-20°C	8
Biologie sur colonne d'eau							
	Communautés bactériennes	Bactéries filtrées NC cultivables		bimens.	FI-EP-BO	EPAS et -80°C	44
	Communautés procaryotes et eucaryotes	Cellules filtrées PC pour seq. ADN. Diversité planctonique métagénomique		bimens.	FI-EP-BO	-80°C	44
	microscopie	Taxonomie du microphytoplancton	cellule/ml	bimens.	FI-EP-BO	lugol +4°C	46
	Cytométrie en flux	Pico et Nano-plancton	cellule/ml	bimens.	FI-EP-BO	-80°C	46
Biologie sur les moules							
		Qualité cytogénétique		T0 et final	FI-EP-LO	-20°C	4
		Flore <i>vibrionaceae</i> et/ou organismes pathogènes (seq. ADN)		événementiel.	FI-EP-BO-LO	-20°C	> 150
	Génétique	ADN. pour SNP et RAD seq. Diversité		événementiel.	FI-EP-LO	alcool 96 ou -80°C	> 150
	Transcriptomique	RNA seq. librairies		événementiel.	FI-LO	-80°C	> 20

4.1.3. Ensemble des échantillons collectés au cours des campagnes

Le programme de suivi et d'échantillonnage désigné initialement pour les facteurs biotiques et abiotiques s'est déroulé selon le protocole prévu. Cependant, dans le cours du projet des conditions météo fortes ont entraîné la perte de matériel et d'échantillons : au site d'Eperon, perte de 2 paniers sur 3 fin avril et perte de 3 membranes de POCIS ; au site de Boyard, perte de 2 paniers sur 3 après mi-mai et perte d'une membrane de POCIS.

Des mortalités de moules observées dès avril 2015 dans nos suivis du Pertuis Breton ont déclenché un sur-échantillonnage à pas de temps serré pour les dates 20, 22 et 28 avril. L'ensemble des paramètres a été prélevé à ces dates hormis les membranes des échantillonneurs passifs (POCIS & SPMD).

Des précisions sur la qualité et le nombre d'échantillon collectés pour chaque paramètre suivi ou prélevé sont indiqués dans le Tableau 5 au regard de sa nature (abiotique, biotique).

Les facteurs abiotiques sur la colonne d'eau représentent **12 paramètres** enregistrés ou prélevés. Les prélèvements réalisés représentent **288 échantillons**. Les séries de mesures physico-chimiques haute fréquence (température, salinité, turbidité, oxygène dissous) seront traitées dans le paragraphe 4.3. **Les facteurs abiotiques sur la matrice chair de moule** concernent **4 paramètres** et représentent **12 échantillons**.

Les facteurs biotiques sur la colonne d'eau correspondent à **6 paramètres** étudiés et **180 échantillons** prélevés. **Les facteurs biotiques sur la moule**, hôte de son milieu et hôte d'organismes pathogènes éventuels, correspondent à **6 paramètres** étudiés et **plus de 325 échantillons** prélevés.

L'ensemble de ces prélèvements « MORBLEU » représente 805 échantillons à préparer et à analyser. Il faut y rajouter les prélèvements de moules réalisés sur les animaux issus du MYTILOBS et destinés aux études biomoléculaires (SNP, RAD seq., RNA seq., NGS, barcoding).

4.2. Mortalités mesurées sur nos différents sites

Le suivi de la mortalité est un critère déterminant dans le cours du projet MORBLEU puisqu'au delà du phénomène exceptionnel ou saisonnier, le point de départ et l'ampleur des mortalités conditionnent la stratégie d'échantillonnage et la réalisation de prélèvements et d'analyses spécifiques. Les suivis mis en place dès janvier 2015 sur les quatre sites, Filière W, Eperon terre, Loix en Ré et Boyard doivent pouvoir précéder et encadrer la survenue d'épisodes de mortalité, dans nos lots, dans ceux du réseau MYTILOBS, à défaut sur d'autres lots. Le calendrier de visite sur site de MORBLEU est basé sur un passage tous les 15 jours (à pleine mer). Le calendrier du MYTILOBS a un rythme mensuel, à basse mer, en décalage avec MORBLEU. Complété avec les passages sur Loix tous les 15 jours à basse mer pour le suivi RESCO, cet ensemble de moyens d'observation de la santé des lots, éventuellement enrichi des informations partagées par le REPAMO et les DDTM17 et 85, a permis d'avoir une surveillance très renforcée pour l'année qui suit le phénomène de crise observé dans les pertuis en 2014. De fait **un premier pic de mortalité est observé à Loix, en mars, comme en 2014.**

Pour les lots MORBLEU-2015, les premières mortalités notables sont apparues sur le site de Loix le 18 mars 2015 (**~12% de mortalité cumulée**), site où le lot était stabulé depuis octobre 2014. Lors des passages précédents, 10 jours et 1 mois avant, aucune mortalité remarquable n'avait été observée. Cet évènement a permis de collecter des moules moribondes et a donné lieu à des prélèvements pour différents tests en pathologie : isolement bactérien, pathologie expérimentale, histologie. Sur ce lot (identique à MYTILOBS) et sur ce site le relevé final fait

apparaître le plus fort niveau de mortalité cumulée en juillet (**60%**). Ces analyses ont révélé **l'absence d'organismes pathogènes à déclaration obligatoire** (Annexe 2) et **la présence de bactéries du groupe *Splendidus*** qui se sont avérées virulentes en infection expérimentales (Cf. Rapport LNR, Garcia et al 2015)

A partir du 20 avril 2015, les données de mortalités répétées dans différents secteurs ont donné le signal pour déclencher le sur-échantillonnage à pas de temps serré prévu dans le protocole. Des prélèvements de 15 moules vivantes ont donc été réalisés les **20, 22 et 27 avril**, sur les trois sites en mer (FI-EP-BO), ceci en plus de tous les autres paramètres. L'ensemble des données de mortalités relevées entre janvier et juillet 2015 est présenté pour les 3 sites communs à MYTILOBS et MORBLEU et pour le site de Loix (Tableau 6). Ces données représentent une mesure de mortalité cumulée sur la base de comptage de moules en paniers et ne sont pas le reflet de la situation des installations professionnelles (filières ou bouchots).

Pour les sites MORBLEU Eperon et Boyard, la perte de paniers apporte un biais sur l'estimation de la mortalité. Il est intéressant de noter que pour le site de **Filière** fin juillet, bien que l'origine des lots soit différente entre MYTILOBS et MORBLEU, la mortalité cumulée observée est très proche et non significativement différente, environ **37%**. A la lumière des séries historiques des réseaux REMOULA et MYTILOBS, il apparaît que ce niveau de mortalité à cette période, possède un caractère exceptionnel bien qu'il soit bien inférieur à celui de l'année 2014 (90-100%).

Tableau 6. Niveau de mortalité cumulée pour les lots MYTILOBS et MORBLEU entre janvier et juillet 2015 et prélèvements associés

		déc-14	janv-15	févr-15	mars-15	avr-15	mai-15	juin-15	juil-15	
Pertuis d'Antioche	Boyard	MYTILOBS	2%	2%	2%	3%	6%	16%	16%	25%
		Morbleu	SO	SO	NS	NS	<5%	<5%	paniers perdus	
		Ech. Biomol+patho ?	30 ind	30 ind	30 ind	30 ind	+3 dates ech.	30 ind	30 ind	30 ind
Pertuis Breton	Aiguillon-Eperon	MYTILOBS	2%	2%	4%	4%	4%	11%	11%	18%
		Morbleu	SO	SO	NS	NS	>5%	paniers perdus		
		Ech. Biomol+patho ?	30 ind	30 ind	30 ind	30 ind	+3 dates ech.	30 ind	30 ind	30 ind
	Loix en Ré	Morbleu	NS	1%	1%	12%	34%	55%	55%	60%
		Ech. Biomol+patho ?	0	20 ind	0	20 ind	15 ind	pas d'échantillons		30 ind
	Filière	MYTILOBS	0%	1%	1%	3%	12%	29%	29%	39%
		Morbleu	SO	SO	NS	NS	<5%	27%	27%	34%
Ech. Biomol+patho ?		30 ind	30 ind	30 ind	30 ind	+3 dates ech. + LNR	30 ind	30 ind	30 ind	

SO : Sans Objet NS : Non Significatif

En résumé, nous avons mis en place un lot sentinelle dès fin 2014 qui a subi en 2015 des mortalités significatives (plus tardives et moins importantes qu'en 2014). Le choix de sites contrastés en terme de mortalité est confirmé en 2015 : l'Eperon et Boyard présentent des niveaux de mortalité plus bas que les sites Filière et Loix. Ce suivi a permis d'alimenter d'une part les actions de recherche en fournissant des **animaux vivants ou moribonds avant, pendant et après les pics de mortalité** (voir paragraphes 5, 6 et 7), mais il a permis aussi de fournir du matériel biologique pour les analyses de pathologie menées par le LNR. Ainsi, trois lots (MYTILOBS) prélevés dans les Pertuis Charentais ont fait l'objet d'analyses par le LNR, lots Filière du 20/04/15 et du 16/12/15 et le lot des Roulières du 18/05/15. Au cours de ces événements, des bactéries majoritaires appartenant à l'espèce *V. splendidus* et virulentes en infection expérimentales ont été détectées (voir rapport LNR).

4.3. Conditions environnementales

Cette partie a pour objectif de (1) **contextualiser la période d'étude** dans l'historique récent (depuis 2009), et (2) caractériser l'"**ambiance hydrologique**" (à partir de descripteurs physico-chimiques classiques de l'eau) **des 3 stations suivies**, à la lumière des mortalités de moules observées dans ce contexte. Le matériel et méthode correspondant aux résultats présentés ici est présenté en Annexe 6, p113.

4.3.1. Contextualisation de la période d'étude

Le contexte hydroclimatique de la période d'étude s'appuie sur les données de température de l'eau et de salinité mesurées à haute fréquence d'acquisition. A ces fréquences, les fluctuations environnementales des différents niveaux de variabilité du milieu sont prises en compte (du cycle semi-diurne des marées au cycle climatique annuel des saisons). La station Filière (Figure 6) qui bénéficie d'un suivi hydrologique de ce type depuis 2009 a permis de situer la période d'étude et plus particulièrement les épisodes de mortalités de moules dans la dynamique hydroclimatique des 7 dernières années (Figure 7a-b).

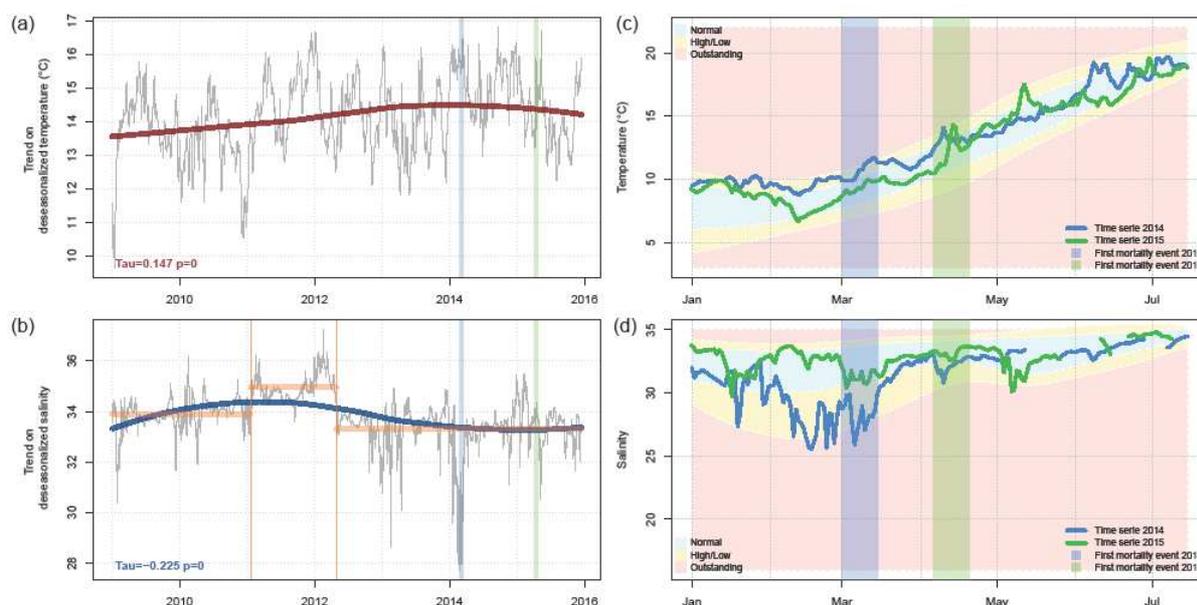


Figure 7 : Chroniques des températures et des salinités à la station Filière de 2009 à 2016.

La tendance de chaque série est représentée respectivement en trait brun pour les températures (a) et en trait bleu pour les salinités (b). Sur ces graphiques figurent également, les données sources (séries temporelles issues de mesures in situ à haute fréquence d'acquisition) désaisonnalisées (courbes grisées) et les périodes estimées de début de mortalités sur la zone des Filières du Pertuis Breton en 2014 et en 2015, symbolisées respectivement par les lignes verticales bleues et vertes (claires). Les traits orangés du graphique (b) illustrent les ruptures associées à la série temporelle de salinité : les verticaux pour les dates de ruptures, et les horizontaux pour les moyennes observées entre deux points de rupture.

Les températures et les salinités journalières (agrégées à partir des mesures in situ à haute fréquence d'acquisition) des 1ers semestres de 2014 et de 2015 sont présentées par les lignes bleues et vertes respectivement sur les graphiques (c) et (d). Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" au regard de l'historique de 2009 à 2015. Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, où les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles. Enfin, les polygones verticaux bleus et verts (transparents) symbolisent les périodes estimées de début d'épisode de mortalités sur la zone des Filières du Pertuis Breton en 2014 et 2015.

Les tendances rencontrées entre 2009 et 2016 montrent (1) des **augmentations significatives de température** (Tau=0.147 $p<0.01$) et (2) **des baisses significatives de salinité** (Tau=-0.225 $p<0.01$) à l'échelle globale de la période (Figure 7a-b). Ces conditions reflètent la dynamique climatique globale actuelle et s'inscrivent bien dans les projections de Dore (2005) prévoyant la concomitance d'une augmentation des températures et d'un régime pluviométrique plus fort. Compte tenu de ces tendances, les **mortalités de moules rencontrées en 2014 et 2015 surviennent dans un environnement hydroclimatique particulier.**

Bien que la tendance globale de la série temporelle de salinité baisse entre 2009 et 2016, on distingue 3 périodes distinctes (Figure 7b): la première s'étale de 2009 à 2011 avec des salinités évoluant globalement autour de 33.9, la seconde située globalement entre 2011 et début 2012 présente des salinités fluctuant autour de 34.9 et enfin la troisième survenant depuis 2011 est marquée par des fluctuations autour de 33.3. Ces évolutions de la salinité montrent que les épisodes de mortalités surviennent dans un **contexte où les salinités sont particulièrement basses**, soulignant un accroissement des apports en eaux douces sur cette partie du littoral charentais, notamment depuis le printemps 2012 (Figure 7b, d)).

Au niveau saisonnier, les températures observées en début d'année 2014 et 2015 (janvier et début février) sont très voisines : les températures apparaissent plutôt chaudes au regard des 7 dernières années (situées dans la zone jaune / Figure 7c). Entre mi-février et avril, des différences entre les deux années apparaissent, 2014 conservant des températures plutôt chaudes contrairement à celles de 2015 qui s'inscrivent dans la gamme de valeur normale (flirtant même avec la gamme plutôt basse) (Figure 7c). Au delà d'avril, les températures de 2014 et 2015 fluctuent dans la gamme de valeurs "normales", avec néanmoins quelques pics ponctuellement plus chaud sans toutefois présenter un caractère exceptionnel (Figure 7c).

Bien qu'il existe une **différence** significative (Test de Mann-Whitney avec $p<2.2e-16$) **entre les températures des deux périodes de début de mortalités** de 2014 et 2015 (Figure 8), ces épisodes apparaissent globalement dans une gamme de température allant de 9.9°C (centile 25 de la série de 2014) à 12.6°C (centile 75 de la série de 2015). Cette plage de température pourrait définir une gamme de valeurs favorables à l'émergence de certains organismes liés aux épisodes de mortalités.

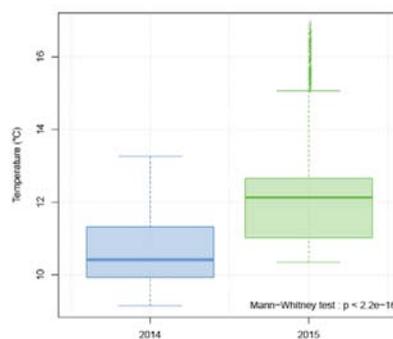


Figure 8 : Distributions (représentées par des boxplots) des températures de chaque période estimée de début d'épisode de mortalités sur la zone des Filières du Pertuis Breton pour 2014 et 2015. La comparaison par un test de Mann-Whitney montre l'existence d'une différence significative ($p < 2.2e-16$).

Au niveau des salinités (reflétant les apports en eaux douce), un fort contraste existe entre 2014 et 2015 au cours du 1er trimestre : **2014 est caractérisé par des salinités faibles voire exceptionnellement faibles** avec des périodes de grande instabilité, notamment en février et mars (période d'apparition des 1er mortalités dans le Pertuis Breton), contrairement à **2015** où les **salinités s'inscrivent dans la gamme de valeurs normales** voire plutôt élevées pour la saison (Figure 7d). A partir du mois d'avril, ces différences entre années disparaissent, les salinités fluctuant alors dans les gammes de valeurs normales à plutôt faibles.

4.3.2. Caractérisation hydrologique des 3 stations de l'étude

Les suivis hydrologiques réalisés sur les 3 stations prises en compte dans cette étude permettent une caractérisation hydrologique à la fois spatiale et temporelle de l'étude. Les chroniques de température, de salinité, de pourcentage de saturation en oxygène et de turbidité sont présentées pour les 3 stations sur les graphiques (a), (c), (e) et (g) de la figure 4.

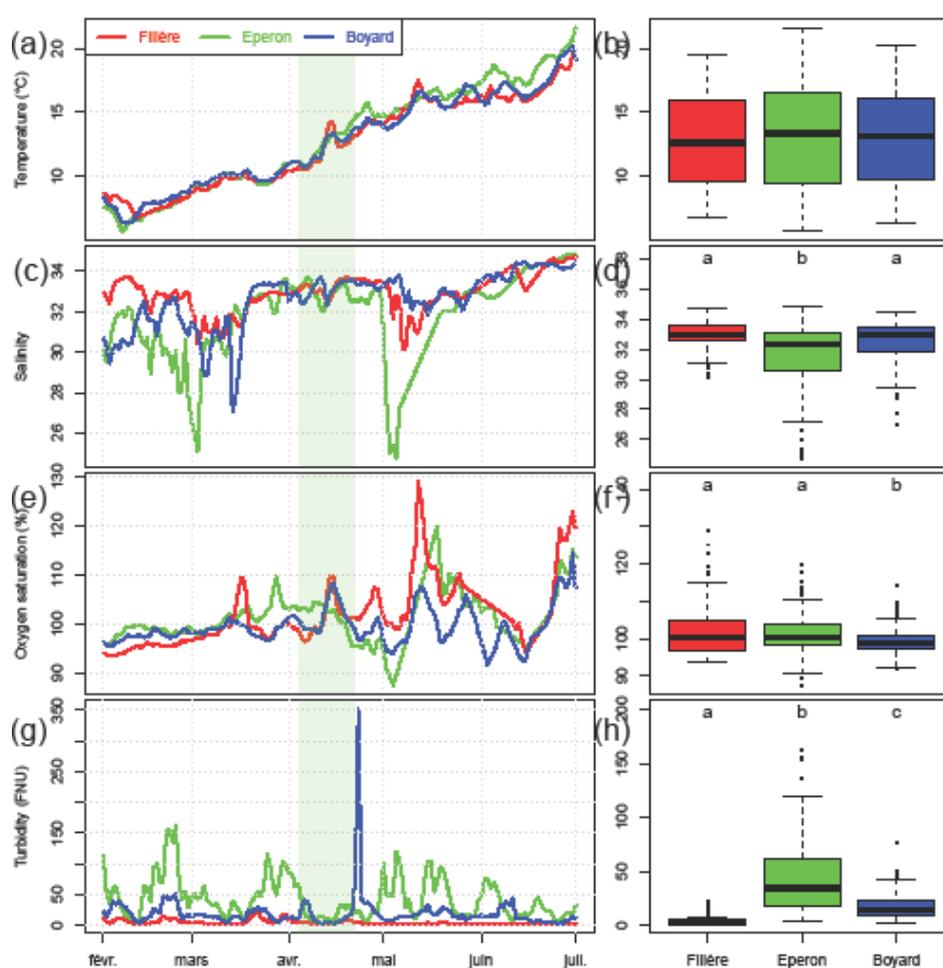


Figure 9 : Chroniques saisonnières des descripteurs hydrologiques (en moyenne journalière) température (a), salinité (c), pourcentage de saturation en oxygène (e) et turbidité (g)

1er semestre 2015 aux stations Filière (courbe rouge), Eperon (courbe verte) et Boyard (courbe bleue). Les distributions des valeurs de chaque série chronologique sont représentées en (b) pour la température, en (d) pour la salinité, en (f) pour le pourcentage de saturation en oxygène et en (h) pour la turbidité. Lorsqu'il existe une différence significative (test de Kruskal-Wallis avec $p < 0.01$) entre les séries de chaque station, les résultats d'une comparaison multiple, alors effectuée, sont renseignés au dessus de chaque boxplot par des lettres (permettant d'identifier les similitudes ou les différences entre les séries).

Les **3 stations** présentent une **dynamique thermique et des températures très voisines**, notamment au niveau global (aucune différence significative entre les stations (Figure 9b)) : seule la station Eperon présente des températures plus fortes à partir de la deuxième quinzaine d'avril (Figure 9a). Cette particularité de la station Eperon résulte en partie de son caractère plus estuarien comme le souligne les graphiques associés au paramètre salinité. En effet, la station Eperon est caractérisée par des dessalures plus prononcées pouvant descendre en dessous de 26‰ (en moyenne journalière), comme en mars et en mai (Figure 9c) ; L'"ambiance" saline y est globalement plus faible que sur les 2 autres stations : Filière et Boyard appartenant au même groupe "a" contrairement à l'Eperon "b" (Figure 9d).

L'ensemble des pourcentages de **saturation en oxygène** montre des différences significatives entre station : aux stations du Pertuis Breton (Filière et Eperon), les pourcentages de saturation en oxygène y sont globalement plus élevés et dépassent régulièrement (plus de 50% du temps) le seuil des 100% de saturation (Figure 9f/groupe "a") contrairement à Boyard (Figure 9f/groupe "b"). On note également à la station Filière des pics de saturation en oxygène typique, comme en mars ou en avril, et dans tous les cas plus intenses, notamment en mai et en juin.

Sans commune mesure, les 3 stations présentent des **turbidités très nettement différentes** : l'Eperon faisant figure de station très turbide en opposition à Filière (très faible turbidité marquant un caractère maritime), Boyard se situant en position intermédiaire (respectivement groupe "b", "a" et "c" / Figure 9h). On note, pour les sites les plus turbides, une variabilité temporelle marquée et plus importante pour les turbidités élevées (cas d'Eperon) (Figure 9g).

Bien qu'**aucune différence significative ne soit observée entre les 3 stations sur l'ensemble des descripteurs étudiés** en période d'apparition des 1ères mortalités en 2015 (données non présentées), il existe bien, à l'échelle du semestre, des contrastes entre les stations suivies (Tableau 7) :

- avec la salinité et la turbidité, un gradient côte-large s'exprimant entre Eperon et Filière, Boyard ayant une expression intermédiaire ;
- avec le pourcentage de saturation en oxygène, un gradient nord-sud entre le Pertuis Breton (stations Eperon et Filière) (valeurs plus élevées) et la station Boyard (pertuis d'Antioche voire bassin de Marennes-Oléron) (valeurs plus faibles).

Tableau 7. Différenciation des stations sur la base des descripteurs hydrologiques salinité, pourcentage de saturation en oxygène et turbidité (comparaisons multiples des distributions après test de Kruskal-Wallis avec $p < 0.01$)

	-	+/-	+
Salinité	Eperon		Filière/Boyard
O2 saturation	Boyard		Filière/Eperon
Turbidité	Filière	Boyard	Eperon

En conclusions, le contexte hydroclimatique saisonnier rencontré lors des périodes estimées de début d'épisode de mortalités de moules révèle un **fort contraste entre l'épisode de 2014 et de 2015** : des températures significativement différentes, bien que restant dans une gamme de valeurs globalement situées entre 10 et 13°C, et des salinités très nettement opposées, instables et basses en 2014, et "normales" et stables en 2015. Néanmoins, ces épisodes s'inscrivent dans une **même période climatique, marquée par des températures plus élevées et des salinités plus faibles qu'il y a quelques années.**

4.4. Connectivités hydrodynamique

La modélisation de la connectivité hydrodynamique et son analyse sont des outils **d'estimation de la probabilité de transfert** de substances (eau douces ...) ou contaminants (chimiques, biologiques) entre les sites ou zones que l'on étudie. Elle consiste à reproduire les mouvements des masses d'eau par le calcul à l'aide d'un modèle hydrodynamique, et d'analyser ces mouvements. Pour ce faire, on suit la dispersion de traceurs virtuels inertes représentant ces contaminants (ou autres..) sous l'influence des courants de marée, des vents ou des fleuves en conditions réelles. Plus précisément, dans cette étude nous cherchons à évaluer : « Quels sont les risques de transmission par la voie hydrodynamique entre les sites où se trouvent des moules **entre les Pertuis Charentais et les sites Vendéens** ; ce qui peut se traduire par : quelle est la connectivité hydrodynamique entre les zones ? »

4.4.1. Simulation de la connectivité hydrodynamique en 2014 :

Le modèle utilisé est le modèle hydrodynamique de l'Ifremer MARS3D-PC, qui a été développé en raffinement régional du modèle Manche Gascogne (MANGA) fourni par le service PREVIMER (Ifremer). Son emprise s'étend depuis la baie de Vilaine au Nord jusqu'à la côte espagnole au Sud avec une résolution de 500 mètres. Les forçages utilisés sont dits réalistes : la marée et la météorologie sont des données réelles, la marée est celle du modèle du SHOM (Fes 2004) et la météo celle de un modèle Arome de météo France.

La simulation a été faite de début mars à mai, après stabilisation numérique du modèle. Le traceur était émis sur le fond, à partir du 5 et du 9 mars du site de Loix et des Filières (dates des déclarations de mortalité) respectivement pendant 7 jours. Les coefficients de marée étaient de 96 et 35 respectivement. Pour chaque site, une seule maille (~500 m X 500 m.) émet du traceur, avec un flux identique pour les deux mailles émettrices. Le flux d'émission était fixé à 1000 unités par seconde.

Situation géographique des points

Les simulations de 2014 ont été reprises sur une emprise englobant la baie de Bourgneuf pour répondre à la question de connectivité Sud-Nord (Charente Maritime-Vendée).

L'analyse des résultats est faite sur un ensemble de points susceptibles de participer en tant que moteur, ou relais, dans les processus de dispersion du processus contaminant pour étudier sa dynamique. Ils ont été sélectionnés par la présence avérée de stocks de moules dans leur environnement, sauvages ou élevées, sur filières ou bouchots. Les points sans élevage sont :

- La Rochelle, utilisé en « bouée virtuelle » pour analyser les flux sortant du Pertuis Breton vers le Pertuis d'Antioche
- Les Sables d'Olonne et Sion, où existent des stocks sauvages suffisamment importants (surveillance sanitaire pour la pêche récréative assurée par l'ARS PDL (Agence Régionale de la Santé des Pays De Loire).

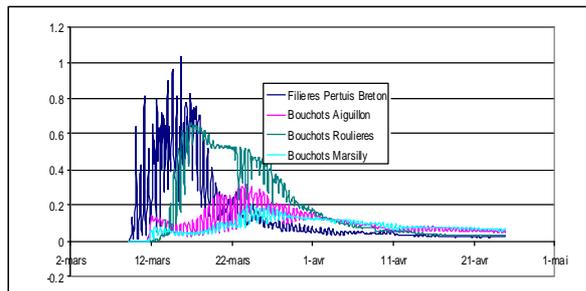


Figure 10 : Points analysés, du bassin de Marennes Oléron à la baie de Bourgneuf

La simulation ne concerne que la connectivité avec les filières du Pertuis Breton, présentant un stock de moules de plusieurs milliers de tonnes; elle est analysée par la cinétique de concentration du traceur 'Filières' lue sur les points sélectionnés (Figure 10).

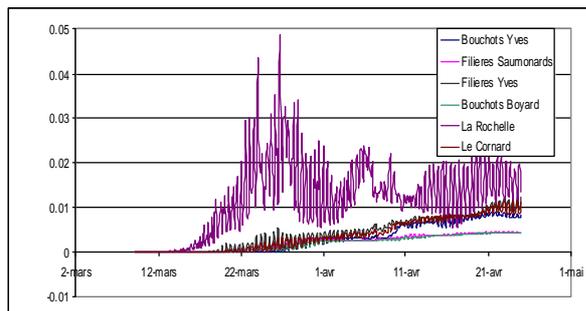
Concentration moyenne des traceurs dans la colonne d'eau

Les graphes suivants représentent les concentrations du traceur émis depuis le point Filière Pertuis Breton moyennées sur la colonne d'eau dans les différentes zones étudiées (Figure 11). On remarque :



Pertuis Breton :

- 1) Les bouchots du Sud Vendée (Roulières) présentent le même profil que ceux des filières, avec juste un décalage temporel
- 2) Les zones de l'Aiguillon et Marsilly présentent des concentrations similaires et plus faibles (presque la moitié) à celles des Roulières, quoique spatialement proches.



Pertuis d'Antioche:

- 1) Globalement, les concentrations sont divisées par 20 par rapport au Pertuis Breton, avec un décalage temporel de l'ordre d'une semaine
- 2) La dilution est logiquement corrélée à la distance au Pertuis Breton, plus on s'en éloigne, plus la concentration baisse
- 3) Les sites des bouchots d'Yves, du Cornard, et des filières des Saumonards évoluent de façon similaire en concentration, de même que les filières des Saumonards et des bouchots de Boyard, à un niveau moindre

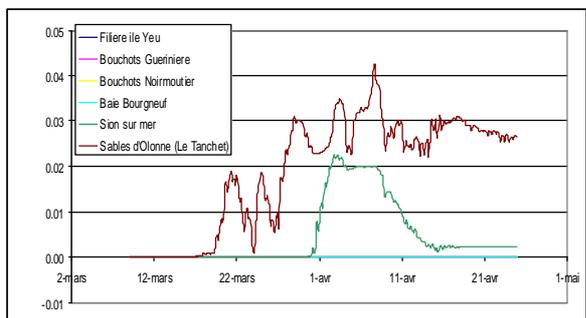


Figure 11: Evolution en concentration moyenne du traceur Filières sur les points des côtes Vendéennes.

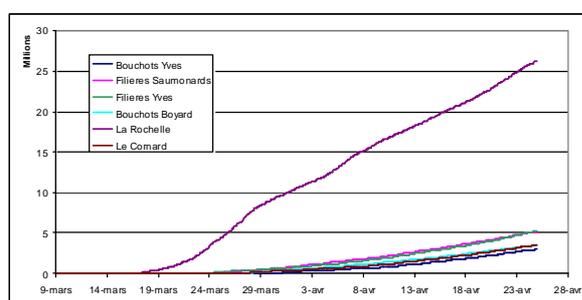
Côtes Vendéennes

- 1) Les concentrations sont du même ordre de grandeur que celles du Pertuis d'Antioche
- 2) La dilution est proportionnelle à l'éloignement du Pertuis Breton, comme dans le Pertuis d'Antioche, et le décalage temporel est identique
- 3) L'effet de la marée est très estompé, signe d'une meilleure homogénéisation du milieu

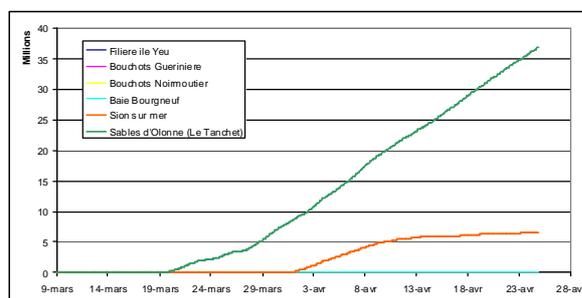
Flux cumulés des traceurs au cours du temps

Ils sont le résultat de la quantité cumulée de traceur passé dans la maille de calcul étudiée au cours du temps (Figure 12). Ils sont donc le résultat du produit cumulé de la concentration par le volume de la maille. Les surfaces de mailles sont toutes identiques, contrairement aux hauteurs d'eau ; cette variable n'est pas indépendante des types d'élevage (filières/bouchots), les hauteurs d'eau au niveau des filières étant bien plus importantes.

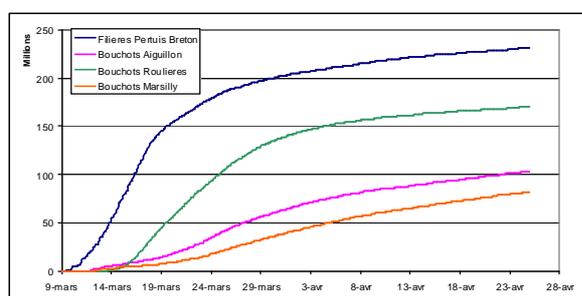
Le risque épidémiologique, ou de toxicité chronique, est une fonction du temps et de la charge ou concentration présente. Cette variable de flux cumulés, intégrant l'ensemble de celles impliquées dans la dynamique (concentration / hauteur d'eau / renouvellement / temps de résidence) paraît donc être un bon proxy d'estimation du niveau de risque. Plusieurs remarques sont à faire sur ces graphes :



- Les échelles en ordonnées (quantités) sont divisées par 10 dès la sortie du Pertuis Breton, ce qui dénote le **relatif confinement du Pertuis Breton**, avec des temps de résidence importants (de l'ordre de 80 jours, Stanisière, 2007) et des renouvellements faibles.



- Bien que les concentrations soient du même ordre dans le Pertuis d'Antioche et sur les côtes Vendéennes, les quantités cumulées atteignent des valeurs supérieures en Vendée, montrant par là des dynamiques de fonctionnement différentes (renouvellement, temps de résidence...).



- On note la similitude de cinétique entre La Rochelle et les sables d'Olonne, le cumul de traceur aux Sables d'Olonne atteignant même des niveaux légèrement supérieurs à celui du point de La Rochelle, ce qui indique un transport global préférentiel vers le Nord.

Figure 12 : Quantité cumulée de traceur estimée sur les différents points suivis : Pertuis Breton (Bas), Pertuis d'Antioche (centre), côtes Vendéennes (Haut).

Estimation des délais de transit

Le délai de transit est un facteur important à prendre en compte, les plus courts délais engendrant probablement de plus forts risques dans le cas de transferts contaminants ou toxiques (durée de vie des bactéries ou parasites, évolution chimique des traceurs...). L'analyse est faite en flux cumulés, de façon à intégrer les temps de résidence dans l'estimation.

Mis à part les Sables d'Olonne, les sites situés au Sud du Pertuis Breton sont atteints les plus rapidement. Cependant, les conditions de dynamique de circulation bouleversent ce classement si on examine les résultats en termes d'atteinte d'un seuil (arbitraire) de quantités cumulées, qui peut être assimilé à un indice de connectivité, corrélé à un risque de contamination.

Tableau 8 : délai d'apparition en heures, et temps nécessaire à atteindre une quantité cumulée de 10^6 unités. Les sites sont classés dans l'ordre d'apparition.

	Apparition (heures)	Quantité cumulée. $>10^6$ (nb jours)
Filières Pertuis Breton	0	0.2
Bouchots Roulières	2	0.9
Bouchots Aiguillon	6	1.5
Bouchots Marsilly	6	1.8
La Rochelle	14	2.3
Sables d'Olonne	18	2.7
Filières Saumonards	20	5.1
Filières Yves	20	3.1
Le Cornard	20	4.7
Bouchots Yves	24	5.1
Bouchots Boyard	34	6
Sion (Talmont St Hilaire)	54	9.6
Filière île Yeu	64	6
Bouchots Guerinière	108	16.1
Bouchots Noirmoutier	144	24.3
Baie Bourgneuf	156	24.8

4.4.2. Simulation de l'effet de transfert en cascade par « points relais »

Le relatif manque de connaissance sur la nature exacte du processus épidémique oblige à faire des estimations sur les différents paramètres à prendre en compte pour simuler au mieux un transfert de proche en proche d'un contaminant sur les sites de moules. Nous posons ici l'hypothèse que ce contaminant puisse être assimilé à une bactérie pathogène chez la moule. Un certain nombre d'éléments permettant ces estimations sont à disposition.

Eléments d'appréciation pour la paramétrisation 2015

Les paramètres à inclure dans le modèle sont, *a minima* : le point d'origine, les débits ou flux de traceur, et les éléments déclenchant l'émission.

1. **L'origine d'émission** du traceur se situe sur le point Filières, en localisation comme en date de début, pour la raison déjà évoquée de la conséquence du stock de moules et de la connaissance de la date de mortalités. La probabilité que ce site ait été le « foyer » de départ en 2014 est élevée, et confortée par la cohérence des phénomènes de mortalités de mars 2014 avec la dynamique de circulation (Béchemin *et al.*, 2014). Il a donc été

réutilisé en 2015 comme foyer source, même si les premières mortalités ont finalement été rapportées en Vendée. Il serait intéressant de réaliser le même type de simulations sur des sites Vendéens pour mieux y appréhender la dynamique de fonctionnement.

2. **Le flux d'émission** est fixé à 100 unités/hectare/s. Cela nous donne un flux de 2500 unités /s sur la maille émettrice (une maille fait 25 ha). Cela a été fait en cohérence avec le point suivant.
3. Le stock sur les filières, ramené au m² est de l'ordre de 1 kg/m² (Le Moine & al, 2001). En se basant sur un poids moyen de 10 g, ce qui correspond à 100 moules au m², soit a minima 25 10⁶ moules sur une maille de calcul sur ce point.
4. Le relargage de bactéries par une moule morte serait environ de 10⁵ bactéries en 24 h. (1 à 1,2 bactéries émises par moule et par seconde, données expérimentales, Travers, A. comm. pers.). En supposant que la mortalité se déroule sur 5 jours consécutifs de façon linéaire (soit ~20% de mortalité par jour, soit 5 *10⁶ moules), cela représente l'émission de 2000 à 2400 bactéries par seconde sur la maille de calcul dans les conditions retenues, à comparer avec le flux simulé de 2500 unités par secondes utilisé en 2015 (cf. § ci-dessus, simulation en cours). L'unité utilisée dans le modèle correspondrait donc à peu près à un nombre de bactéries. Le seuil à partir duquel la contamination débute, initialement fixé à une quantité de 10⁻⁶ unités est donc certainement sous-estimé. Il paraît cohérent de se fixer pour déclencher le décompte temporel correspondant à l'incubation à un seuil d'une ou quelques dizaines d'unités atteint pour les futures simulations.
5. Le temps d'incubation peut être estimé à 3 jours, d'après les données expérimentales obtenues en laboratoire (Travers, A. comm. pers.), cohérentes avec De Decker, 2011, (4 jours sur l'huître *C. gigas*). L'émission du traceur sera déclenchée après ce délai (les observations de mortalités entre Loix et Filières différaient de 4 jours en 2014).
6. Dans un premier temps, et faute d'éléments supplémentaires, ont été sélectionnés comme «points-relais» de transfert de contaminant les points qui présentaient la caractéristique suivante : atteinte du seuil de 10⁻⁶ de la quantité cumulée de traceur en moins de 3 jours. La durée de vie de la bactérie hors de son hôte donnerait des éléments plus robustes, mais elle est inconnue pour l'instant.

Paramétrisation retenue

Le site de La Rochelle, ne présentant pas de stock de moules connu d'importance a été éliminé de la liste obtenue avec ce dernier critère. Dans la seconde simulation, selon les critères exposés, **5 points relais sont retenus** (i.e. Filières Pertuis Breton, Roulières, Aiguillon, Marsilly et les Sables d'Olonne, Tableau 9). Le **seuil de 10⁻⁶ unités de traceur cumulé** atteint (Tableau 8) déclenche l'incubation **L'incubation est fixée à 3 jours** ; l'émission du traceur sur les sites atteints est déclenchée trois jours après l'atteinte du seuil précédemment fixé. **L'émission est paramétrée sur 5 jours** avec un flux de 100 unités par ha et par seconde. Ce paramètre est destiné à prendre en compte l'in vraisemblance d'une mortalité totale instantanée (donc de la concomitance parfaite de relargage de bactéries par les moules). Le relargage est donc effectué sur un rythme de 20% du potentiel par jour. Le point « foyer initial » choisi est celui des filières, qui émet du traceur à partir du 10/03/2014, correspondant à la date de constat effectif des mortalités.

Tableau 9. Paramétrisation retenue pour l'évaluation de la connectivité hors du Pertuis Breton (simulation 2 en cours)

	Apparition (heures) (res simu. 1)	Conc > 10 ⁻⁶ (jours) (res simu. 1)	date réception	date début
			res simu. 1	émission
Filières Pertuis Breton	0	0.2		10/03/2014 00 h
Bouchots Roulières	2	0.9	09/03/2014 21 h	12/03/2014 21 h
Bouchots Aiguillon	6	1.5	10/03/2014 12 h	13/03/2014 12 h
Bouchots Marsilly	6	1.8	10/03/2014 19 h	13/03/2014 19 h
Sables d'Olonne	18	2.7	11/03/2014 16 h	14/03/2014 16 h

Il a donc été décidé de poursuivre les travaux sur la connectivité, en reproduisant un schéma de type épidémique, les sites à plus forte connectivité émettant un traceur spécifique à leur tour, après une période « incubatoire » de trois jours. Ces travaux sont en cours, et seuls les résultats préliminaires présentés ci-dessous sous forme cartographique peuvent être fournis pour l'instant.

Les premiers résultats bruts (Figure 13) permettent un certain nombre d'observations en première estimation. La série d'images représente les panaches de traceurs jusqu'à 30 jours. Cela peut paraître inapproprié dans le cas de transport de bactéries (mortalité hors de la moule hôte), mais donne des informations sur la dynamique de transport au cours du temps. On observe globalement trois modes de fonctionnement dynamique différents :

- Les traceurs émis depuis les sites Filières et Roulières (Figure 13, lignes 1 et 2) ont tendance à rester confinés sur le Nord du Pertuis Breton, puis à longer les côtes Vendéennes vers le Nord
- Le comportement du traceur émis par le point Aiguillon ; très similaire à celui de Marsilly non représenté (Figure 13, ligne 3) a, lui, tendance à rester confiné dans la partie Est du Pertuis
- L'émission sur le point Sables d'Olonne a un comportement très différent, très vite dispersé et dilué par les courants de marée, avec un déplacement vers le Sud dans un premier temps, puis une remontée rapide vers le Nord, touchant Saint Hilaire et l'île d'Yeu ensuite.

Tous les traceurs remontent très rapidement vers le Nord et l'île de Noirmoutier en fin Mars, lors des gros coefficients de marée (100-109).

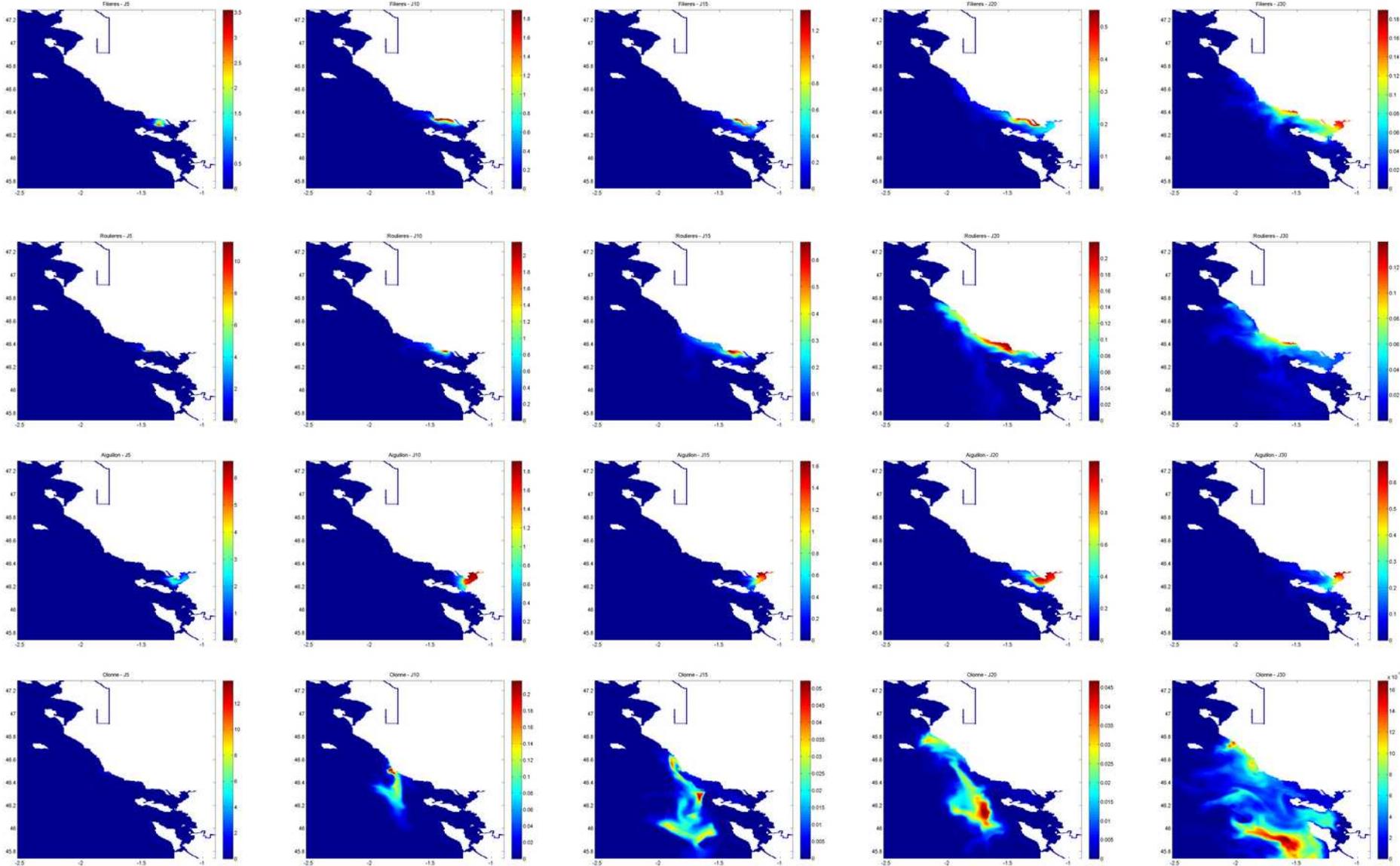


Figure 13 diffusion des traceurs émis ; cartographie à J5, J10, J15, J20, J30 de gauche à droite. De haut en bas : Filières, Roulières, Aiguillon, Olonne. NB: les échelles de couleurs sont propres à chaque imagerie.

4.4.3. Conclusions intermédiaires

Le modèle connectivité 2015 apporte des éléments nouveaux par rapport à ceux évoqués dans l'expertise « mortalité moules 2014 ». Celle-ci avait montré :

- 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 (Loix et Filières).
- Il existe une forte connectivité dynamique des sites Filières et sud Vendée et une relative indépendance des secteurs Aiguillon, Marsilly, La Rochelle avec la zone Filière et Sud Vendée. Celle-ci est cohérente d'un point de vue spatial et quantitatif avec les mortalités observées sur les différents secteurs mytilicoles du Pertuis Breton.

En 2015, les résultats obtenus, complètent ceux de 2014 et montrent :

- Il existe également une connectivité entre le Pertuis Breton et les côtes situées plus au nord, en Vendée. En effet, le modèle montre que le traceur émis sur le site des filières du Pertuis Breton atteint Les Sables d'Olonne en 18 heures, Talmont Saint Hilaire en 54 heures et l'île d'Yeu en 64.
- La connectivité est aussi forte entre le site Filières et Les Sables d'Olonne qu'entre les Filières et La Rochelle.
- Les points des Roulières et des Sables d'Olonne montrent des connections avérées avec les îles d'Yeu et de Noirmoutier.
- Sur la période considérée, les déplacements rapides vers le Nord semblent liés à des marées de Vives Eaux.

4.5. L'environnement abiotique

4.5.1. Contaminants chimiques: l'année 2015 a-t-elle été marquée par la présence de polluants ou nutriments particuliers qui auraient pu fragiliser les animaux ?

Contaminants chimiques - Les pertuis sont des zones relativement abritées et estuariennes, où se pratique une forte activité conchylicole mais aussi ils sont le réceptacle des bassins versants amonts sur lesquels une forte activité agricole s'exerce. Dans ce contexte, les contaminants chimiques comme les métaux traces et/ou les pesticides peuvent avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur la faune et la flore du milieu aquatique. En fonction des concentrations observées, les métaux traces peuvent s'avérer bénéfiques (oligo-éléments) ou délétères (contaminants) pour les organismes. Si l'on sait que certains métaux traces sont nécessaires dans certaines proportions pour assurer les fonctions physiologiques vitales du phytoplancton, on sait aussi qu'au-delà de certains seuils de concentration, des toxicités sont avérées. De même, d'autres familles de molécules d'origine anthropique peuvent avoir des effets toxiques sur les communautés phytoplanctoniques et sur les mollusques qui les consomment. Parmi ces molécules, les produits phytosanitaires (pesticides) sont fréquemment détectés dans le milieu marin côtier et de nombreux travaux ont pu montrer leurs effets délétères (Arzul *et al.*, 2006 ; Stachowski-Haberkorn *et al.* 2008, Gagnaire *et al.*, 2007, Barranger *et al.*, 2014, 2015, Akcha *et al.*, 2012).

Dans le cadre de l'action MORBLEU, nous avons choisi de prendre en compte les risques potentiels liés à ces contaminants chimiques et nous avons déployés sur les sites suivis des animaux sentinelles ainsi que des dispositifs d'échantillonnage passif de deux types pour pouvoir comparer les sites entre eux pour ces descripteurs.

Les nutriments - Les éléments nutritifs sont des descripteurs hydrologiques indispensables à l'étude d'un écosystème marin. En milieu aquatique, la chaîne alimentaire repose sur les producteurs primaires représentés dans les eaux de surface par le phytoplancton. L'hydrogène, l'oxygène, le carbone et sont disponibles en abondance dans le milieu marin mais l'azote et le phosphore sont en concentrations relativement faibles. La production primaire des eaux de surface est essentiellement autotrophe et s'effectue à partir des constituants minéraux présents en solution dans l'eau de mer (CO_2 , NO_3 , PO_4 , SiOH_4 , NH_4 ,...) en utilisant la lumière comme source d'énergie. Les nutriments et la lumière sont donc des paramètres essentiels de la production primaire. La disponibilité et les proportions en sels nutritifs et en carbone organique dissous (COD) conditionnent la productivité du milieu et en particulier la biomasse phytoplanctonique et le bactérioplancton disponible pour assurer une ressource trophique indispensable aux mollusques bivalves filtreurs. Par ailleurs des valeurs anormalement élevées dans ces paramètres peuvent révéler un état dégradé des eaux littorales (eutrophisation).

Le matériel et méthode correspondant aux résultats présentés ici est présenté en Annexe 6, p115.

1. Résultats intermédiaires sur les contaminants chimiques

A cette heure, trop de données sont encore manquantes pour réaliser une analyse comparée des contaminants chimiques dans l'environnement et les animaux. Cependant, de premiers résultats sur la détection et la concentration des métaux lourds dans les chairs de moules sont présentés dans le Tableau 10

Tableau 10. Données pour l'analyse des métaux lourds dans les chairs de moules entre trois sites

Dates prélèvements	Référence échantillon testé	Origine site	type lot orig.	Arsenic	Cadmium	Chrome	Cuivre	Mercur	Nickel	Plomb	Vanadium	Zinc
				mg/kg pv								
11/06/2015	11-MB-JFP MOULES M1 #15 FILERE	FILIERE W	M1	3.00	0.09	0.10	2.00	0.01	0.40	0.20	0.20	16.00
11/06/2015	11-MB-JFP MOULES M1 #16 EPERON	EPERON	M1	3.00	0.08	0.20	1.00	0.02	0.30	0.40	0.40	16.00
06/10/2014	11-MB-JFP MOULES M5 #20 TO Loix	LOIX T0 -SR MYTIL	M5	1.00	0.06	0.10	0.70	0.01	0.20	0.10	0.20	12.00
16/07/2015	11-MB-JFP MOULES M5 #21 T FINAL Loix	LOIX T. FINAL	M5	2.00	0.04	0.40	2.00	0.02	0.40	0.30	0.60	15.00
févr-15	Rocch-DCE*	Filière W			0.06			0.03		0.26		

Nous pouvons observer :

- Un effet temporel: Le lot de moules type MYTILOBS déployé à Loix entre octobre 2014 et juillet 2015, soit 10 mois, présente des valeurs plus fortes à la fin du suivi, sauf pour le Cadmium qui baisse très légèrement. Les valeurs détectées sont très en deçà des valeurs seuils établies par l'OSPAR (Ecotoxicological Assessment Criteria, EAC).

- Pas "d'effet site" remarquable: hormis pour les valeurs du Chrome et du Vanadium, qui sont plus fortes à Loix en juillet qu'à Filière W et Eperon en juin, pour les 7 autres métaux, les concentrations observées sont très proches entre les 3 sites. 6 valeurs (Hg et Cd) sont en deçà de la LQ (Limite de quantification des métaux par méthode ICP-MS, LQ = 0.05 mg/kg en poids frais).

- On peut noter que les valeurs observées à l'été dans MORBLEU-2015 pour Cd, Hg et Pb, sont très proches de celles relevées par le ROCCH/DCE sur des moules en février 2015 sur Filière W : 0.006, 0.03, 0.26 mg/kg pv respectivement (étude indépendante, * données du Bulletin de la Surveillance 2015).

2. Résultats intermédiaires sur les sels nutritifs et le carbone organique dissous

Pris seuls en soit, ces paramètres nous renseignent peu et nous les intégrerons à terme, quand nous disposerons des données d'analyses complémentaires, dans une analyse d'écologie globale recherchant à préciser les interactions et les drivers du milieu agissant sur les dynamiques des flores bactériennes et des flores planctoniques en fonction des variations spatiotemporelles des nutriments. Nous avons cependant choisi de présenter d'ores et déjà ces premiers résultats.

Les données obtenues pour le dosage des sels nutritifs (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{2-} , SiO_3^-) dans la colonne d'eau sont présentées dans les graphes de la Figure 14-- (A : Boyard, B : Eperon, C : Filière). Sur le site de l'Eperon, site côtier peu profond à l'entrée de la baie de l'Aiguillon, on observe globalement les valeurs les plus fortes pour les sels nutritifs avec des profils de tendance qui se suivent. Ce site est très marqué par les apports fluviaux (le Lay et la Sèvre niortaise) terrigènes ou anthropiques. Le site de Boyard présente des valeurs moins élevées que le site de l'Eperon avec un pic notable en Nitrite+Nitrate mi-mars. Cette station est principalement sous l'influence de la Charente et de la Garonne (cf. paragraphe 4.5.2, p64). Le site de Filière W qui subit le plus l'influence océanique présente globalement les valeurs les plus faibles en sels nutritifs, notamment pour les teneurs en Nitrite+Nitrate.

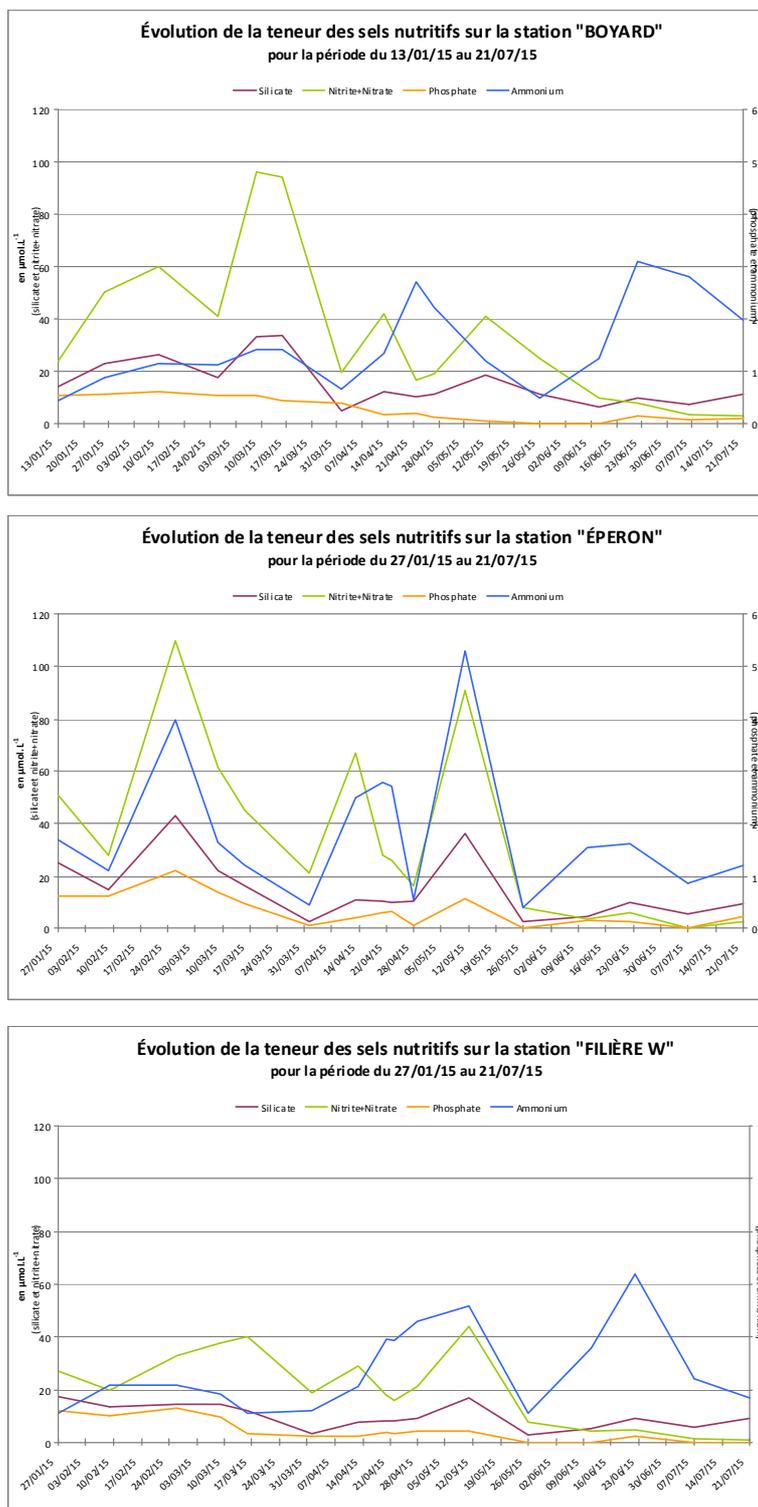


Figure 14 : Evolution de la teneur des sels nutritifs (Silicates, Nitrite+Nitrate, Phosphates, Ammonium) entre les sites Filière W (Bas), Eperon (Milieu) et Boyard (La Perrotine)(Haut).

Les concentrations en COD dans la colonne d'eau varient peu entre février et mi-mai 2015 pour les trois sites échantillonnés (entre 4.0 et 6.5 mg/L). Deux pics sont observés, un à Eperon le 26/05 (10.5 mg/L), un à Filière, le 22/06 (10.5 mg/L). En juillet les concentrations en COD s'abaissent sur les trois sites de manière similaire (~2.5 mg/L) (voir Figure 15). La comparaison des trois sites entre eux pour ce paramètre ne montre pas de différence significative au seuil de 5% (test de Kruskal Wallis).

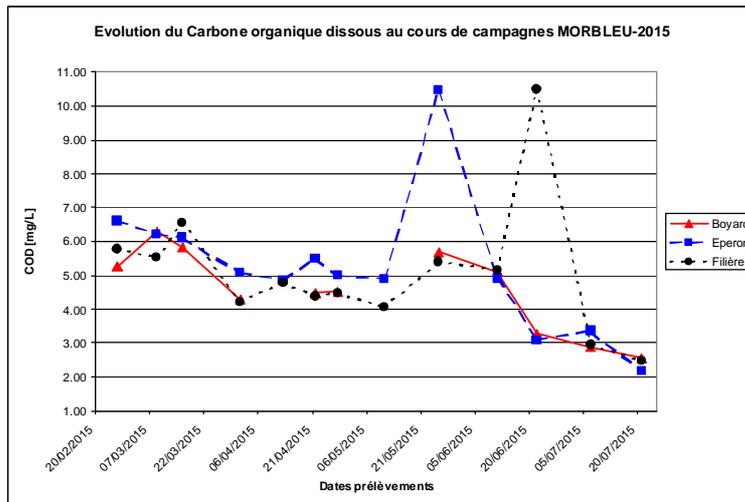


Figure 15 : Evolution du Carbone Organique Dissous au cours des campagnes MORBLEU-2015 entre les sites Filière W, Eperon et Boyard (La Perrotine).

3. Premiers résultats concernant les métaux dissous présents dans la colonne d'eau

Les données de mesures des métaux dissous sont exprimées en concentration : [$\mu\text{g/l}$]. Les mesures obtenues pour le cobalt et le mercure sont en deçà des seuils de quantification et elles n'ont pas été prises en compte dans l'analyse présentée.

Nous présentons tout d'abord une comparaison inter-sites des concentrations des métaux entre février et juillet 2015 (Figure 16A). Hormis le manganèse (Mn) qui présente une différence significative au seuil de 5% avec une concentration plus faible sur Boyard, il n'est pas montré de différence entre les 3 sites pour les 10 autres métaux analysés.

Comme il n'y a pas de différence entre les sites (sauf pour 1 métal parmi les 12), on peut regarder globalement les séries de concentration de chaque métal par dates (Figure 16B). Sur les 6 mois de campagne des regroupements par 2 mois sont opérés et 3 périodes sont considérées : 1, 2 et 3 : février-mars ; avril-mai et juin-juillet. La comparaison de l'évolution des concentrations des métaux au cours du temps montre qu'il existe un effet date qui est significatif pour 9 métaux sur 11. Donc, Pour ces 9 métaux dissous suivis entre février et juillet 2015 on peut observer une variabilité 'saisonnnière'.

Conclusion intermédiaire : un échantillonnage et des analyses de contaminants chimiques et de nutriments ont été réalisés. Nous avons pu observer une **variation saisonnière** et des valeurs considérées comme « normales » pour la plupart des paramètres étudiés, et **peu de différences entre les 3 sites suivis** (sites qui présentaient des contrastes en terme de mortalités en 2015). Une analyse intégrée de l'ensemble des données est maintenant nécessaire pour une analyse d'écologie globale.

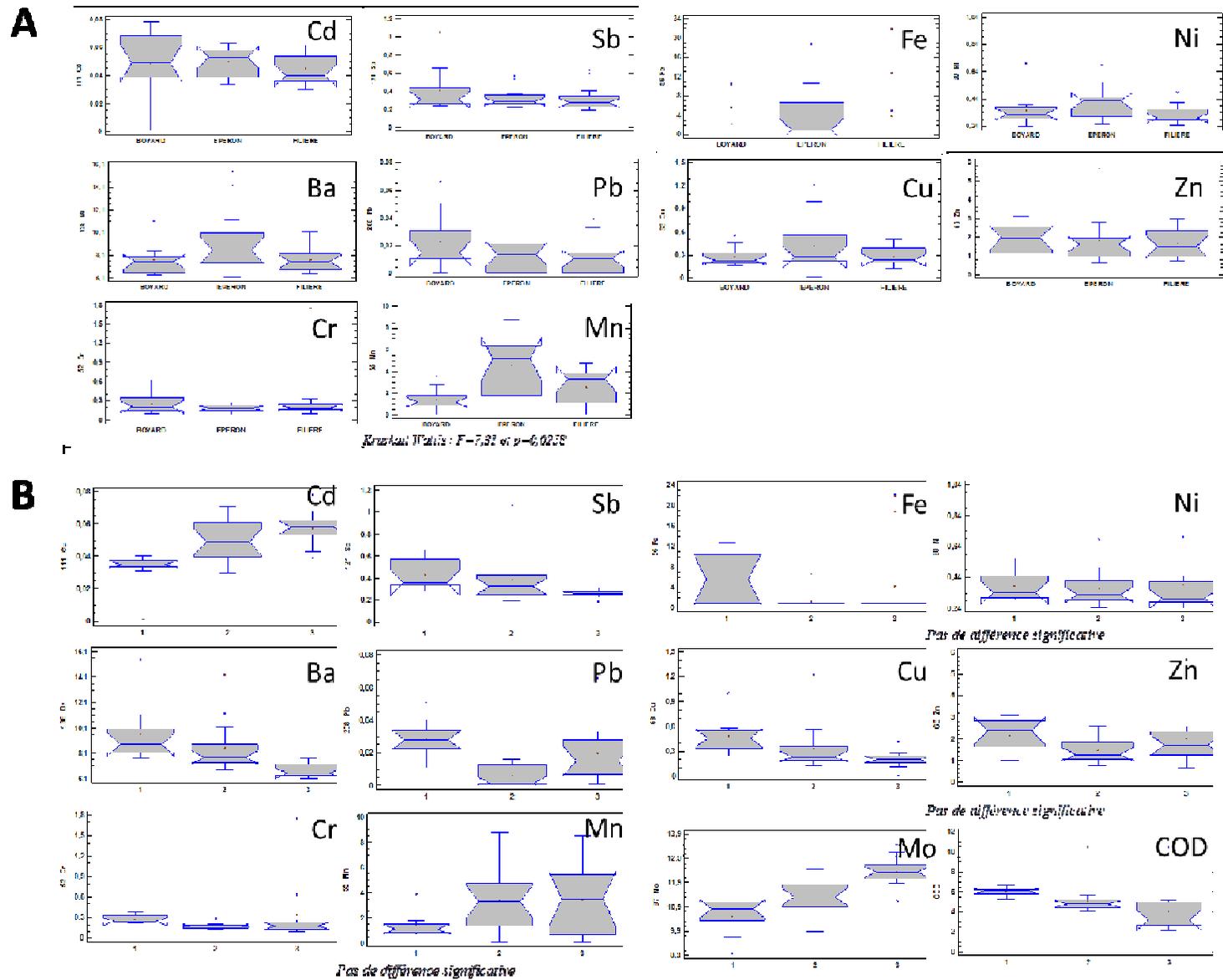


Figure 16 : Représentation en boîte à moustaches de la distribution des valeurs de concentration des métaux dissous de la colonne d'eau pour les 3 sites Filière W, Eperon et Boyard au cours de la campagne MORBLEU-2015 (février-juillet)

4.5.2. Apports d'eau douce : les apports par les différents fleuves pourraient-ils avoir contribué aux mortalités observées ?

Modélisation et paramétrisation

Les résultats du modèle Mars_3D 2015 reprennent et précisent ce qui avait été fait lors de l'expertise moules 2014, et l'étendent au premier semestre 2015. Le poids des fleuves dans les pertuis est évalué spatialement en moyennes saisonnières, puis par les différents flux (apports externes et internes), estimés à leurs frontières.

Paramétrisation des simulations :

- Les calculs sont démarrés un an avant l'enregistrement des résultats, pour atteindre une stabilisation numérique, et une dispersion suffisante des apports des fleuves lointains (Adour, Loire...)
- Les simulations sont réalistes (météo, marée et débits réels)
- Les traceurs sont injectés aussi proche que possible (en distance) du point où les débits ont été évalués par la DREAL ou les DDTM
- Ils sont injectés en concentration de 1 dans le débit
- L'emprise de calcul est celle du golfe de Gascogne, du Nord de la Vilaine au Nord de l'Espagne)

Sur les sites ateliers Morbleu

Les **apports en eau douce** estimés par simulation sont bien **supérieurs en 2014 par rapport à 2015**, et sont également deux fois plus importants pour le site de l'Eperon par rapport aux sites de Boyard et des Filières (données non montrées). Sur ces deux sites, les apports sont quantitativement équivalents. Sur le site des filières, l'impact relatif des fleuves est extrêmement variable dans le temps. Alors que l'Adour et la Vilaine ont un impact très réduit, Loire, Garonne, Dordogne (et parfois l'Adour), Charente, Sèvre et Lay impactent le site des Filières (Figure 17). La Garonne contribue entre 40 et 60% des apports au cours des mois de décembre 2013, 2014 et également en début d'hiver 2015. La Loire a une forte contribution relative durant les périodes estivales de 2014 et 2015 (~ 40% en été 2014 et ~50% en été 2015- Figure 17).

La Figure 18 présente les contributions relatives des principaux fleuves impactant le site atelier de Filières ; Les trois principaux fleuves externes aux Pertuis (Loire, Garonne et Dordogne) contribuent entre 50-60% des apports sur les sites des filières, de Boyard et à plus de 30% sur l'Eperon. La période d'émergence des mortalités sur le site des Filières entre février et mars 2014 est caractérisée par l'absence d'impact de la Loire. En 2015, lors de la réémergence des mortalités sur le site de Filières, six fleuves impactent ce site. Leur contribution est comprise entre 12,5 % (Lay) et 26,5% (Garonne). Les 3 fleuves externes aux Pertuis représentent à cette date (11-18 avril) 62% de la contribution des apports en eau douce. Ces contributions sont relatives (en%), et ne portent que sur ~5 psu en 2014 et ~3 psu en 2016 (soit moins de 9% de la masse d'eau), ce qui relativise cette information.

En conclusion, Les **apports en eau douce** estimés par simulation sont bien **inférieurs en 2015 par rapport à 2014**. De plus, les contributions, au niveau du site Filières, de la Sèvre et du Lay (qui auraient pu être suspectés comme impliqués dans les mortalités) suggèrent que leur **rôle a dû être minime**.

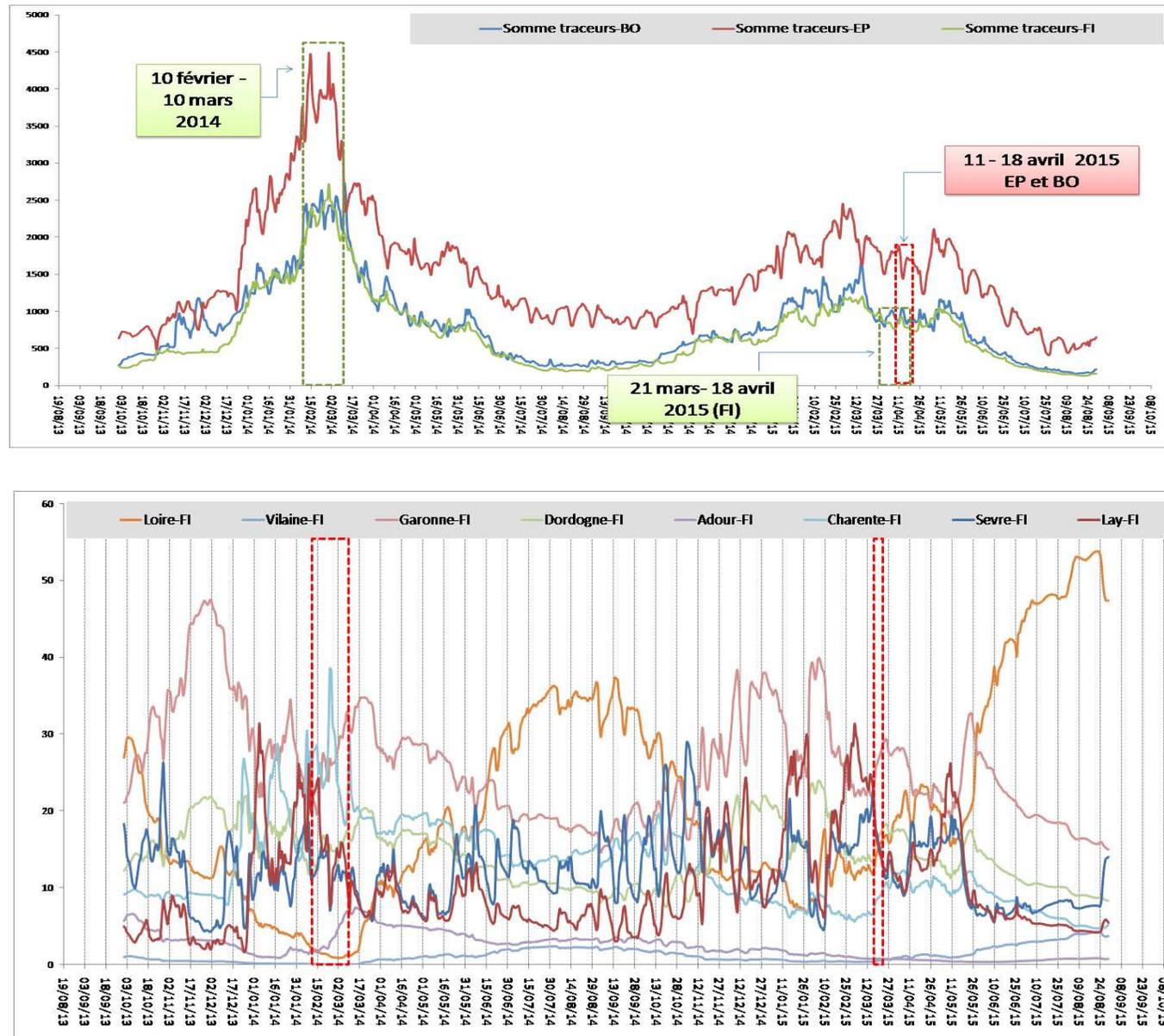


Figure 17 : A. Importance relative des apports fluviaux sur les 3 sites ateliers au cours des années 2014, 2015. Les rectangles en pointillé représentent les périodes d'apparition des mortalités de moules. B. Apports fluviaux sur le site des Filières en 2013 et 2014. Contribution relative des principaux fleuves externes et internes aux Pertuis (%). Les rectangles en pointillé représentent les périodes d'apparition des mortalités de moules.

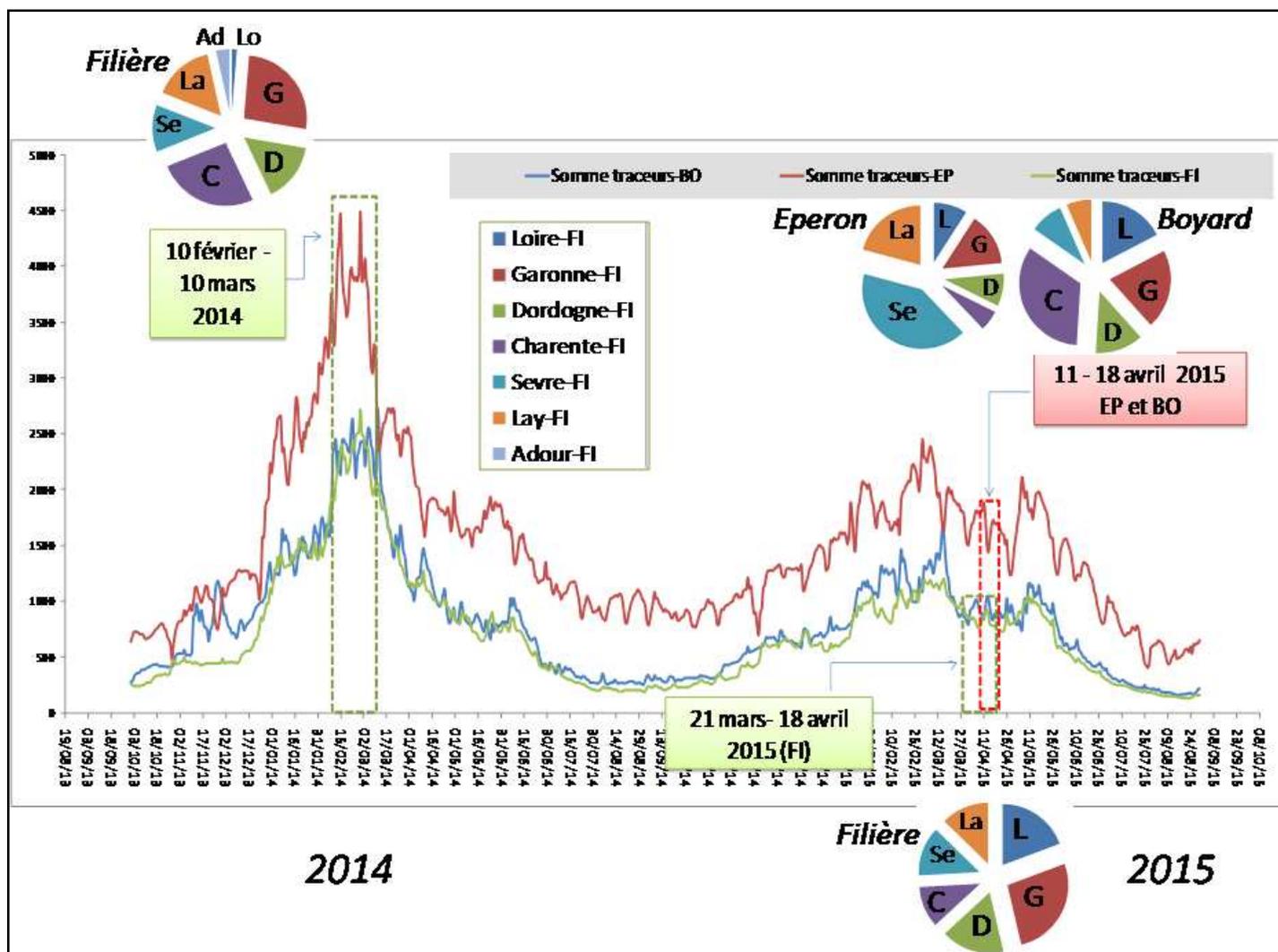


Figure 18 : Saisonnalité des apports fluviaux sur les 3 sites ateliers et contribution relative en apports (impact) des principaux fleuves (contribution > 1%) durant les périodes d'émergence des mortalités de moules en 2014 et 2015

4.6. L'environnement biotique

L'activité microbienne et phytoplanctonique est très importante dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Le phytoplancton et les autres organismes photosynthétiques convertissent le carbone inorganique dissous en biomasse organique qui peut ensuite être reminéralisée, principalement par les organismes hétérotrophes, comme les mollusques bivalves filtreurs. L'étude des flores bactériennes et phytoplanctoniques qui interagissent avec les moules apparaît comme un élément à renforcer pour la compréhension des équilibres qui les lient. Par ailleurs, il a été observé dans le Pertuis Breton une influence significative de la biomasse phytoplanctonique (chlorophylle a) sur la communauté bactérienne associée aux moules, notamment parmi les *Vibrionaceae* (Deter *et al.*, 2010).

L'objectif général est de **décrire** au mieux le compartiment biotique « qui baigne et alimente » les coquillages. Cet environnement a de multiples rôles, jouant un rôle nourricier primordial, apport en oxygène, un milieu liquide riche, en « équilibre », où se développe les coquillages mais aussi d'autres organismes parmi lesquels certains peuvent constituer des risques pour la santé des moules (organismes pathogènes infectieux, toxines).

A l'occasion de cette étude, il a été entrepris de caractériser l'environnement biotique des moules suivies sur les trois sites en mer du projet, entre février et juillet 2015. Cette caractérisation spatiale (3 sites) et temporelle (12 campagnes) concerne à la fois les flores bactériennes et les flores phytoplanctoniques. Ces deux communautés peuvent être décrites selon différentes approches techniques. Cette démarche devrait permettre à terme de comparer les assemblages des flores bactériennes (*Vibrionaceae* notamment) et phytoplanctoniques de manière spatio-temporelle, notamment avant et pendant la survenue d'épisodes de mortalité observés dans le Pertuis Breton mais aussi entre les deux pertuis.

Nous avons retenu pour décrire les **flores phytoplanctoniques** deux autres approches : i) une approche classique utilisée en routine par le **REPHY** basée sur la **détermination oculaire du taxon en microscopie optique** associée au **dénombrement des individus** de ce taxon (cellule/ml) à partir d'un échantillon d'eau, ii) une **approche par cytométrie en flux** basée sur une lecture automatisée de caractéristiques optiques des cellules dans un flux (taille, complexité, fluorescence) et le dénombrement des objets présentant ces caractéristiques propres, à partir d'un échantillon d'eau. Cette méthode s'adresse surtout à la description du pico-nanoplancton qui n'est pas accessible par la méthode précédente. Les méthodes évoquées ci-dessus présentent la particularité très avantageuse de permettre une analyse des échantillons *a posteriori*, pour autant qu'ils aient été conservés dans les conditions requises.

Enfin, une autre approche a été utilisée pour permettre de caractériser la flore bactérienne cultivable *a posteriori*. Elle est basée sur la mise en culture en milieu nutritif (Eau Peptonée Alcaline Salée, EPAS) à 22°C pendant 14h, d'un échantillon constitué par un filtre où 2L d'eau de mer sont « passés »(bactérioplancton). Cet échantillon cultivé peut être congelé sur le long terme et il permettra la remise en culture des bactéries revivifiables pour servir à toutes techniques adaptées. Cette étape de culture initiale limite les analyses aux colonies majoritaires qui repousseront et le critère quantitatif n'est pas de fait exploitable.

Les **données issues de séquençage** peuvent fournir des informations exhaustives sur les populations d'organismes présents dans les échantillons qui composent la flore du milieu au moment du prélèvement (s'ils ont été par ailleurs déjà décrits dans les bases de données de référence). Ces données permettent de caractériser la diversité et la richesse spécifique du

milieu, elles peuvent aussi fournir des indications sur l'abondance relative (equitability) de chaque taxon (ou cluster issu du barcoding). Ce jeu de données permettra de compléter l'approche écologique pour décrire l'environnement biotique et il permettra aussi de comparer à ce niveau de détail les 3 sites entre eux (diversité alpha et bêta,...).

Le matériel et méthode correspondant est présenté en Annexe 6, p117.

4.6.1. Flores phytoplanctoniques : écologie et dynamique

Nous présentons ici une analyse des données issues des observations du microplancton par une approche taxonomiste (REPHY, flore totale) ainsi qu'une approche par cytométrie en flux. Sur les représentations graphiques qui suivent les 3 stations étudiées sont associées au code couleur suivant : **Filière W**, **L'Eperon (terre)** et **Boyard**. La période de mortalité estimée est symbolisée par la zone en vert.

Evolution spatio-temporelle du microphytoplancton agrégé par classes taxonomiques sur les 3 sites MORBLEU-REPHY (Figure 19)

L'évolution des **Diatomées** (Bacillariophycées) et des **dinoflagellés** sont **assez proches**, exception faite de l'abondance totale nettement supérieure pour les Diatomées (5-6 log contre 2-4 log). Pour ces communautés, **peu de variabilité entre les stations** est observée. Néanmoins, pour les Dinoflagellés, la station Filière W présente des valeurs plus fortes en début de suivi. **Les euglènes** présentent des occurrences plus importantes sur le nord des pertuis (Filière W et L'Eperon). Pour les **autres classes**, les **abondances faibles** et/ou **diffuses** ne permettent **pas d'observer de différence entre les sites**.

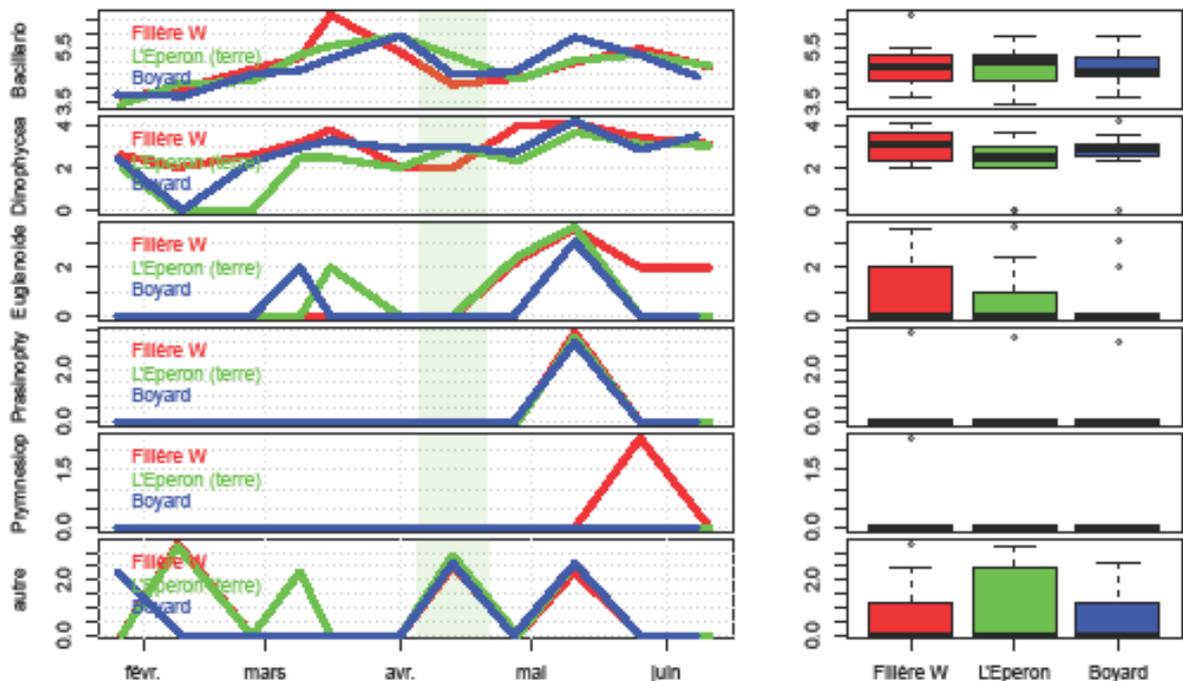


Figure 19 : Evolution spatio-temporelle des abondances du microphytoplancton agrégé selon 5 classes taxonomiques sur les 3 sites (échelle des abscisses en Log).

Evolution spatio-temporelle d'indices de diversité basés sur les données du microphytoplancton (Figure 20)

A l'échelle globale du semestre, les deux indices de diversité considérés, la richesse générique et l'équitabilité de Pielou, ne permettent pas de distinguer de différence entre les stations. Néanmoins, à compter de l'apparition des premières mortalités (matérialisée par la zone en vert), l'évolution de l'équitabilité laisse entrevoir certaines différences entre la station de Boyard et les deux du Pertuis Breton: les abondances des différentes communautés de phytoplancton sont plus équilibrées sur les stations du Pertuis Breton (équitabilité > 0.6) qu'à la station Boyard (équitabilité ~ 0.4).

A la station Filière W, on note également que **les premières mortalités surviennent alors que la richesse générique chute brusquement** et que les abondances des différentes populations s'équilibrent d'avantage (dynamique à la hausse de l'équitabilité) après la première efflorescence de printemps du mois de mars (efflorescence qui voit généralement l'émergence de certaines espèces, dont celles du genre *Skeletonema* sp., et déséquilibre les abondances entre les différentes populations).

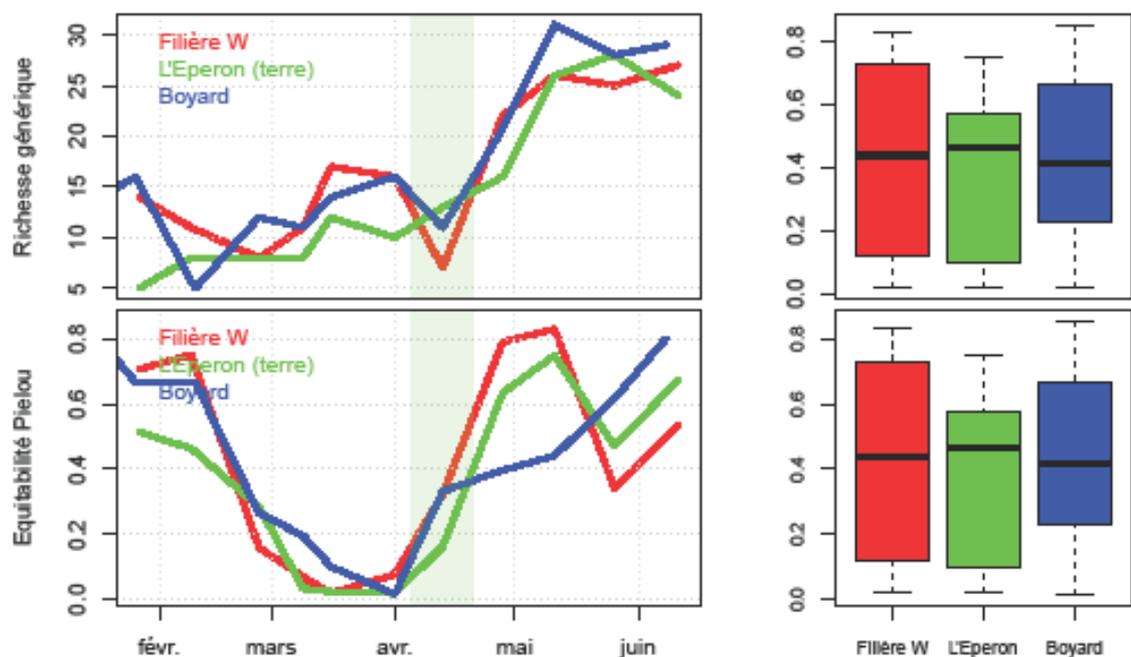


Figure 20 : Evolution spatio-temporelle d'indices de diversité basés sur le microphytoplancton aux trois sites.

Cytométrie en flux

La collection de plancton échantillonnée et testée par cytométrie en flux comportait en tout 46 tubes échantillons, correspondant à **18 dates de prélèvements** dans les pertuis **entre le 13/01/15 et le 07/07/15**. Les **résultats sont à venir** et viendront compléter l'approche taxonomique présentée ci-dessus (Donnée Rephy).

4.6.2. Flores phytoplanctoniques et bactériennes

Une approche biomoléculaire de métagénomique (metabarcoding) faisant appel à des homologies de séquences ADN de gènes conservés entre taxons a été choisie. Cette approche a la particularité de pouvoir générer des milliers/millions de barcodes qui devraient permettre d'obtenir la profondeur d'analyse nécessaire pour une caractérisation quasi-exhaustive et semi-quantitative des communautés bactériennes et/ou des communautés phytoplanctoniques présentes dans un échantillon environnemental.

Filtration et préparation des échantillons à séquencer

Un total de 384 litres d'eau (4L par échantillon) a été collecté au cours de 12 campagnes sur les trois sites des pertuis puis filtré (8,0 et 0.22 μ m). **Cinquante échantillons** (17 des échantillons collectés sur Filière W, 17 échantillons sur L'Eperon, 15 échantillons sur Boyard, 1 échantillon sur Loix) ont été sélectionnés pour les analyses metabarcoding. Cette sélection permet d'encadrer les dates ou les premières mortalités de moules sont apparues dans le Pertuis Breton.

Les ADN extraits de chaque échantillon ont été quantifiés et ajustés. Les régions hypervariables V3-V4 de l'ADNr 16S et V4 de l'ADNr 18S ont été choisies pour caractériser la diversité phytoplanctonique et bactérienne, respectivement. Ces ADNs ont été amplifiés correctement, après optimisation des conditions des deux PCR ADNr 16S et 18S. Au terme de cette étape, les ADNs amplifiés de 50 échantillons '16S' issus d'extraits filtrés ainsi que des 50 échantillons '18S' ont été expédiés à la plateforme de séquençage (GenoToul-INRA, Toulouse).

Séquençage Miseq Illumina pour fragments gènes 16S et 18S

Le run de séquençage s'est déroulé sans problème, les bibliothèques de séquences étaient de bonne qualité et l'ensemble des données de séquençage a été mis à disposition en ligne sur le site NG6 de la plateforme. Ces données ont été rapatriées auprès de la cellule Bioinformatique de Ifremer Brest pour un traitement bioinformatique ultérieur avec les outils de la plateforme Galaxy et le Workflow Qiime (nettoyage et alignement des séquences). Les fichiers de caractérisation des échantillons (variables associées) ont été constitués et fournis (Mapping files). **Au moment de la rédaction de ce rapport, aucune donnée traitée n'est encore disponible.**

En conclusions, l'analyse par classes de phytoplancton n'a pas permis de discriminer les sites selon leur niveau de mortalité. Par contre, grâce à **l'analyse d'indices de diversité**, nous avons pu noter, pour la station Filière W, que **les premières mortalités sont survenues alors que la richesse générique chutait brusquement**. De nombreuses analyses sont encore en cours et viendront compléter ces premiers résultats. Nous porterons une attention particulière à rechercher les cortèges phytoplanctoniques décrits dans l'analyse rétrospective (paragraphe 3.3, p32) comme présentant une dynamique saisonnière concomitante avec l'apparition des mortalités des moules.

**OBJECTIF 3 : UNE PART GENETIQUE ?
LES ANIMAUX AFFECTES APPARTIENNENT-ILS A UNE
ESPECE OU UNE POPULATION PARTICULIERE ?**

5. Objectif 3 : Une part génétique ? Les animaux affectés en 2014 et 2015 : une espèce, une population particulière touchée ?

Objectif:

Deux espèces de *Mytilus*, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sont présentes sur le littoral français, et réparties selon une structure originale en mosaïque, avec des zones abritant l'une ou l'autre des espèces, mais également des zones d'hybridation entre ces deux espèces. De plus cette structure délimite des lignées différenciées et notamment la lignée *M. edulis* du Golfe de Gascogne qui est celle principalement élevée en bouchot dans les Pertuis. Cette lignée diverge des autres populations *M. edulis*, dont la répartition débute au nord du Cotentin, sur de nombreux gènes immunitaire. Certains mytiliculteurs s'approvisionnent en naissain de ces autres régions. Il paraît donc indispensable de préciser la ou les lignées génétiques qui ont été impactés en 2014, et éventuellement en 2015. Dans ce contexte, l'objectif est **de définir l'espèce, voir la lignée, de *Mytilus*** qui a été impactée en 2014 (en collaboration avec N. Bierne, Université de Montpellier).

Un panel de 50 marqueurs génétiques de type SNP a été défini pour le typage génétique. Ce panel comprenait 33 marqueurs identifiés comme diagnostiques des cinq différents fonds génétiques de moules connus (*Mytilus trossulus*, *M. edulis* fond génétique Amérique, *M. edulis* fond génétique Europe, *M. galloprovincialis* Atlantique, *M. galloprovincialis* Méditerranée) et 17 marqueurs situés dans des gènes immunitaires identifiés influencés par la sélection par Fraïsse et al. (Fraïsse *et al.* 2015). Précédemment analysé par une autre technique (Illumina GoldenGate Genotyping with VeraCode), le typage a nécessité le design de nouvelles amorces d'amplification pour être analysé par la technique KASP, et 7 marqueurs ont dû être abandonnés. Au final nous avons donc analysés 29 marqueurs diagnostiques et 14 polymorphismes immunitaires. Une cinquantaine d'ADNs, principalement de moribondes, n'ont pas donné de résultats satisfaisants (données manquantes) et ont été éliminés de l'analyse. Le jeu de données est finalement composé de 44 moules d'échantillons de références, permettant de revalider le pouvoir diagnostiques du panel de SNPs, et **843 moules échantillonnées** à l'occasion du projet MORBLEU (336 survivantes et 478 moribondes).

Nous avons choisi de présenter les résultats sous la forme d'une estimation de la proportion d'ascendance des différents fonds génétiques de moules, car elle synthétise bien les informations que nous voulons discuter. A l'exception de **6 génotypes hybrides *edulis/galloprovincialis***, l'ensemble des **837 autres moules** de l'échantillon MORBLEU avaient des probabilités d'assignation au fond génétique ***M. edulis* européen** du Golfe de Gascogne supérieur à 0.99. La figure 21 présente les résultats obtenus sur les échantillons de référence. Aucune influence particulière du fond génétique des *M. galloprovincialis* de Méditerranée n'a été détectée et pour simplifier il n'est pas représenté ici. On remarque que le fond génétique *M. edulis* Amérique est introgressé par le fond génétique *M. edulis* Europe, et vice versa et que cette introgression est plus importante dans le nord de l'Europe. Les *M. galloprovincialis* Atlantique sont légèrement introgressées *edulis*. Ces résultats étaient connus (Bierne *et al.* 2003 ; Gosset 2012 ; Fraïsse *et al.*, 2015).

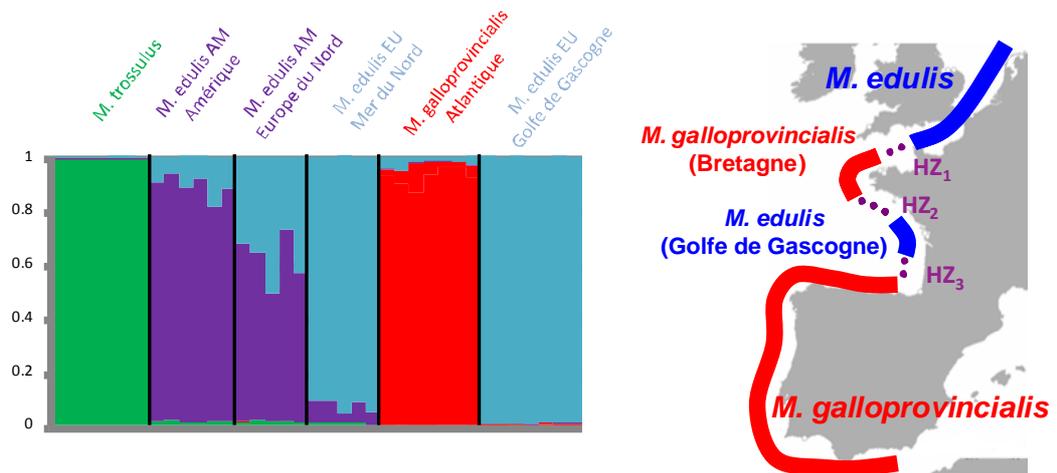


Figure 21 : Proportion d'ascendance génétique issue de quatre fonds génétiques différenciés (*M. trossulus* en vert, *M. edulis* Amérique en violet, *M. edulis* Europe en bleu et *M. galloprovincialis* en rouge) pour 37 moules d'échantillons de référence. La carte rappelle la distribution géographique connue des moules sur la façade Ouest de l'Europe.

L'analyse des échantillons MORBLEU révèle des résultats attendus, comme la présence d'**ascendance galloprovincialis** (Figure 22). Elle est particulièrement prononcée dans deux échantillons, celui de Pornichet (premiers individus de la figure) et l'échantillon 15-031 (animaux d'élevage présentant des mortalités, site Filières), provenant tous deux du nord du Golfe de Gascogne à proximité de la zone hybride. Cependant, une influence *galloprovincialis* faible est présente dans tous les échantillons avec des individus de type rétro-croisement de 3^{ième} ou 4^{ième} génération. Une ascendance très faible du fond génétique *M. edulis* Amérique est détectée pour la première fois dans le Golfe de Gascogne chez quelques individus (étoiles violettes sur la Figure 22) mais est sans doute naturelle étant donné qu'elle est détectée dans les populations *M. edulis* de Mer du Nord (Figure 21) et que les deux populations *M. edulis* d'Europe sont faiblement connectées ou ont été connectées dans un passé proche (Faure *et al.* 2007 ; Bierne 2010). Il n'est donc pas possible de savoir si les échanges conchyliques favorisent les échanges génétiques entre Manche/Mer du Nord et Golfe de Gascogne.

Enfin l'analyse révèle un résultat inattendu, la présence d'**ascendance trossulus** (étoiles vertes) chez quelques individus, à Pornichet, à Arcachon et sur le lot de captage utilisé par le réseau MYTILOBS. Bien que les proportions d'ascendances soient faibles et ne touchent que très peu d'individus, ce résultat n'est pas anecdotique, il implique nécessairement l'introduction de moules *M. trossulus* ou d'hybrides par des activités humaines. La proportion d'ascendance est trop faible pour espérer identifier la provenance de ces gènes *trossulus*. Les populations les plus proches sont au nord des îles Britanniques en Ecosse et Irlande, en Mer Baltique et dans certains fjords de Norvège, de Mer de Barents et de Mer Blanche.

Enfin nous n'avons découvert **aucune différence génétique entre les moribondes et les survivantes** sur les marqueurs étudiés. Les mortalités ont touché certains hybrides *edulis/galloprovincialis* en proportion identique que les *M. edulis*. Les polymorphismes immunitaires présentaient des fréquences alléliques similaires entre moribondes et survivantes.

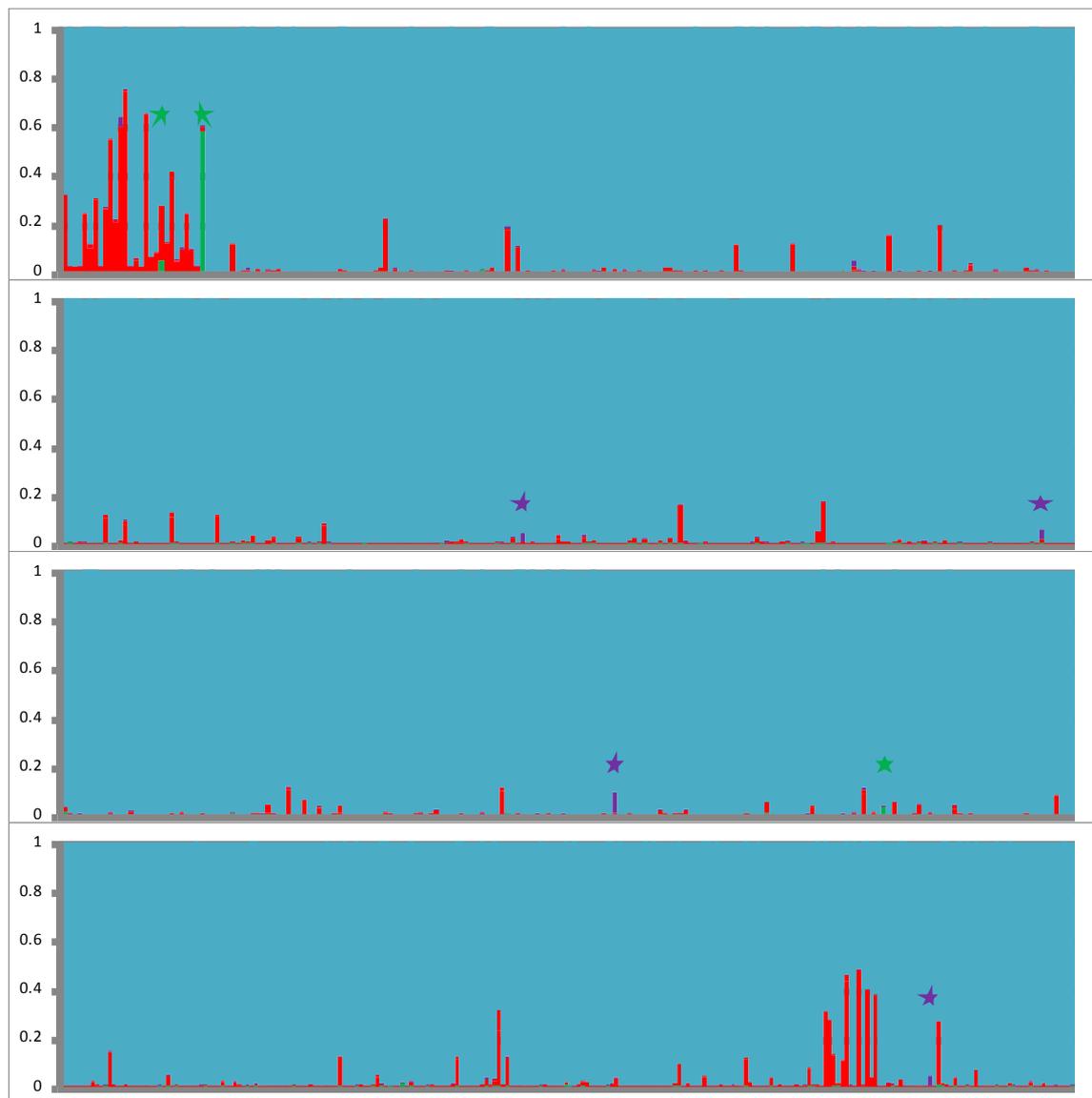


Figure 22 : Proportion d'ascendance génétique issue de quatre fonds génétiques différenciés (*M. trossulus* en vert, *M. edulis* Amérique en violet, *M. edulis* Europe en bleu et *M. galloprovincialis* en rouge) pour les 843 moules des échantillons MORBLEU.

En conclusion les analyses génétiques ont permis de définir de façon précise la composition génétique des stocks d'élevage dans les régions impactées par les mortalités. **La découverte d'une influence génétique *trossulus*, même faible, devra être prise en compte dans l'élaboration de scénarios à l'origine de l'émergence de cette maladie infectieuse.**

De plus, nous n'avons pas observé de différence génétique sur les marqueurs ici étudiés. Une approche plus globale (technologie RAD-seq) sera prochainement utilisée pour tenter d'identifier de nouveaux marqueurs.

**OBJECTIF 4 : QUALITE CYTOGENETIQUE DES CHEPTELS
MYTILICOLES EN RELATION AVEC LA MORTALITE 2015?**

6. Objectif 4 : Qualité cytogénétique des cheptels mytilicoles en relation avec la mortalité 2015?

Dans ce cadre des mortalités anormales touchant les stocks mytilicoles en France, nous avons émis l'hypothèse que ces **surmortalités pourraient être liées à une plus grande fragilisation des moules en relation avec une possible diminution de leur qualité cytogénétique**. En effet, dans le cadre plus large des crises de surmortalités récurrentes décimant les cheptels conchylicoles depuis 2008, des études précédentes d'analyse de ploïdie par cytométrie en flux des huîtres ont montré que la qualité cytogénétique, estimée via l'occurrence des anomalies génomiques : cassures de l'ADN et variation de la taille du génome, est un déterminant non négligeable de l'état de santé d'un animal. Ainsi, la qualité cytogénétique des géniteurs, celle de leurs descendants directs ainsi que les performances de survie de ces derniers apparaissent comme étroitement liées (Benabdelmouna *et al.* 2011 a-b).

Plusieurs travaux ont montré que l'exposition de ces mollusques bivalves aux diverses contaminations environnementales provoque une chute de leur qualité cytogénétique se traduisant par divers dégâts à l'ADN et incluant des anomalies du cycle cellulaire et des modifications de la taille du génome avec diverses aneuploïdies et polyploïdies (Bihari *et al.* 2003; Barranger *et al.* 2014).

Afin d'explorer cette hypothèse de baisse de la qualité cytogénétique des stocks mytilicoles touchés par la surmortalité en France, nous avons utilisé la **cytométrie en flux** afin d'étudier ce paramètre chez des moules adultes d'élevage ou issues de stocks sauvages. En effet, les anomalies génomiques des moules ont été souvent étudiées par cytométrie en flux qui est actuellement reconnue comme étant une approche sûre, rapide, non subjective et précise pour caractériser l'occurrence de ces diverses anomalies génomiques. Ainsi, nous avons cherché à déterminer **l'occurrence des anomalies génomiques** dans les **différents stocks** de géniteurs ainsi que la **spatialisation** de cette qualité cytogénétique.

Pour ce faire, nous basant sur les événements de mortalité de 2014, nous permettant d'identifier des **sites possiblement contrastés** au niveau des Pertuis Charentais, nous avons échantillonné **avant et après la mortalité de l'année 2015** plusieurs sites mytilicoles répartis dans cette zone (Figure 23). Par ailleurs, l'apparition de la mortalité au niveau de la baie de Bourgneuf en 2015 nous a aussi amenés à réaliser des échantillonnages au niveau de cette deuxième zone. Les différents sites prospectés sont représentés sur la Figure 23. Au total, 7 sites ont été échantillonnés à raison de 100-150 moules par site et cela fin 2014 - début d'année 2015 (avant mortalité) et durant l'automne 2015 (après la mortalité). Après leur collecte, les différents lots de moules ont été stockés dans les structures sécurisées de l'écloserie expérimentales du LGP2M à raison d'un lot par bac alimenté en eau de mer traitée aux UV. Ensuite, les analyses de la qualité cytogénétique de chaque lot ont été entreprises par cytométrie en flux utilisant le marquage à l'iodure de propidium en prélevant individuellement et de façon non destructive un échantillon d'hémolymphe sur chaque moule analysée.

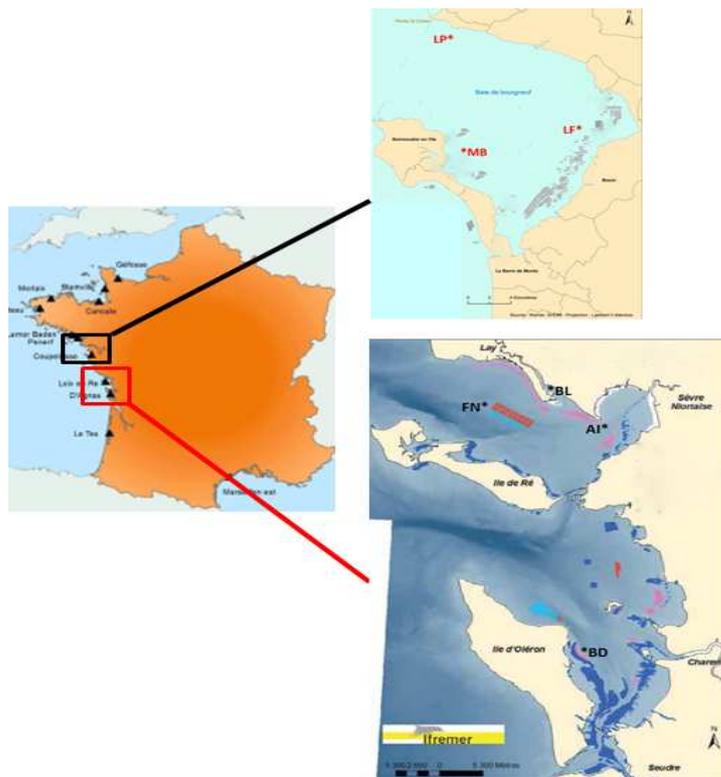


Figure 23 : Répartition des sites échantillonnés en 2015 au niveau de la baie de Bourgneuf (LP, la plaine ; LF, le fiol ; MB, maison blanche) et des Pertuis Charentais (FN, filières ; BL, bouée du Lay ; AI, Aiguillon ; BD, Boyard).

L'ensemble des résultats a fait l'objet d'une publication scientifique parue après l'édition du présent rapport. Ces données et l'article sont accessibles sous les liens suivants.

<http://archimer.ifremer.fr/index.jsp?record=0>

<http://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>

**OBJECTIF 5 : DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES/ UN
DEVELOPPEMENT GONADIQUE PARTICULIERES ?**

7. Objectif 5 : Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?

L'objectif est ici de caractériser l'état physiologique et le transcriptome des moules dans les Pertuis (en épisode ou hors épisode de mortalité). Ces analyses permettront de définir le **niveau d'expression des gènes** de la moule en épisode de mortalité ou hors épisode de mortalité. Grâce à la création du méta transcriptome *de novo* (MouTon) et de son annotation, la **fonction biologique potentielle** associée à « ces gènes » permettra une identification des **voies activées ou inhibées** en réponse aux conditions analysées. En fonction des gènes différenciellement exprimés entre conditions associées à la mortalité et de leur ontologie, il sera possible d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une réponse immunitaire permettant, dans le cas d'une présence, **d'étayer une piste infectieuse**. Les niveaux d'expression d'autres marqueurs de **stress ou de détresses physiologiques** pourront être également analysés pour soutenir une hypothèse plus multifactorielle.

Pour cela, des échantillons de moules vivantes, collectés avant, après et au cours des mortalités, sur des sites impactés et peu/pas impactés ont été étudiés. Afin de caractériser les animaux échantillonnés, nous avons étudié la quantité de bactéries appartenant au groupe *Splendidus* présentes dans les tissus des animaux, et utilisé les données d'histopathologie obtenues dans l'action MYTILOBS. Les échantillons, choisis *a posteriori*, selon la spatialisation, le niveau des mortalités de 2015 et les indicateurs choisis (quantité de bactéries et anomalies histopathologiques), ont été analysés par une approche transcriptomique à haut débit (RNA-seq). Le matériel et méthode correspondant aux résultats présentés ici est présenté en Annexe 6, p121.

7.1. Résultats : état physiologique et réponse moléculaire des animaux

7.1.1. Granulomes inflammatoires et quantités de bactéries du groupe *Splendidus* dans les animaux

La présence **d'anomalies histopathologiques** a été systématiquement recherchée dans 15 individus prélevés sur les différents sites MYTILOBS. La présence de nombreux **granulomes inflammatoires** (amas de cellules immunitaires) dans les tissus a pu être observée dans plus de 20% des animaux prélevés à partir du mois **d'avril 2015** sur le point **Filière** (29% de mortalités cumulées) et de **mai** sur le point **Roulière** (21% de mortalités cumulées) (Figure 24A). A l'inverse, ces granulomes n'ont été observés que chez 7% des animaux échantillonnés sur le site d'Yves, pour lequel seulement 6% de mortalités cumulées ont été enregistrées. Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien entre présence de granulome et mortalités, et mettent surtout en évidence une **réponse cellulaire et tissulaire des moules dès le mois d'avril sur le point Filière**. L'ensemble des données histologiques est plus précisément présenté dans le rapport MYTILOBS.

La **quantité de bactéries du groupe *Splendidus*** a été mesurée dans des broyats totaux d'animaux. Certaines bactéries de ce groupe pourraient en effet être liées à l'apparition de mortalités, mais en **absence d'outil de dépistage spécifique**, nous avons ici utilisé un indicateur global (proxy) : une augmentation de bactéries pathogènes d'une des espèces de ce groupe devant se traduire par une augmentation des bactéries totales du groupe. Néanmoins ces résultats sont à **prendre avec précaution**, les variations de flore

bactérienne (en partie constituée chez la moule par des bactéries du groupe *Splendidus*) étant fonction de nombreux paramètres autres que le développement d'une maladie.

Ces données montrent une variation saisonnière de la flore bactérienne (groupe *Splendidus*) avec une **augmentation marquée** de la quantité de bactéries détectées aux **mois de mars et avril** sur les animaux du site **Filière** (Figure 24B).

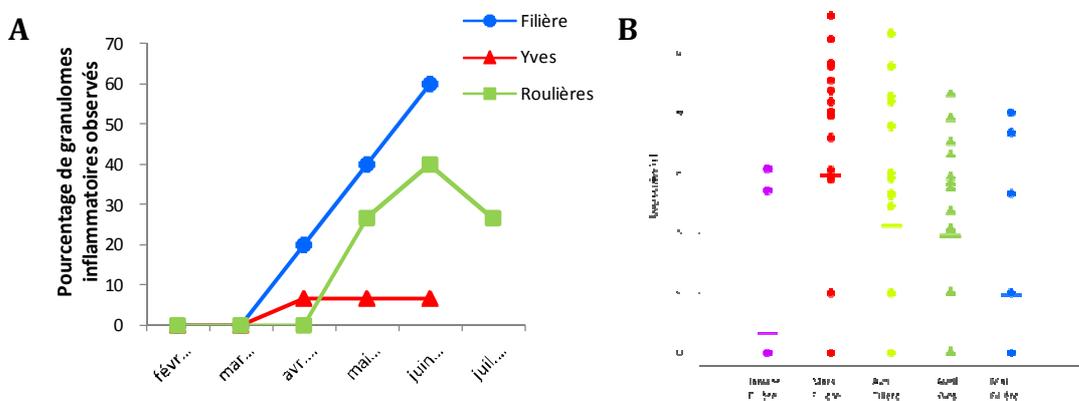


Figure 24 : **A.** Evolution du pourcentage de granulomes observés en histologie sur 15 animaux prélevés sur les sites de Filière (en bleu), Yves (en rouge) et Roulière (en vert). **B.** Evolution de la quantité de bactéries (Log copies/ml) du groupe *Splendidus* au sein des animaux, sur les sites de Filière (ronds) et Yves (triangles). Les données individuelles (formes) ainsi que la moyenne (trait) sont ici représentées.

Ainsi, ces résultats indiquent une **réponse cellulaire des moules dès le mois d'avril pour le point Filière**, et des **variations de flore bactérienne du groupe *Splendidus* dès le mois précédent** pour ce même point. Nos analyses moléculaires ont donc été centrées sur ces mois de mars-avril.

7.1.2. Analyse du transcriptome

L'échantillonnage 2015 ayant été tardif (prélèvements jusqu'en juillet 2015), la réalisation de l'approche transcriptomique a été décalée dans l'année. Les extractions d'ARNs totaux et le séquençage des 24 librairies ont été réalisés avec succès. Le traitement des données de séquençage est encore en cours d'analyse (étape d'avancement dans le traitement des données présenté dans la Figure 25).

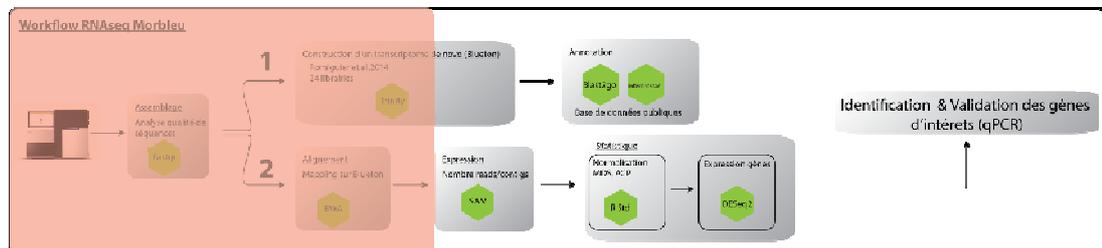


Figure 25: Avancement du traitement des données de RNAseq

Une fois achevée, l'analyse de chaque transcriptome de pools de moules analysées permettra de définir le **niveau d'expression des gènes** de la moule bleue en épisode de mortalité ou hors épisode de mortalité. En fonction des gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre conditions associées à la mortalité et de leur ontologie, il sera possible **d'affirmer ou d'infirmer** la présence d'une réponse immunitaire permettant, dans le cas d'une présence, **d'étayer une piste infectieuse**.

8. Conclusions générales

Les objectifs généraux de ce projet sont d'identifier des **facteurs potentiellement corrélés** avec les **mortalités de moules** observées dans les Pertuis Charentais: **facteurs environnementaux** (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques) et **facteurs intrinsèques aux animaux** (traits d'histoire de vie, qualité cytogénétique et physiologie). Après une introduction bibliographique complète, différentes questions ont été ici abordées.

1. Historique des mortalités 2014-2015 ?

Grâce à différentes sources d'information nous avons pu retracer les évènements de mortalités de 2014 et 2015 et valider l'échantillonnage réalisé en 2015 dans MORBLEU (au niveau temporel et spatial). Contrairement aux observations faites en 2014, les **mortalités observées en 2015** ont été rapportées **dans un premier temps en Vendée** (Mars 2015) **puis en Charente-Maritime** (Avril 2015) où elles ont atteint des niveaux de mortalité inférieurs à ceux notés en 2014, tout en restant significativement « anormaux » sur certains sites.

2. Les mortalités 2014 et 2015 sont-elles exceptionnelles ? Existe-t-il un lien avec les fluctuations environnementales ?

Pour cela, nous avons porté un regard rétrospectif sur 15 années de données acquises dans les réseaux portés par Ifremer afin de définir un niveau de mortalité « anormale » et d'explorer de potentiels liens avec fluctuations environnementales. Nous avons pu observer que (1) les **épisodes de mortalités de 2014 et 2015 peuvent être qualifiés d'exceptionnels**, (2) ils sont survenus dans des **conditions climatiques plutôt chaudes et pluvieuses** associées à des **indices de diversités phytoplanctoniques bas** (nombre de taxons et équilibre quantitatif entre ces taxons). De plus, la spécificité de cortèges phytoplanctoniques dans la dynamique saisonnière avec l'apparition des mortalités des moules **laisse apparaître un lien possible entre les mortalités et la dynamique phytoplanctonique** observées dans les Pertuis Charentais. Ce constat et les liens étroits qui existent entre phytoplancton et micro-organismes confortent l'hypothèse d'une origine bactérienne dans ces épisodes de surmortalité de 2014 et de 2015 : la structure de la communauté phytoplanctonique ou la présence de certains taxons pouvant favoriser l'émergence de certains types bactériens potentiellement pathogènes pour les moules.

3. Dans quelles conditions les mortalités de moules sont-elles survenues en 2015 ?

Nous présentons ici dispositif mis en place sur nos 3 sites ateliers (Filière, Boyard, Eperon et Loix) et l'ensemble des échantillons et mesures collectées (environnement abiotique ou biotique, ou connectivité hydrodynamique des masses d'eaux). Cette action de recherche a nécessité 16 campagnes et aboutit à la bancarisation de **805 échantillons**, certains prélevés au cours des **mortalités observées sur les animaux déployés sur certains sites**. Les analyses réalisées sur ces animaux ont révélé la présence de bactéries majoritaires appartenant à l'espèce *V. splendidus*, capables d'induire expérimentalement de fortes mortalités chez les moules.

Les mortalités observées en 2015 sont survenues dans un **contexte environnemental abiotique différent** de celui observé en 2014: (1) des **températures significativement différentes**, bien que restant dans une gamme de valeurs globalement situées entre 10 et 13°C,

(2) des **salinités très nettement opposées**, instables et basses en 2014, et "normales" et stables en 2015 et (3) des **différences dans la contribution relative des fleuves** aux masses d'eau. Néanmoins, ces épisodes s'inscrivent dans une **même période climatique, marquée par des températures plus élevées et des salinités plus faibles qu'il y a quelques années**. A l'inverse, les **conditions hydrodynamiques et la forte connectivité entre les sites du Pertuis Breton et les côtes vendéennes sont quant à elles comparables** entre ces 2 années.

Le suivi de paramètres abiotiques (polluants, contaminants chimiques et de nutriments) a révélé une **variation saisonnière** et des valeurs considérées comme « normales » pour la plupart des paramètres étudiés, et **peu de différences entre les 3 sites suivis** (sites qui présentaient des contrastes en terme de mortalités en 2015). De la même manière, l'analyse par classes de phytoplancton n'a pas permis de discriminer les sites selon leur niveau de mortalité. Par contre, grâce à **l'analyse d'indices de diversité**, nous avons pu noter pour la station Filière, que **les premières mortalités surviennent alors que la richesse générique chute brusquement**.

De nombreuses analyses sont encore en cours et viendront compléter ces premiers résultats.

4. Quelle(s) ont été la(les) espèce(s) ou population(s) de moules affectée(s) ?

Différentes espèces et populations étant présentes sur les côtes française, nous avons cherché à préciser les ascendances génétiques sur des animaux moribonds et vivants prélevés (Morbleu et mortalité déclarées MYTILOBS-2). Pour 99% d'entre eux, les animaux analysés ont pu être affiliés **au fond génétique *M. edulis* européen** du Golf de Gascogne. Toutefois la présence d'ascendance *trossulus* sur certains individus est à considérer. Avec les marqueurs utilisés, aucune différence génétique entre les animaux moribonds et survivants n'a pas être observée, **les mortalités touchant certains hybrides *edulis/galloprovincialis* en proportion identique que les *M. edulis***.

5. Quelle était la **qualité cytogénétique des animaux** en 2015 ? Pourrait-il exister un lien avec les mortalités observées ?

Nous avons échantillonné des animaux prélevés sur 7 sites mytilicoles avant et après la mortalité de l'année 2015. Les analyses de la qualité cytogénétique de ces animaux est toujours en cours.

6. Ces animaux étaient-ils dans des **conditions physiologiques particulières** ?

Des échantillons de moules vivantes, collectés avant, après et au cours des mortalités, sur des sites impactés et peu/pas impactés ont été analysés par une approche transcriptomique à haut débit (RNA-seq). L'échantillonnage 2015 ayant été tardif dans l'année (prélèvements jusqu'en juillet 2015), la réalisation de l'approche transcriptomique a été retardée. Le traitement des données de séquençage est encore en cours d'analyse. Une fois achevée, l'analyse de chaque transcriptome de pools de moules analysées permettra de définir le **niveau d'expression des gènes** de la moule bleue en épisode de mortalité ou hors épisode de mortalité. En fonction des gènes identifiés comme différentiellement exprimés entre conditions associées à la mortalité et de leur ontologie, il sera possible **d'affirmer ou d'infirmer** la présence d'une réponse immunitaire permettant, dans le cas d'une présence, **d'étayer une piste infectieuse**.

Ainsi cette année nous a permis (1) de confronter les données environnementales à 15 années de mesures, (2) de mettre en place un dispositif et d'échantillonner au cours d'un épisode de mortalité, (3) de préciser le fond génétique des animaux affectés. Cependant les prélèvements ayant été tardifs, de nombreuses analyses sont encore en cours de traitement.

Aux vues de cette première année d'étude, de nombreuses perspectives s'ouvrent. Après l'analyse complète des analyses encore en cours, il paraît indispensable de **formuler et hiérarchiser des hypothèses** quant aux différents facteurs, liés aux animaux ainsi qu'à leur environnement, qui pourraient favoriser les mortalités de moules. Il serait également souhaitable d'obtenir des données complémentaires sur **une deuxième année** pour renforcer l'expertise sur l'étude du phénomène et de **développer des essais** en laboratoire et en mésocosme, pour pouvoir tester certaines hypothèses dans un deuxième temps.

9. Références bibliographiques

- Aguirre M.P., 1979. Biología del mejillón "*M. edulis*" de cultivo de la ría de Vigo). Boletín Instituto español de oceanografía T. 5 n°276: 107-159.
- Akcha Farida, Spagnol Charlene, Rouxel Julien (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106, 104-113. Publisher's official version : <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.018>
- Alves Junior N. Milet Meirelles, de Oliveira Santos Dutilh Silva, Paranhos, Cabral, Rezende, de Moura, Henrique, Pereira, Valle, Sawabe, Thompson, Thompson (2015). Microbial community diversity and physical-chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. *Arch Microbiol* (2015) 197:165-179
- Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E.V., 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 667-684.
- Arzul Genevieve, Quiniou Françoise, Carrie Cecile (2006). In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16(8), 431-437. Publisher's official version : <http://dx.doi.org/10.1080/15376520600698717>
- Auby, I., D'Amico, F., Meteigner, C., Ganthy, F., Maurer, D., Gouriou, L., Rigouin, L., Rumebe, M., Tournaire, M.-P., Trut, G., Oger-Jeanneret, H., Guesdon, S., Derrien, A., Chabirand, J.-M., Charpentier, G., Genauzeau, S., Schmitt, A., Geairon, P., Grizon, J., Seugnet, J.-L., Thomas, G., Bechemin, C., Soudant, D., Lamoureux, A., Beaugrand, P., Noureau, B., Michel, V., Dupin, M., Bariou, J., Landier, P., Miguel, V., 2015. Suivi «hydrologie» et «phytoplancton» des masses d'eau du bassin hydrographique Adour-Garonne sur la période 2009-2014.
- Barillé, A.L., 1996. Contribution à l'étude des potentialités conchylicoles du Pertuis Breton, Thèse Université d'Aix-Marseille II, 312 p,
- Barranger Audrey, Akcha Farida, Rouxel Julien, Brizard Raphael, Maurouard Elise, Pallud Marie, Menard Dominique, Tapie N., Budzinski Helene, Burgeot Thierry, Benabdelmouna Abdellah (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: evidence of vertical transmission of dna damage. *Aquatic Toxicology*, 146, 93-104.
- Barranger Audrey, Benabdelmouna Abdellah, Degremont Lionel, Burgeot Thierry, Akcha Farida (2015). Parental exposure to environmental concentrations of diuron leads to aneuploidy in embryos of the Pacific oyster, as evidenced by fluorescent in situ hybridization. *Aquatic Toxicology*, 159, 36-43. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00238/34911/>
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., Benabdelmouna, A. (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat. Toxicol.* 146 : 93-104.
- Basuyaux O., Forêt M., Chataigner C. 2011. Etude de la cartographie de *Mytilicola intestinalis* sur les côtes du département de la Manche. Rapport SMEL/CE - Prod 2011-01, 37 pp.
- Bechemin C, Soletchnik P, Polsenaere P, Le Moine O, Pernet F, Protat M, Fuhrmann M, Quere C, Goullitquer S, Corporeau C, Renault T, Lapegue S, Travers M.A, Morga B, Garriques M, Garcia C, Haffner P, Dubreuil C, Faury N, Baillon L, Baud J.P. 2014. Surt mortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014). <http://archimer.ifremer.fr/doc/00229/34022/>
- Bechemin C, Soletchnik P, Polsenaere P, Le Moine O, Pernet F, Protat M, Fuhrmann M, Quere C, Goullitquer S, Corporeau C, Renault T, Lapegue S, Travers M.A, Morga B, Garriques M, Garcia C, Haffner P, Dubreuil C, Faury N, Baillon L, Baud J.P. 2015. Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis Charentais. *Bulletin Epidémiologie, Santé animale et alimentation* 67, 6-9. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00312/42343/>
- Belin, C., and Neaud-Masson, N. 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013. Ifremer, Nantes. 81 pp. Benabdelmouna Abdellah, Hemissi Issam (2011a). CARTAMO : CARTographie des Anomalies

- génomiques dans les gisements naturels d'huîtres creuses du bassin de Marennes Oléron. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00062/17281/>
- Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D., Le Foll, F., 2016. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Developmental & Comparative Immunology* 57, 107–119.
- Benabdelmouna Abdellah, Hemissi Issam, Bodin Stephane, Robert Stephane, Ledu Christophe, Laporte Philippe (2011b). CAPRETAR : Etude comparative des caractéristiques cytogénétiques et des performances de survie de naissains sauvages issus du CAPtage PREcoce ou TARDif. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00062/17283/>
- Bihari, N., Mičić, M., Batel, R., Zahn, R.K. (2003). Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. *Aquat. Toxicol.* 64, 121–129.
- Blateau D. 1989. Expériences de traitement des moules (*M. edulis*) de bouchots de la baie du mont Saint-Michel parasitées par du *Mytilicola intestinalis* – Septembre 1987 et 1988. Rapport IFREMER. 16pp.
- Blin J.L. 2010. Suivi de la production mytilicole Bas-Normande. Résultats 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007. Rapport SMEL, 54 pp.
- Blin J.L., Pien S., Richard O. 2004. Suivi sur pieux de la production mytilicole Bas-Normande. Résultats préliminaires d'un suivi de productivité standard. Rapport SMEL, 36 pp.
- Boromthanarat S. et J.M. Deslous-Paoli 1988. Production of *Mytilus edulis* reared on bouchots in the bay of Marennes-Oléron: comparaison between two methods of culture. *Aquaculture* 72, 255-263.
- Bostrom, K. H., K. Simu, A. Hagstrom, and L. Riemann. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2:365–373.
- Bouxin H. 1954. Observations sur le frai de *Mytilus edulis* Var. *galloprovincialis* (Lmk). Dates précises de frai. Facteurs provoquant l'émission de produits génitaux. International Council for the Exploration of the Sea. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00004/11489/>
- Bower, S.M., 2001. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Virus-Like Disease of Mussels.
- Bower, S.M., 2006. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Haemocytic Neoplasia of Mussels.
- Brienne H. 1960. *Mytilicola intestinalis* (Steuer) dans les moules de la baie de l'Aiguillon. *Science et Pêche*, 87, 1-6. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/7185/>
- Brienne H. 1962. Evolution de l'infestation des moules de la baie de l'Aiguillon par *Mytilicola intestinalis* (Steuer) au cours de l'année 1962. *Science et Pêche* 106, 1-5. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/7053/>
- Brienne H. 1964. Observations sur l'infestation des moules du Pertuis Breton par *Mytilicola intestinalis* (Steuer). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 28, 205-230. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4029/>
- Buchan, A., LeCleir, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Micro* 12, 686–698.
- Claisse D. (2007) Surveillance chimique : Guide de prélèvement d'échantillons marins pour l'analyse des contaminants chimiques.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117–143.
- CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole) 2012. Suivi de la Reproduction et du Captage de la moule *Mytilus edulis* en Charente maritime en 2012. (01/07/2015). <http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/>

- CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole) 2013. Suivi de la Reproduction et du Captage de la moule *Mytilus edulis* en Charente maritime en 2013. (01/07/2015). <http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/>
- Dardignac M.J. 1996. La mytiliculture dans le Pertuis Breton - Synthèse des travaux réalisés en 1980 à 1992. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00045/15581/>
- Dardignac M.J. et J. Prou 1995. A propos des problèmes de captage de naissains de moules (*Mytilus edulis*) dans le Pertuis Breton de 1989 à 1991, Observations préliminaires. Haliotis 24, 13 - 31.
- Dardignac M.J., 1994. Estimation des biomasse de moules (*Mytilus edulis*) en élevage dans les bouchots du Pertuis Breton - Evolution entre 1988 et 1993. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00081/19192/>
- Dardignac M.J., Bodoy A., Garnier J., Heurtebise S., Legrand J. 1990. Etude de la mortalité des moules dans le Pertuis Breton en 1989. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00048/15902/>
- Dardignac, M. J. 2004. La mytiliculture dans le " Pertuis Breton": synthèse des travaux réalisés de 1980 a 1992. In Annales de la Société des sciences naturelles de la Charente-Maritime (pp. 3-79). Société des sciences naturelles de la Charente-Maritime. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1911/>
- Dare P.J. and G. Davies 1975. Experimental suspended culture of mussels (*Mytilus edulis*) in Wales using spat transplanted from a distant settlement ground. Aquaculture 6, 257 - 274.
- Degerman, R., Dinasquet, J., Riemann, L., Sjöstedt de Luna, S., Andersson, A., 2013. Effect of resource availability on bacterial community responses to increased temperature. Aquatic Microbial Ecology 68, 131-142.
- Deter Julie, Lozach Solen, Veron Antoine, Chollet Jaufrey, Derrien Annick, Hervio Heath Dominique (2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. Environmental Microbiology, 12(4), 929-937
- Diggles BK, Hine PM, Handley S, Boustead NC 2002. A Handbook of Diseases of Importance to Aquaculture in New Zealand. NIWA Science and Technology Series No. 49. 200 p. ISSN 173-0382.
- Dore, M.H., 2005. Climate change and changes in global precipitation patterns: what do we know? Environment international 31, 1167-1181.
- Droop, M.R., 2007. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? Journal of Plankton Research 29, 107-113.
- EURL Standard Operating Protocol (SOP) 2013. *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* detection by Real Time Polymerase Chain Reaction <http://www.eurl-mollusc.eu/content/download/72924/948279/file/Vsplendidus&aestuarianus%20RealTimeCR.pdf>
- Fraïsse, C., K. Belkhir, J. Welch and N. Bierne, 2015 Local inter-species introgression is the main cause of outlying levels of intra-specific differentiation in mussels. Molecular Ecology 25: 269-286.
- Fuentes, J., et al., 2002. Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ria de Arousa (NW of Spain). Aquaculture [Aquaculture]. 213, 233-251.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.-Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquat. Toxicol. 84, 92-102.
- Garen P., Robert S. et S. Bougrier (2004). Comparison of growth of mussel, *Mytilus edulis*, on longline, pole and bottom culture sites in the Pertuis Breton, France. Aquaculture 232, 511-524. Open Access version : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/581/>
- Gérard D. 2002. Estimation du stock de moules sur bouchots en baie du Mont Saint-Michel. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5304/>
- Gerla D. 1990. Exemple de gestion d'un bassin mytilicole. La Baie du Mont St-Michel. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00071/18209/>

- Giraudoux, P., 2015. Data analysis in ecology: package "pgirmess".
- Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379–391.
- Grosjean, P., Ibanez, F., 2004. Package for analysis of space-time ecological series. PASTECS version 1.2-0 for R v. 2.0. 0 & version 1.0-1 for S+ 2000 rel 3.
- Grossel H., décembre (2006). Manuel d'observation et de dénombrement du phytoplancton marin. Document de
- Guesdon, S., Bechemin, C., Chabirand, J.M., Verite, C., Seugnet, J.L., Grizon, J., 2015. SAPERCHAIS-HF data and metadata. <http://dx.doi.org/10.17882/41146>
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., Del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., Mah_e, F., Massana, R., Montresor, M., Morard, R., Not, F., Pawlowski, J., Probert, I., Sauvadet, A. L., Siano, R., Stoeck, T., Vaultot, D., Zimmermann, P. & Christen, R. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res.*, 41:D597–D604.
- Husson, F., Josse, J., Pages, J., 2010. Principal component methods-hierarchical clustering-partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data. Applied Mathematics Department.
- Irigoien, X., Huisman, J., Harris, R.P., 2004. Global biodiversity patterns of marine phytoplankton and zooplankton. *Nature* 429, 863–867.
- Jones, J. B., et al., 1996. Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25, 143-149.
- Jost, L., 2010. The relation between evenness and diversity. *Diversity* 2, 207–232.
- Korringa P. et L. Lambert 1951. Quelques observations sur la fréquence de *Mytilicola intestinalis* (steuer) (Copepoda parasita) dans les moules du littoral méditerranéen français. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 17, 15-29.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6748/>
- Lambert L. 1935. La culture de la moule en Hollande. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 8, 431-480. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5724/>
- Lambert L. 1951. Le Cop rouge (*Mytilicola intestinalis*) (steuer) sur les côtes de France. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 17, 51-56.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6751/>
- Lambert L. et Faideau 1929. Ostréiculture et mytiliculture sur le littoral centre ouest. Ed. J. Foucher, La Rochelle. 45pp.
- Le Borgne Y. 1979. Techniques de reproduction contrôlée des mollusques bivalves pour les élevages extensifs ou le repeuplement : rôle des écloséries-nurseries. Journées d'étude "Aquaculture extensive et repeuplement" - Brest, 29-31 mai 1979.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6042/>
- Legendre, P., Legendre, L.F., 2012. Numerical ecology. Elsevier.
- Lubet P., 1959. Recherche sur le cycle sexuel et l'émission de gamète chez les mytilidés. Thèse 159 pp.
- Mahé, J Mayor, J Bunge, Chi J., Siemenmeyer T, Stoek T, Walhl B, Paprotka T, Filker S, Dunthorn M. (2015). Comparing High-throughput Platforms for Sequencing the V4 Region of SSU-rDNA in Environmental Microbial Eukaryotic Diversity Surveys. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 62, 338–345. doi:10.1111/jeu.12187
- Mahé, J.L. 1994. Moules et mytiliculture en baie de l'Aiguillon, Ed. Rumeur des Ages, 135 pp.
- Marie, D., Rigaut-Jalabert, F. and Vaultot, D. (2014), An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry*, 85: 962–968.

- Marteil Louis (1976). La conchyliculture française. 2eme partie. Biologie de l'huitre et de la moule. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 40(2), 149-346. Open Access version : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1796/>
- Massana R et al. 2015 Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. Environ. Microbiol. 17, 4035–4049.
- Mazurie J., Bouget J.F., Claude S., Fleury P.G., Langlade A. 2001. Comparaison des performances d'élevage de moules en 4 sites mytilicoles de la baie de Vilaine, de février 2000 à février 2001. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6373/>
- Mazurie J., Bouget J.F., Thomas Y. 2005. Croissance et production mytilicole en Baie du Mont Saint-Michel, après restructuration : compte-rendu final de l'étude sur 15 pieux entre avril 2004 et janvier 2005.
- méthode REPHY. Document Ifremer / EMP.
- Meyer P. F., Mann H. (1951). Recherches allemandes relatives au "Mytilicola", copépode parasite de la moule, existant dans les watten allemandes 1950/51. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 17(65), 63-75. Open Access version : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6753/>
- Neaud-Masson Nadine (2015). Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique photonique - Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY. Document de méthode.
- Pawlowski J, Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, et al. (2012) CBOL Protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biol* 10(11): e1001419. doi: 10.1371/journal.pbio.1001419
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Renault Tristan (2006). Viruses of bivalve shellfish. *Annales de l'Institut Pasteur. Virologie*, 10, 35-41.
- Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources*. 17, 397.
- Robert S., Bedier E. 2013. Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis* MYTILOBS. Campagne 2012. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00166/27720/>
- Robert S., Bouget J.F., Fleury E., Chauvin J., Gagnery A., Normand J., Blin J. L., Cheve J., Dagault F., Gerla D., Lejolivet A., Penot J., Chabirand J.M., Genauzeau S., Geairon P., Grizon J., Le Moine O., Schmitt A., Seugnet J.L., Soletchnik P. 2015. Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis*, MYTILOBS, Campagne 2014-2. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00270/38086/>
- Robert S., Geairon P., Guilpain P., Razet D., Fauray N., Seugnet J.L., Grizon J., Soletchnik P., Le Moine O., Gouletquer P. 2001. REMOULA 2000 - Réseau de croissance moule des Pertuis Charentais - Mars 2000 - Février 2001. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00031/14243/>
- Robert S., Le Moine O. 2003. Expertise des élevages de moules après la canicule estivale. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00074/18511/>
- Robert S., Soletchnik P., Le Moine O., et S. Zanker (2007). Bilan d'étude sur la croissance de la moule (*Mytilus edulis*) sur bouchots et filières dans les Pertuis Charentais entre 2000 et 2005 (Réseau REMOULA). <http://archimer.ifremer.fr/doc/00084/19487/>
- Rodriguez J. 2013. Performances d'élevage de la moule (*Mytilus edulis*) en Manche/Atlantique. Recensement et interprétation. 1 : Synthèse et rapport. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00142/25341/>
- Rodríguez-Ramos, T., Dornelas, M., Marañón, E., Cermeño, P., 2013. Conventional sampling methods severely underestimate phytoplankton species richness. *J. Plankton Res.* fbt115.
- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J.L., 2005. Links between Phytoplankton and Bacterial Community Dynamics in a Coastal Marine Environment. *Microb Ecol* 49, 163–175.

- Roport M, Olivési R. 2002. Etat de l'activité mytilicole sur le secteur de Quend-Palge (Picardie) - Première approche des problèmes de mortalités printanières de moules associées au développement saisonnier de "vase" sur les bouchots. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00082/19361/>.
- Roport M. 1999. Caractérisation et déterminisme du développement d'une population de l'annélide tubicole *Lanice conchilega* (Pallas, 1766) (Polychète Terebellidae) associé à la conchyliculture en Baie des Veys (Baie de Seine Occidentale). PhD Thesis, Muséum National d'Histoire Naturelle. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3/>
- Sassoubre LM, Yamahara KM, Boehm AB (2015). Temporal stability of the microbial community in sewage-polluted seawater exposed to natural sunlight cycles and marine microbiota. *Applied and environmental microbiology* 81 (6), 2107-2116
- Scherrer, B., 2007. Biostatistique, vol. 1, Gaëtan Morin éditeur, 816 pp.
- SOMLIT (2015). Procédure : Protocole national Prélèvement, fixation, stockage et envoi des échantillons pour la cytométrie en flux. <http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/spip.php?rubrique89>
- Stachowski-Haberkorn Sabine, Becker Beatriz, Marie Dominique, Haberkorn Hansy, Coroller Louis, De La Broise Denis (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology*, 89(4), 232-241. Publisher's official version : <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.004>
- Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones M, et al. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology* 19: 21–31. doi: 10.1111/j.1365-294x.2009.04480.x
- Thioulouse, J., Chessel, D., 1987. Les analyses multitableaux en écologie factorielle. I: De la typologie d'état à la typologie de fonctionnement par l'analyse triadique. *Acta Oecologica Oecologia Generalis* 8, 463–480.
- Thioulouse, J., Simier, M., Chessel, D., 2004. Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables. *Ecology* 85, 272–283.
- Thomas Yoann (2004) – Etude de la croissance de *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis* en Baie du Mont Saint Michel et dynamique de la population de moules exploitées sur bouchots. DEA d'exploitation durable des écosystèmes littoraux, Un. La Rochelle. 52 pp.
- Tracey, G. A. 1988. Feeding reduction, reproductive failure, and mortality in *mytilus edulis* during the 1985 "brown tide" in narragansett bay, rhode island. *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf 50, 73-81. <http://search.proquest.com/docview/15277016?accountid=27530>
- Travers M.A., Morga B., Garcia C., Garrigues M., Baillon L., Renault T., Dubreuil C., Bechemin C., Pernet F., Corporeau C. 2015. Mortalités de moules bleues. Journée de restitution convention 2014 Ifremer/DPMA. 20 mai 2015, Nantes.
- Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9, 1–38.
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G., Pruzzo, C., 2012. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *ISME J* 6, 21–30.
- Von Scheibner, M., Dörge, P., Biermann, A., Sommer, U., Hoppe, H.-G., Jürgens, K., 2014. Impact of warming on phyto-bacterioplankton coupling and bacterial community composition in experimental mesocosms. *Environ Microbiol* 16, 718–733.
- Winder, M., Cloern, J.E., 2010. The annual cycles of phytoplankton biomass. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 3215–3226.

Annexe 1. Cycle d'élevage en Charente-Maritime

Pratiques culturelles en mytiliculture	
Janvier	Fin de la récolte des moules de bouchots
Février	Pose de cordes pour le captage de naissain lors de la grande marée
Mars	Pose de cordes pour le captage de naissain lors de la grande marée / remplacement des pieux
Avril	Pose de corde de captage de naissain lors de la grande marée / catinage sur les pieux pour éviter la perte de paquets de jeunes moules
Mai	Reproduction des moules / début de la récolte des moules de cordes
Juin	Début de la récolte des bouchots / pose des cordes de naissains sur les pieux vides
Juillet	Récoltes des bouchots / ensemencement (suite ?)
Aout	Récolte des bouchots, les cordes posées ont recouvert les pieux. On retire les « pelisses » de naissain pour ne laisser sur le pieu qu'une couche de jeunes moules. L'excédent est mis dans un filet tube « boudin », qui est enroulé sur d'autres pieux vides
Septembre	
Octobre	
Novembre	
Décembre	Récolte des moules / début du remplacement des pieux usés

d'après <http://www.durivaud.com/index.html>

Annexe 2 : Organismes pathogènes des *Mytilidae*

Tableau 11. Organismes pathogènes (listés à l'OIE) détectés chez des *Mytilidae* et hôtes chez lesquels ils ont été décrits ; Adapté de Webb, 2007

Pathogen	Overseas host
<i>Bonamia ostreae</i>	Many ostreids (IFREMER 1998; OIE 2000; Diggles <i>et al.</i> 2002; Raidal <i>et al.</i> 2004). Figueras Robledo (1994) found that <i>Bonamia ostreae</i> does not infect <i>Mytilus galloprovincialis</i>
<i>Bonamia exitiosa</i>	<i>O. angasi</i> (OIE 2006)
Microcell-like organism	<i>M. edulis</i> (Figueras <i>et al.</i> 1991)
<i>Haplosporidium tumefaciens</i>	<i>M. californianus</i> (Taylor 1966; Sprague 1970; VPS 2000; BA 2002)
<i>Haplosporidium</i> sp.	<i>M. edulis</i> (Figueras <i>et al.</i> 1991; Burreson & Ford 2004), <i>Mytilus</i> spp. (Bower 2001a)
haplosporidian	<i>M. galloprovincialis</i> (Comps & Lopez-Gomez 1992)
<i>Minchinia</i> sp.	<i>M. galloprovincialis</i> (Comps & Tigé 1997; VPS 2000; Burreson & Ford 2004)
<i>Marteilia sydneyi</i>	<i>Saccostrea glomerata</i> (Diggles <i>et al.</i> 2002)
<i>Marteilia refringens</i>	<i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> . (Pérez Camacho <i>et al.</i> 1997; VPS 2000; BA 2002). <i>M. edulis</i> (Hine 1996; Diggles <i>et al.</i> 2002). <i>M. galloprovincialis</i> (Fuentes <i>et al.</i> 1995; Robledo & Figueras 1995; Villalba <i>et al.</i> 1997, 1993; Bower 2006a)
<i>Marteilia maurini</i>	<i>M. galloprovincialis</i> (Comps <i>et al.</i> 1982; Bower 2006a). <i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> (Zrnčić <i>et al.</i> 2001).
<i>Marteilioides chungmuensis</i>	<i>C. gigas</i> , <i>Saccostrea echinata</i> (Diggles <i>et al.</i> 2002)
<i>Marteilia</i> sp.	<i>M. galloprovincialis</i> (Zrnčić <i>et al.</i> 2001). <i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> (Longshaw <i>et al.</i> 2001)

Tableau 12. Organismes pathogènes (non listés à l'OIE) détectés chez des *Mytilidae* et hôtes chez lesquels ils ont été décrits

Pathogen	Host
Viruses	Disseminated haemic neoplasia – viral cause?
	<i>M. edulis</i> (Elston <i>et al.</i> 1988a; Elston <i>et al.</i> 1988b; Bower 1989; Kent <i>et al.</i> 1989; Elston 1990; Noel <i>et al.</i> 1991). <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> , <i>M. trossulus</i> , <i>M. chilensis</i> (Ciocan & Sunila 2005; Bower 2006b). <i>Mytilus trossulus</i> (Gee <i>et al.</i> 1994). <i>Mytilus</i> sp. (Moore <i>et al.</i> 1991). <i>M. edulis</i> x <i>M. galloprovincialis</i> hybrids (Fuentes <i>et al.</i> 2002). <i>Mytilus edulis</i> (Cosson-Mannevy <i>et al.</i> 1984; Green & Alderman 1983; Rasmussen 1986b). <i>M. edulis</i> (Rasmussen 1986a)
Bacteria	Neoplasia (Barber 2004)
	Digestive epithelial virosis: picorna-like virus associated with granulocytomas
	<i>Nocardia crassostreae</i> (Pacific oyster nocardiosis)
	Gill rickettsiae
	Intestinal rickettsiae, gill bacteria
	Digestive rickettsiae
	<i>Rickettsia</i> -like and <i>Chlamydia</i> -like Organisms
	Prokaryotic inclusion bodies (PIB)
	Intracellular rickettsiae and chlamydiae
	<i>Rickettsia</i> -like organisms (RLO) of digestive gland
	Prokaryotic inclusions: gill and digestive gland
Protozoa	<i>Ancistrum mytili</i>
	<i>Chytridiopsis (Steinhausia) mytilovum</i> .
	<i>Conchophthirus mytili</i>
	<i>Crebricoma carinata</i> , <i>C. kozloffii</i>
	<i>Gargarius gargarius</i>
	<i>Gargarius gargarius</i> , and other unidentified
	<i>Sphenophrya</i> -like ciliates
	Gregarines: <i>Nematopsis schneideri</i> , <i>Nematopsis legeri</i> , <i>Nematopsis</i> spp., <i>Porospora galloprovincialis</i> , <i>Porospora gigantea</i> etc.
	<i>Nematopsis legeri</i>
	<i>Nematopsis schneideri</i>
	<i>Isocomides mytili</i>
	<i>Mytilophilus pacifica</i>
	Intracellular Rhynchodid-like Phyllopharyngea ciliates
	<i>Peniclostoma mytili</i>
	Protistan in digestive ducts
	<i>Pseudoklossia semiluna</i> n. sp.
	kidney coccidia including <i>Pseudoklossia semiluna</i> n. sp
	<i>Raabela helensis</i>
	<i>Steinhausia</i> sp. (Lee <i>et al.</i> 2000)
	Other ciliates
	Gill ciliates
	Digestive ciliate
	Intracellular ciliates in digestive tubules
Copepoda	<i>Modiolaria gracilis</i>
	<i>Mytilicola intestinalis</i> (Hockley 1951)
	<i>Mytilicola orientalis</i>
	<i>Pseudomyicola spinosus</i>
	<i>Myicola</i> sp.
	<i>Edotea magellanica</i>
	<i>Modiolicola bifidus</i>
	<i>Ostrincola similis</i>
	<i>Anthessus mytilicolus</i>
	<i>Lichomolgus unicus</i>
	<i>M. edulis</i> (Fenichel 1965; Figueras <i>et al.</i> 1991). <i>M. edulis</i> , <i>Mytilus</i> spp. (Bower 2001b). <i>M. edulis</i> (Teia dos Santos & Coimbra 1995). <i>M. galloprovincialis</i> (Rayyan <i>et al.</i> 2006). <i>M. galloprovincialis</i> (Jones & Creeper 2006; Villalba <i>et al.</i> 1997). <i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> (Sprague 1970; Bower 1992). <i>Mytilus</i> spp. (Hillman 1991; Comtet <i>et al.</i> 2004; Bower 2007). <i>M. edulis</i> (Figueras <i>et al.</i> 1991). <i>M. edulis</i> (Teia dos Santos & Coimbra 1995)
	<i>M. edulis</i> (Fenichel 1965)
	<i>Mytilus</i> spp. (Bower & McGladdery 2001c)
	<i>M. edulis</i> , <i>M. trossulus</i> , <i>M. galloprovincialis</i> (Bower & McGladdery 2001a)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Sprague 1970)
	<i>M. edulis</i> (Sprague 1970)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Kinne 1983)
	<i>M. californianus</i> (Antipa & Dolan 1985; Bower 1992)
	<i>M. edulis</i> , <i>M. trossulus</i> , <i>M. galloprovincialis</i> (McGladdery & Bower 2002)
	<i>M. edulis</i> (Fenichel 1965; Bower 1992)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Villalba <i>et al.</i> 1997)
	<i>Mytilus</i> spp. (Desser <i>et al.</i> 1998)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Villalba <i>et al.</i> 1997). <i>M. edulis/galloprovincialis/trossulus</i> (Bower 2001c)
	<i>M. edulis</i> (Fenichel 1965)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Jones 1997)
	<i>M. edulis</i> , <i>Aulacomya atra</i> (Cremonete <i>et al.</i> 2005)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Villalba <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. edulis</i> (Figueras <i>et al.</i> 1991)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Villalba <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. californianus</i> (Caceres-Martinez <i>et al.</i> 1996, Caceres-Martinez, Vasquez-Yeomans 1999)
	<i>M. galloprovincialis</i> (Robledo <i>et al.</i> 1994a, c; Fuentes <i>et al.</i> 1995; Villalba <i>et al.</i> 1997; Canestri Trotti <i>et al.</i> 1998; Rayyan <i>et al.</i> 2004). <i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> . Bower (2001d; BA 2002). <i>M. edulis</i> (Dare 1977)
	<i>M. edulis</i> (Bernard 1969). <i>M. trossulus</i> , <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> , <i>M. californianus</i> , <i>M. crassitesta</i> (Bower 1996a)
	<i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. californianus</i> (Caceres-Martinez <i>et al.</i> 1996). <i>M. edulis</i> (Pregenzer 1983) <i>Mytilus</i> sp. (Humes 1968)
	<i>M. edulis</i> (Pregenzer 1983)
	<i>M. chilensis</i> (Jaramillo <i>et al.</i> 1981; Cremonete <i>et al.</i> 2005)
	<i>M. edulis</i> (Teia dos Santos & Coimbra 1995)
	<i>P. viridis</i> (Lin & Ho 1999)
	<i>P. viridis</i> (Lin & Ho 1999)
	<i>M. edulis</i> (Pregenzer 1983)

Annexe 3 : Chronologie des épisodes de mortalités de moules sur le littoral français depuis le début du 20^{ème} siècle

Les principales causes de mortalités de moules, depuis le début du 20^{ème} siècle, sont présentées dans le Tableau 13 par ordre chronologique, puis regroupées en classes (principales causes évoquées) (Tableau 14).

Dans cet ensemble d'épisodes de mortalités, répertoriés en France et en Hollande⁸, d'intensité plus ou moins forte, certains sont clairement rapportés à une cause météorologique. D'autres sont liés à des compétiteurs spatiaux envahissant (ver *Polydora ciliata*) ou au copépoïde parasite (*M. intestinalis*). Pour *Mytilicola intestinalis*, son apparition en Allemagne vers 1930 a entraîné des vagues de mortalité un peu partout en Europe du Nord, dans les élevages de moules et sur les gisements sauvages. Des pratiques culturelles adaptées ont pu ensuite permettre de limiter l'impact de ce parasite sur les élevages, malgré sa présence actuelle, endémique dans de nombreuses régions de France. Enfin, à part les mortalités du début du 20^{ème} siècle, dont on ne connaît pas la cause, il semble que ce soit la première fois qu'une maladie d'origine infectieuse (vibrioses impliqués) touche la mytiliculture du nord de l'Europe depuis son essor au début du 20^{ème} siècle.

On peut classer ces mortalités en plusieurs catégories :

- ✚ des mortalités non expliquées sur les parcs de Hollande au tout début du 20^{ème} siècle.
- ✚ des mortalités à *Mytilicola intestinalis* à partir de l'Allemagne, de 1930 jusque dans les années 80 (Baie du Mont St Michel).
- ✚ des problèmes de compétition « drastique » liée au ver : *Polydora ciliata* (dont les effets sont plus limités dans le temps et dans l'espace). Compétition spatiale dont l'emprise sur les élevages peut induire des mortalités localement fortes.
- ✚ des mortalités induites par des conditions climatiques extrêmes. Bien que non répertoriées de façon systématique par les auteurs, ces derniers évoquent le climat comme le « principal ennemi » du mytiliculteur depuis le début du 20^{ème} siècle⁹.
- ✚ les mortalités de 2014 « vibrio-dépendantes » (liées à un ou des ? organismes pathogènes du groupe *Vibrio splendidus*) (Travers *et al.*,2015) en interaction avec l'environnement.

⁸ Il y a d'autres pays concernés par des mortalités liées à *Mytilicola intestinalis*, en Angleterre, en Allemagne (entre 1930 et 1950), au cours de son expansion.

⁹ Par exemple, la destruction des moulières très réputées d'Isigny (Calvados) au cours d'une terrible tempête en 1923, fut à l'origine de la mytiliculture en parcs à plat dans cette région de Basse Normandie (d'après Lambert et Faideau , 1929).

Tableau 13. Principaux épisodes de mortalités massives de moules rencontrés dans les régions mytilicoles Françaises

années	lieu	causes évoquées	référence auteurs	commentaires
1901, 1902, 1908, 1915, 1918	Hollande	mortalités non expliquées	Lambert, 1935	« Années noires »
1949 (automne) - 1950 (printemps)	Hollande	<i>Mytilicola intestinalis</i> (<i>M.int.</i>)	Korringa et Lambert, 1951 ; Meyer et Mann, 1951	Apparition du parasite en 1949 et invasion massive en 1950
1960-1962 1961-1962 (avril - mai)	Baie de l'Aiguillon	<i>M. int</i> + pratiques culturale + état physiologique post ponte	Brienne, 1964 Marteil, 1976	50% de mortalité (perte de 3-4000 tonnes) 30-90% de mortalités
1961-1962 (septembre)	Baie de l'Aiguillon	<i>M. int</i> + pratiques culturale + fortes températures	Marteil, 1976	30-90% de mortalités massives dans le Pertuis Breton (selon les sites)
1962-1963	Hollande	<i>Polydora ciliata</i> + hiver rigoureux	Korringa, 1963	Compétiteur dont le développement a été brutal et intense
1970-1985 1981-1984	Baie du Mont St Michel	<i>Mytilicola intestinalis</i>	Gérard, 2002	Production affectée environ 60% de baisse de production
années 80	Pertuis Breton / Esnandes	rejets anthropiques (?)	Dardignac, 1996	Mortalité sur les moules adultes au printemps
1985	Picardie (baie de Somme)	hiver très rigoureux	Ropert et Olives, 2002	30 à 50% de mortalité (selon professionnels)
1989-91	Pertuis Breton	conditions climatiques estivales fortes températures et vents	Dardignac, 1994	Mortalité de naissain en émerision. Déficit de captage
1996	Baie de Somme/ Quend plage	hiver rigoureux & <i>Polydora ciliata</i>	Ropert et Olives, 2002	80% (perte ~800 tonnes)
2001 (printemps)	Baie de Somme/ Quend plage	Reprise du phénomène	Ropert et Olives, 2002	
2003	Pertuis Charentais (Breton et Antioche)	Fortes températures estivales	Robert et Le Moine, 2003	46 à 63% selon les secteurs
2014	Pertuis Breton	organisme(s) pathogène(s) dont le groupe <i>Vibrio splendidus</i>	Bechemin <i>et al.</i> , 2015	55 à 100% de mortalité selon les sites
2014	Pertuis d'Antioche	idem	Bechemin <i>et al.</i> , 2015	20 à 50% de mortalité selon les sites
2015	Baie de Bourgneuf	idem		50 à 100% de mortalité sur les élevages
2015	Baie de Bourgneuf	idem		95% à 100% de mortalité sur les gisements

Tableau 14. Mortalités de moules en Europe du Nord¹⁰. Regroupement en « classes » (principales causes évoquées)

Principale cause évoquée	Dates	Ampleur des mortalités	Lieu
inexpliquée	Entre 1901 et 1918	Très fortes	Hollande
<i>M. intestinalis</i>	De 1930 à 1985 (par périodes selon les régions)	30 à 90 %	France et Europe
<i>Polydora ciliata</i> sp	1962-63 1996 et 2000-2001	Jusqu'à 100 %	Hollande Baie de Somme
Hydroclimat	Années 80 1985 1989-91 2003	30 à 50 %	Pertuis Breton Baie de Somme Pertuis Breton Pertuis Breton et ?
Bactéries du groupe <i>V. splendidus</i>		25 à 100 %	Charente maritime, Vendée, Loire atlantique *

*d'autres régions plus septentrionales sont « ponctuellement » touchées en 2015 du fait probable de transferts de cheptels.

¹⁰ Non exhaustif

Annexe 4 : Mortalités « anormales » : quels niveaux de base ?

Il est très **difficile de quantifier les mortalités de moules** dans le cadre des pratiques mytilicoles car les cultures ont lieu en « milieu ouvert », souvent sans protection ; le décrochage des moules peut survenir à différents stades de l'élevage et selon les conditions météorologiques ; la disparition des coquilles est rapide chez la moule¹¹.

Face aux difficultés de mesurer des effectifs dans les élevages professionnels et du fait des pratiques culturelles propres à la filière moule, les scientifiques ont mis en place depuis les années 1990 des « paniers » permettant des mesures de mortalités sur les sites mytilicoles. **Les réseaux** ont comme principal objectif de comparer les traits de vie des moules à partir d'un même lot distribué sur le littoral français. Précurseur du réseau MYTILOBS, le réseau **Remoula** (2000-2011) a permis d'établir une base de connaissance sur les mortalités : « normales », « moins fréquentes » et « anormales » qui servent directement l'expertise des mortalités 2014-2015. Trimestriel, avec un échantillonnage de fin d'hiver, durant le mois de mars (2014), le réseau sous estimait les mortalités massives en mars 2014 dans le Pertuis Breton.

Sur les bouchots

Les informations sur les « pertes » de moules sur pieux de bouchots proviennent essentiellement de deux secteurs mytilicoles : les Pertuis Charentais-vendéens et la baie du Mont Saint Michel (Tableau 15). Dans les Pertuis Charentais, les mesures des années 80 font état de « pertes » comprises entre 35 et 80% (Dardignac, 1996). Au-delà de un an, la « perte » serait d'environ 75% (Dardignac, 1996 ; Boromthanarat et Deslous-Paoli, 1988). Aujourd'hui, la « perte » calculée entre la mise en place d'un boudin de naissain au cours de l'été (naissain de 1,5 à 2,0 cm de long sur cordes de coco¹²) et la pêche l'année suivante (été) serait d'environ 82% à 86% (Mille, com. pers ; études 2013-2014). Ces pertes sont en partie liées aux pratiques culturelles et en partie à des mortalités (maladie, prédateurs, ...). En lien avec les pratiques culturelles, et après remembrement de la baie du Mont St Michel, les pertes au cours d'un cycle de grossissement peuvent varier de moins de 10% à 35% selon la charge initiale de 3500 ou 5500 moules par mètre de corde (Tableau 15) (Mazurié *et al.*, 2005).

Ainsi ces données de référence issues de deux régions mytilicoles montrent que la **perte de moules, au cours d'un cycle d'élevage est comprise entre 25% et 85%**. Elle dépend, en partie, du mode de gestion adopté par les professionnels. Ces pertes « numériques » sont en fait « sans conséquences » pour les professionnels si la croissance supplée la perte et que la production par pieu reste satisfaisante (rendement biologique). Sur le plan écosystémique, la compétition inutile de 85% de moules en cours de croissance reste une aberration et signale une gestion à améliorer.

¹¹ Le carbonate de calcium de la coquille de moule est sous forme d'aragonite (orthorhombique), tandis que chez l'huître, il est sous forme de calcite (carbonate de calcium rhomboédrique) (Robert et Bédier, 2013)

¹² A partir du moment où le naissain est de couleur noire, il est susceptible de bien supporter le cycle d'élevage (résistance, accroche, ...)

Tableau 15. Mesures de mortalités sur pieux de bouchots mytilicoles dans Pertuis Breton (Dardignac 1996 ; Mille 2013) et dans la baie du Mont Saint Michel (Thomas 2004 ; Mazurié et al. 2005).

Date	durée/saison	lieu	pertes	références
1979-80	11 mois (juil-juin)	Pertuis Breton	64-75 % de pertes	Dardignac, 1996
1985	4 mois (juil-nov)	Pertuis Breton	35-80 % de pertes	Dardignac, 1996
1987	4 mois (juil-nov)	Pertuis Breton	68-73 % de pertes	Dardignac, 1996
2004	12 mois	Baie du Mont St Michel	25 % de perte sur pieux (après restructuration)	Thomas , 2004 (d'après Mazurié et al., 2005)
mars 2004 - Janv. 2005	10 mois	Baie du Mont St Michel	si pieux à 5500 moules/m 35% de perte	Mazurié et al., 2005
mars 2004 - Janv. 2005	10 mois	Baie du Mont St Michel	si pieux à 3500 moules/m moins de 10%	Mazurié et al., 2005
mars 2004 - Janv. 2005	10 mois	Baie du Mont St Michel	environ 12% de mortalité chez les professionnels (1 an de suivi).	Mazurié et al., 2005
2013-2014	18 mois	Charente Maritime	82-86% de perte	D. Mille, com. Pers (CREAA)

Le suivi du captage sur cordes réalisé depuis 2006 par le CREAA¹³ a lieu aux Saumonards (au nord de Boyard) (Geay et Mille, 2007). Entre 2007 et 2012, la survie du naissain capté sur corde chute entre mai et (juin-juillet) d'environ 60000 à 30000¹⁴ ind/ml (perte de 50%). En 2013 et 2014 les pertes atteignent 80-90% durant la même période (d'après CREAA 2012, 2013).

En paniers

Depuis les années 90, les scientifiques ont développé des structures expérimentales¹⁵ permettant d'enfermer des petites populations de moules dont l'effectif est suivi au cours d'un cycle d'élevage (Dardignac, 1996 ; Barillé, 1996 ; Robert et al., 2001; Mazurié et al., 2001 et 2005, Blin et al., 2004). Cette pratique sert encore aujourd'hui de support, au réseau MYTILOBS à l'échelle de la France (Robert et Bedier, 2013) et au réseau Remoulnor de basse Normandie (Blin, 2010).

¹³ CREAA : Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole. Résultats présentés et synthèse réalisée à partir des bulletins 2011, 2012, 2013, 2014 et 2015 du CREAA : « Suivi de la Reproduction et du Captage de la moule *Mytilus edulis* en Charente maritime en 2011 » (idem 2012, 2013 et 2014).

¹⁴ Cette baisse de densité des moules s'explique probablement par la compétition naturelle qui s'opère sur les cordes au cours de la croissance.

¹⁵ Construites le plus souvent à partir de poches ostreicoles traditionnelles

Le système des paniers permet l'estimation des mortalités. Il représente assez fidèlement la croissance des moules du pieu mais sous-estime la mortalité, en particulier celle liée aux prédateurs (Mazurie *et al.*, 2001). Il sous-estime aussi les « pertes » liées à des conditions météorologiques difficiles (coup de vent, tempête, ...), à une surcharge en cheptels, etc.

Sur un cycle d'élevage de 9 à 18 mois, les taux de mortalité obtenus à partir des paniers expérimentaux sont compris entre 5 et 100% (Tableau 16) :

- ✚ La mortalité atteint 100%, en 2014 dans le Pertuis Breton.
- ✚ La mortalité atteint 83% sur certains sites en Basse Normandie où les prédateurs (bigorneaux perceurs) sont nombreux.
- ✚ En 2012, le réseau MYTILOBS enregistre deux épisodes de mortalités estivales en Bretagne Sud (Pont Mahé : 51%) et en Bretagne Nord (Le Vivier : 29%) sans que les causes soient clairement identifiées (Robert et Bédier, 2012).
- ✚ hormis ces mortalités « extrêmes » en partie explicables, les taux de mortalité sont compris entre 5% et 25% (Tableau 16).

Tableau 16. Mesures de mortalités en paniers sur des bouchots mytilicoles dans Pertuis Breton (Dardignac, 1996) ; dans les Pertuis Charentais (Robert *et al.* 2001) ; dans la baie du Mont Saint Michel (Mazurié *et al.* 2001) ; sur le littoral Cotentin (Blin *et al.* 2004 ; Blin 2010) et sur les côtes de France (Robert et Bédier 2013 ; Robert *et al.*, 2014). Aux valeurs en « gras » sont associées des causes spécifiques de mortalités.

période	site(s)	nombre de sites	nombre et durée des cycles d'élevage	mortalité	auteurs
1988 à 1994	bouchots du Pertuis Breton	4	7 cycles de 9 mois	9 à 19%	Dardignac, 1996
2000 à 2001	bouchots de la Baie de Vilaine (5 sites) et filières (1 site) (REMOULA/ Charente Maritime)	4	1 cycle de 12 mois	15 à 25%	Mazurié <i>et al.</i> , 2001
2000-2010	bouchots et filières des côtes Françaises (réseau MYTILOBS)	6	6 cycles de 12 mois puis 6 cycles de 15 mois	2 à 15%; moy. 8,6%	Robert <i>com.pers</i>
2012	bouchots et filières des côtes Françaises (réseau MYTILOBS)	4	1 cycle de 9 mois (mars à décembre)	9%, 10% 29%, 51%	Robert et Bédier, 2013
2003-2004	bouchots de la côte du Cotentin (réseau REMOULNOR)	7	1 cycle de 12 mois	4 à 30%	Blin <i>et al.</i> , 2004
2004-2007	bouchots de la côte du Cotentin (réseau REMOULNOR)	7	3 cycles de 12 mois	10 à 83%	Blin, 2010
2014	bouchots et filières de Charente Maritime (réseau MYTILOBS)	3	1 cycle de 18 mois	47 à 100%	Robert <i>et al.</i> , 2014
2014	autres sites de bouchots du réseau MYTILOBS	2	1 cycle de 18 mois	~ 5%	Robert <i>et al.</i> , 2014

Les séries historiques les plus fournies sont celles enregistrées entre 1988 et 1994 par Dardignac (2004) et dans Remoula entre 2000 et 2010 (Robert, com.pers) dans les Pertuis Charentais (Tableau 16). Les médianes respectives de 12,1 % et 7,0 % ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre (Kruskal Wallis ; $t = 3,092$ et $p = 0,07865$) (Figure 26). La prise en compte des deux séries permet de comparer 16 années de mesures entre 1990 et 2001.

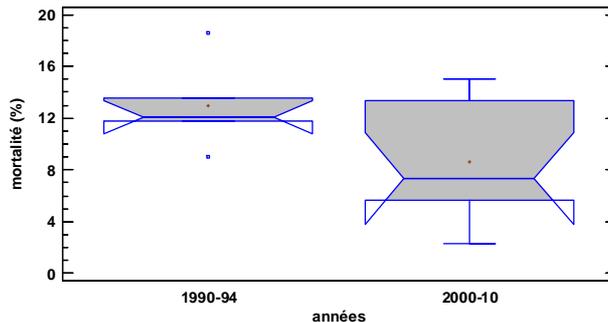


Figure 26 : Comparaison des mortalités mesurées dans les Pertuis Charentais entre 1990 et 1994 (Dardignac, 2004) et entre 2000 et 2010 (d'après Robert, com.pers). Entre 1990 et 1994 : 15 stations sur Aiguillon et Marsilly. Entre 2000 et 2010, 3 stations (Filières W, Aiguillon et Boyard)

La représentation en « boîte à moustaches » (Figure 26) permet une classification en valeurs : « normales » (comprises dans la « boîte »), « moins fréquentes » (dans les moustaches) et « exceptionnelles » (hors de la « boîte à moustaches »).

Dans le cas des mortalités de moules en paniers, les mortalités « normales », sur un cycle d'élevage, sont inférieures à 12,5 %. Les valeurs moins fréquentes sont comprises entre 12,5 et 15%

Annexe 5 : Chronologie des principaux constats et signalements de mortalités de moules (gisements et élevages)

Tableau 17. Chronologie des principaux constats et signalements de mortalités
(S) indique une saisine Repamo (DDTM → Ifremer)

Date	Constats et signalements de mortalités	Source
5 fév. 2014	<u>1^{er} signalement</u> de mortalités anormales de moules sauvages sur tables ostréicoles de la Fosse de Loix (Charente maritimes / Pertuis Breton)	Professionnels → DDTM
18 fév 2014	<u>Signalement</u> de mortalité sur bouchots en <u>rade de Brest</u> (naissain) (S1)	?
Février 2014	Signalement de mortalités (50%) sur un seul secteur de bouchot, dans le fond de la <u>rade de Brest</u> (têtes de pieux)	CRC PL
9-12 mars 2014	Signalements de mortalités massives sur le site des filières du PB et dans les bouchots du nord-ouest du PB	Professionnels → DDTM
Durant mars 2014	Extension des mortalités à tout le PB (<u>signalements</u>)	Professionnels → DDTM
mars 2014	<u>Signalement</u> que le pertuis d'Antioche n'est pas touché	→ journaux
29 mars 2014	<u>Signalement</u> de mortalités de moules sur des filières en <u>rade de Brest</u> (S7)	?
(?) avril 2014	<u>Signalement</u> de mortalités sur les bouchots de la côte Ouest de Noirmoutier	Ifremer (HP)
17 avril 2014	<u>Constats</u> de mortalités dans le Pertuis Breton (filières & bouchots du nord-ouest du pertuis)	DDTM ₈₅ /Ifremer (SR, JG)
(?) avril - mai 2014	<u>Signalement</u> de mortalités sur les gisements intertidaux de <u>St Gilles Croix de Vie</u> (30 ^{aine} de km au sud de Noirmoutier) (S?)	particuliers → DDTM
(1?) mai 2014	<u>Signalement</u> de mortalités sur le secteur de Paillard (gisement) de la côte Ouest de Noirmoutier (S10-11)	particuliers → DDTM
14 mai 2014	<u>Signalement</u> de mortalités de moules sur le gisement en eau profonde de <u>Barfleur</u> (nord-est Cotentin) (alors que pas de mortalité lors des <u>constats</u> de mars 2014 - visites de gisements)	CRC Basse Normandie
16-18 juin 2014	<u>Signalement</u> de mortalités sur la moulière intertidale d'Englesquevilles la percée (proche de <u>Grandcamp</u>) (Normandie / Calvados) (S12)	Ifremer (JN)
12 aout	<u>Signalement</u> de mortalités de moules sur le gisement en eau profonde de <u>Grandcamp</u> (sud-est Cotentin) (S13)	Profession
Septembre-octobre	<u>Signalements</u> de mortalité sur les moules de bouchots de Maison Blanche (baie de Bourgneuf) (S14)	
5-25 nov. 2014	Trait de chalut à perche de 1,2 mile sur moulière située entre l'embouchure de la Charente et Boyard → 960 kg de moules sur = meilleurs résultats depuis 2007 (<u>mesures</u>)	Ifremer (YC)
? déc. 2014	<u>Signalement</u> de faibles mortalités de moules dans le secteur du Fiol (Nord de la Baie de Bourgneuf)	Ifremer (HP)
12 janv 2015	<u>2^{ème} signalement</u> de mortalités de moules sauvages sur tables ostréicoles de la pointe de Groin (Fosse de Loix en Ré) (épisode 2015)	Profession → DDTM
16 janv.	<u>Signalement</u> qu'il n'y a plus de moules sur les gisements du	Profession

2015	pertuis d'Antioche	
14,15 et 28 janv. 2015	<u>Constats</u> : Visite de gisements de moules dans le pertuis d'Antioche (Lamouroux, Juliard et Barrat); très peu de moules	DDTM ₁₇
8 janv. 15	<u>Signalement</u> de mortalités sur les gisements naturels (inter et subtidaux) de plusieurs secteurs de la baie de Bourgneuf (S15)	Profession
(?) janvier 2015	<u>Signalement</u> de mortalités sur les gisements naturels de moules de <u>Paillard</u> sur la cote ouest du Cotentin.	?
20 Janv. 2015	<u>Signalement</u> : Très peu de moules vivantes sur Rivedoux (île de Ré) « en comparaison avec l'année dernière »	Ifremer (PP)
(?) janvier 2015	<u>Signalement</u> de mortalités de moules sur <u>Pen Bé</u> (nord de la Loire et sud de la Vilaine) (bouchots ?)	Ifremer (HP)
Janvier - mars 2015	<u>Signalements</u> de cheptels au « comportement anormal » (fatigue physio, décrochement) dans les Pertuis Charentais	Profession
(?) mars 2015	<u>Constats</u> de mortalité (++) sur les 4 gisements profonds de la cote est-Cotentin (<u>Barfleur, Reville, Ravenoville et GrandCamp</u>)	CRC Basse Normandie
Avril 2015	Séries de <u>saisines</u> dans le nord-Vendée (S15 à S20)	DDTM → Ifrem
22 juin 2015	Signalement de mortalités sur les gisements profonds de l'est-Cotentin (S24)	
? avril 2015	<u>Signalement</u> de mortalités sur les Roulières (nord-ouest du PB)	Profession
21-23 avril 2015	<u>Constats</u> de mortalités dans le nord-Vendée (Bourgneuf et Noirmoutier)	DDTM ₈₅
13-17 juillet 2015	<u>Signalement</u> de mortalités sur les filières de <u>Trévors</u> (Finistère Nord)	Profession
17 sept. 2015	<u>Signalement</u> de mortalité chronique à la <u>Plaine sur mer</u> et en Vendée	Profession
12 oct. 2015	<u>1^{er} Signalement</u> de mortalités de naissain 2015 dans le Pertuis Breton et en Baie de Bourgneuf	Ifremer (JN)
13 oct. 2015	<u>Signalement</u> de mortalités en baie des Veys (Normandie/calvados)	Ifremer (JN)
13 oct. 2015	<u>Signalement</u> de mortalité sur les filières de Chausey (Normandie / ouest Cotentin)	Profession
oct. 2015	<u>Signalement</u> de reprise de la mortalité en baie de Bourgneuf	SMEL (PG)
28 oct. 2015	<u>Signalement</u> de mortalité sur les filières de Lannion (Bretagne / côtes d'Armor)	Profession
28 oct. 2015	<u>Signalement</u> de recrudescence de mortalité à la Plaine sur mer (Pays de Loire /Loire Atlantique) (S28)	Profession
30 nov. 2015	<u>Constats</u> de mortalités dans le Pertuis Breton (filières) & bouchots au nord-ouest du Pertuis Breton	DDTM ₈₅ /Ifremer (SR)
Nov. déc. 2015	<u>Signalements</u> de recrudescence des mortalités de moules	Profession
11 déc. 2015	<u>Saisines</u> sur du naissain 2015 dans le nord Vendée (S27, S30)	DDTM → Ifrem
Oct-déc. 2015	Premiers <u>signalements</u> de mortalités anormales sur les filières du Pertuis Breton	Profession
14 déc. 2015	Premiers <u>signalements</u> de mortalités anormales sur les filières du Pertuis Breton	Profession
29 déc. 2015	<u>Signalement</u> de mortalités anormales sur le Fiol (nord baie de Bourgneuf)	Profession

Annexe 6 : Matériels et méthodes

1. Objectif 1 : Regard sur 15 années

1.1. Sites

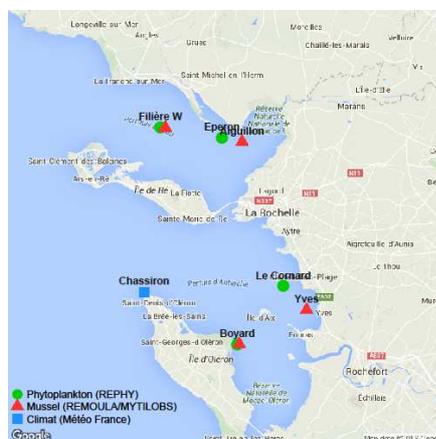


Figure 27 : Carte du site d'étude et stations de mesures

1.2. Jeu de données

- Taux de mortalité

Les taux de mortalités sont issus de suivis des productions conchylicoles dans les Pertuis Charentais réalisés dans le cadre de différents projets : le projet REMOULA financé au cours du temps par les Sections Régionales Conchylicoles (devenues Comités Régionaux) de Ré et de Marennes-Oléron et la Région Poitou-Charentes ainsi que le projet MYTILOBS financé par le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture).

Dans ce cadre, des lots de 120 moules calibrées et mises en poche sont déployés sur différents secteurs des Pertuis Charentais (sur filière ou sur bouchot) (Robert *et al.*, 2015). Chaque trimestre pour chaque station, une poche prélevée permet de compter le nombre d'animaux vivants. Un taux de mortalité est alors calculé sur la base des résultats de comptage et du nombre d'individus déployés initialement par poche ($n=120$).

- Données climatiques

Les températures atmosphériques et les précipitations sont issues des messages internationaux d'observation en surface (SYNOP) circulant sur le système mondial de télécommunication (SMT) de l'Organisation Météorologique Mondiale (OMM). La Station de Météo France "Chassiron" (Latitude : 46.046833 ; longitude : -1.411500 ; référence : 07314) est prise en compte dans les analyses qui suivent. Les données brutes, tri-horaires, du SYNOP ont été agrégées à la journée : médiane et écart-type pour les températures et cumul et écart type pour les précipitations.

- Flores micro-phytoplanctoniques

Les séries d'abondances phytoplanctoniques ont été collectées dans la base de données Quadrigé de l'Ifremer. Les données de flore micro-phytoplanctonique sont issues du Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines REPHY.

Les dénombrements floristiques sont réalisés (deux fois par mois à partir d'échantillons d'eau de mer fixés avec une solution de lugol) suivant la méthode de Utermöhl (Utermöhl, 1958). La procédure utilisée pour l'identification des taxons dans le cadre du REPHY permet d'identifier le phytoplancton au plus bas niveau taxonomique (au mieux au niveau de l'espèce) sous réserve que sa taille et certains détails soient appréciables par microscopie optique: globalement cela concerne le phytoplancton de taille > 20 μm (Belin et Neaud-Masson, 2012).

Outre les taxons phytoplanctoniques pris en compte dans le cadre du REPHY, certains ciliés (phylum des *Ciliophara*) sont considérés notamment pour leur caractère mixotrophe. Dans le travail qui suit, ces taxons sont confondus avec l'ensemble du micro-phytoplancton.

1.3. Indices de diversité

A partir de ces données d'abondance par taxon, deux indices de diversité sont calculés sur la base des taxons agrégés au niveau du genre. Les taxons de niveau supérieur (famille, ordre,...) sont regroupés au sein d'un groupe indifférencié dit "Autre".

La richesse générique (generic richness, S), qui désigne le nombre de taxons présents dans l'échantillon, est pondérée par le nombre totale de cellules observées (sur la base du centile 10 de l'ensemble des observations) pour limiter les biais d'échantillonnage : concept de raréfaction (Gotelli et Colwell, 2001 ; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2013).

Le second indice de diversité, l'équitabilité (equitability) qui renseigne sur la régularité de distributions entre les genres présents (de 0 à 1, respectivement très différent à identique) est calculé à partir du rapport de l'indice de Shannon (H') et du logarithme de la richesse générique (S) : équitabilité de Pielou (J) (Jost, 2010).

1.4. Analyse de données

Les intervalles de confiance des taux de mortalité de moules ont été calculés par la méthode Logit, méthode adaptée pour toute proportion avec $n \geq 50$ (Scherrer, 2007).

A partir des taux de mortalité, un partitionnement des années a été effectué par une procédure de classement hiérarchique ascendante (distance euclidienne et méthode de Ward) s'appuyant sur les résultats d'une Analyse en Composantes Principales (ACP) préalable (Husson *et al.*, 2010). Cette procédure permet de mettre l'accent sur les similarités entre les années aux différentes stations prises en compte.

Issues des données climatiques, des relations linéaires entre les moyennes et cumuls, et les écarts ont été établies au moyen de régressions linéaires simples accompagnées de leurs intervalles de confiance à 95%.

L'existence de tendances sur les séries chronologiques des indices de diversité a été déterminée par des tests de Mann Kendall réalisés sur les séries désaisonnalisées par la méthode Loess (Grosjean et Ibanez, 2004).

L'analyse triadique partielle (PTA) réalisée sur les variables environnementales (climat et diversité) a permis de discriminer graphiquement les années en intégrant la variabilité des mois de février à mai ; En effet, la PTA s'appuie sur un cube de données formé ici par une matrice années*variables répétée pour chaque mois pris en compte. Cette analyse se déroule en 3 étapes : (1) l'inter-structure qui établit le lien existant entre les mois et diagnostique leur importance relative, (2) le compromis qui exprime la structure commune des différents mois, et (3) l'intra-structure qui fournit une description détaillée

des écarts par rapport au compromis pour chaque mois. Thioulouse Chessel (1987) et Thioulouse *et al.* (2004) fournissent une description détaillée de cette analyse. Seule l'analyse du compromis est utilisée dans le travail qui suit.

Enfin, un positionnement multidimensionnel, de type non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS), a été effectué à partir de matrices de distance des abondances relatives du micro-phytoplancton (méthode dite de "Bray-Curtis" d'après Legendre et Legendre, 2012) pour identifier des regroupements taxinomiques et observer leurs dynamiques. Un espace à deux dimensions a été privilégié pour faciliter l'interprétation : ce choix a été validé par les valeurs de Stress, se situant dans une gamme de valeurs associée à une bonne qualité de représentation (Stress <0.1 d'après Clarke, 1993).

Les représentations graphiques et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels R (R development Core Team, 2014).

2. Objectif 2, partie 4.1 Dispositif mis en place et échantillonnage

2.1 Animaux suivis :

Sur les quatre sites choisis, **des lots de moules sentinelles ont été déployés dès janvier 2015**. Outre un suivi de la mortalité éventuelle à venir, ces animaux constituaient avec ceux du réseau MYTILOBS déployés sur les mêmes sites le matériel biologique permettant de suivre les traits de vie et la qualité des animaux dans le temps.

Des prélèvements réguliers (+ point initial et point final du suivi) ou en cas d'épisodes de mortalités ont été effectués pour chercher à caractériser sur la matrice chair : la flore bactérienne, la qualité cytogénétique, la réponse physiologique (transcriptomique), l'origine génétique, les niveaux de métaux lourds et de contaminants chimiques.

Sur le secteur de Loix, le suivi MORBLEU a fait appel à des moules de la cohorte 2014 identiques à celles du lot du MYTILOBS (animaux triés en taille issus du captage sur corde de bouchots dans les Pertuis Charentais). Elles ont été déployées sur le site dès octobre 2014 (24 sacs de 50 individus soit 1200 moules réparties en 3 poches, placées sur les tables à huîtres RESCO). Faute de stock suffisant sur le lot MYTILOBS déjà déployé depuis septembre 2014, le lot sentinelle pour les trois sites, Filière, Eperon et Boyard a été constitué à partir de moules «sauvages» collectées sur une bouée dans l'estuaire du Lay (3/12/14). Ces animaux ont été échantillonnés et triés en taille. Ils sont considérés comme appartenant très majoritairement à la cohorte 2014. Ils ont été placés dans des paniers accrochés suspendus à 2 mètres de profondeur sous des bouées. (Tableau 18).

2.2 Suivi des mortalités de moules

Le contrôle et l'évaluation des niveaux de mortalité dans les paniers a été réalisé sur site à l'occasion des visites bimensuelles pour MORBLEU et mensuelles pour le MYTILOBS. Un dénombrement des moules vivantes et mortes était réalisé, les coquilles vides retirées. L'utilisation de paniers à mailles serrées permet de conserver sans perte les coquilles des moules mortes afin d'estimer la mortalité entre deux dates. Si des moules mortes ou moribondes présentaient encore des chairs non dégradées, un prélèvement d'animaux était réalisé à des fins d'étude des organismes pathogènes.

Tableau 18. Caractéristiques initiales des lots de moules déployés sur les 4 sites MORBLEU

Origine des lots de moules suivis	Cohorte	dates de déploiement	Site suivi	conditionnement et support	nombre initial d'animaux
Captage sur corde sur bouchot d'Yves	2014	06/10/2014	Loix en Ré	24 sacs de 50 individus répartis en 3 poches, sur les tables à huîtres RESCO, site découvrant à BM	1200 moules
Captage sauvage sur bouée du Lay	2014 majoritaire + 2013 (?)	19/01/2015	Filière W, Eperon, Boyard	3 paniers par site avec 100 individus par panier. Paniers suspendus sous bouée, immersion permanente	2 x 100

2.3 Dispositifs de mesures et de prélèvements in situ

Afin de i) disposer d'un accès permanent (non tributaire des marées) aux dispositifs de mesures et aux lots de moules suivis à des fins de contrôle et d'échantillonnage ; ii) disposer de mesures continues *in situ* en haute fréquence à l'aide de sondes multi-paramètres (O₂, Température, Salinité, turbidité) ; iii) disposer d'une immersion permanente pour permettre le déploiement d'échantillonneurs passifs des contaminants de la colonne d'eau, seul l'équipement de bouées ancrées pouvait répondre à cet enjeu. Grâce à la collaboration de la Direction des Phares et Balises de la Rochelle et la Section Régionale Conchylicole (SRC-17), il nous a été permis d'équiper 3 bouées leur appartenant.

Un dispositif commun aux trois bouées destiné à supporter via une chaîne prise sur un bord de la bouée, l'accrochage sub-surface (-1m) d'une cage inox contenant des membranes d'échantillonneurs passifs (POCIS et SPMD) capables d'intégrer les contaminants hydrophyles ou lipophiles de la colonne d'eau ; plus bas (-2m) 3 mini paniers contenant chacun 100 moules. (Figure 28A)

La bouée cardinale Filière W (P&B) équipée d'une sonde multi-paramètres haute fréquence reliée à un émetteur GSM permettant la transmission quotidienne des données. Ce dispositif particulier n'a été déployé que sur ce site. Il permet d'éditer automatiquement un bulletin quotidien des données brutes à destination des acteurs du projet (email) pour informer ou alerter sur les fluctuations environnementales observées sur le site. (Figure 28B)

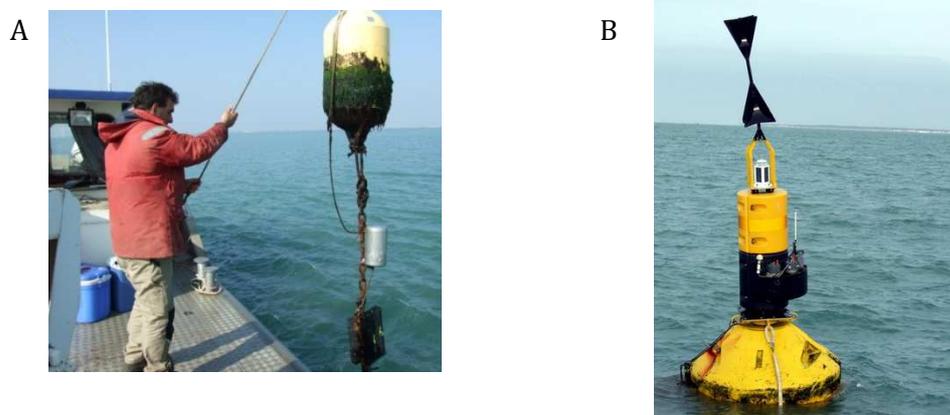


Figure 28 : A) bouée «G10 -SRC-17» marquant le sud du secteur des bouchots de l'Eperon, on distingue la cage inox et les paniers sur la chaîne ; **B) bouée cardinale Filière W (P&B)**, on distingue l'antenne et les batteries de l'émetteur GSM ainsi que la chaîne du dispositif.

3. Objectif 2, partie 4.3 Contexte environnemental

3.1. Sites d'étude

Les sites d'études équipés permettant des mesures haute fréquence sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19. Coordonnées des stations de mesures à haute fréquence d'acquisition

Station	Lon E WGS84	Lat N WGS84
Filière W	-1.375467	46.273729
L'Eperon	-1.24376	46.263479
Boyard	-1.200971	45.978756

3.2. Jeu de données

- Mesures hydrologiques

Les masses d'eau des trois stations de Morbleu 2015 ont été suivies *in situ* grâce aux déploiements de sondes multi-paramètres (de type YSI 6600 et EXO2) de février à juillet 2015. Ces appareils ont permis de mesurer la température, la salinité, le pourcentage de saturation en oxygène et la turbidité à haute fréquence d'acquisition (10 mn), ensemble de paramètres correspondant de descripteurs classiques de masses d'eau.

Pour limiter l'impact du biofouling sur la qualité des données (source potentielle de dérives de mesures), des rotations régulières de sondes ont été effectuées : mensuelles voire bi-mensuelles à l'approche de la période estivale. Chaque sonde utilisée a été vérifiée (étalonnage et conformité) avant et après chaque déploiement. Les données ont ainsi pu être qualifiées puis validées, voire dans certains cas invalidées sur la base de constats métrologiques.

Des données plus anciennes de température et de salinité acquises dans les mêmes conditions (*in situ* à haute fréquence d'acquisition) ont servi pour contextualiser l'étude ; ces données sont issus de travaux élaborés dans le cadre de l'action "SAPERCHAIS" du projet "Développement Durable de la Pêche et de la Conchyliculture dans les Pertuis Charentais" associé au Contrat de projets Etat-Région Poitou-Charentes 2007-2013 (Guesdon et al., 2015).

3.3. Dates de début des épisodes de mortalité de moules observés en 2014 et en 2015

Dans le cadre du projet Morbleu 2015, un ensemble d'informations relatives aux mortalités de moules de 2014 et de 2015 a été traité et analysé (cf 12.3.2 Les mortalités : Constats, mesures, signalements et saisines); Les résultats de ces traitements et analyses ont permis d'estimer des fenêtres temporelles de début de mortalité, notamment à la station Filière, site d'intenses mortalités tant en 2014 qu'en 2015. Ainsi dans le travail qui suit, les plages de temps suivantes sont considérées comme les périodes de début d'épisode de mortalités sur ce secteur :

Tableau 20. Périodes estimées de début de mortalité sur le secteur des Filières du Pertuis Breton

Année	Début	Fin
2014	01/03/2014	15/03/2014
2015	06/04/2015	20/04/2015

3.4. Analyse de données

Les séries temporelles de température et de salinité (issues de mesures *in situ* à haute fréquence d'acquisition) ont été régularisées par interpolation linéaire avant d'être désaisonnalisées par la méthode LOESS (Grosjean et Ibanez, 2004). Des lissages de type LOESS ont été appliqués à ces séries désaisonnalisées pour illustrer les tendances : tendances déterminées par des tests de Mann Kendall.

Les 3 principales dates de ruptures de la série temporelle de salinité ont été identifiées grâce à un algorithme de bisection basée sur la mesure de divergence entre les distributions de deux sous ensembles de données (méthode non paramétrique décrite dans James et Matteson (2013)).

La mise en évidence d'éventuelles différences significatives entre les distributions de séries temporelles a été réalisée, d'une part avec le test de Mann-Whitney pour la comparaison de deux séries (températures 2014 et 2015 aux périodes estimées de mortalités), et d'autre part avec le test de Kruskal-Wallis pour plus de deux séries comme pour la comparaison des séries temporelles de descripteurs hydrologiques pour les 3 stations. Lorsqu'une différence significative a été déterminée grâce à ce dernier test, une comparaison multiple (Giraudoux, 2011) a été réalisée de manière à identifier les similitudes ou les différences entre les séries.

Les représentations graphiques et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels R (R development Core Team, 2014).

4. Objectif 2, partie 4.5 Environnement abiotique

4.1. Nutriments

Pour appréhender les variations spatiotemporelles des nutriments sur les trois stations étudiées, des prélèvements discrets d'eau de mer en sub-surface ont été réalisés tout au long de la campagne de suivi en se référant aux protocoles de la DCE (DIRECTIVE 2000/60/CE dans les eaux littorales). Le calendrier des campagnes est présenté dans le tableau ww (Tableau 4 : dates des campagnes à la mer MORBLEU-2015, p42)

L'échantillonnage de l'eau de mer pour aborder l'environnement abiotique a été réalisé au travers de 16 campagnes à la mer sur les trois sites, Filière W, l'Eperon et Boyard. Les prélèvements sur site ont été réalisés à partir du bateau à pleine mer +/- 1h, flaconnages spécifiques dédiés, prise de mesures physiques sub-surface (Température, salinité, O₂). Pour un site et une date, systématiquement 2 prélèvements d'eau (EDM) constituant les échantillons étaient réalisés à savoir : EDM Métaux (1.0L), 1 flacon stérile spécial, EDM Sels Nutritifs (2L) flacon. Les prélèvements d'eau pour les sels nutritifs étaient réalisés à 1 mètre sous la surface au moyen d'une bouteille NISKIN 5L. Les opérateurs portaient des gants jetables au cours de ces opérations.

Le prélèvement d'eau pour **les métaux dissous**, suivait en tous points les recommandations des protocoles du ROCCH pour ce descripteur (2 opérateurs, gants spéciaux, perche à prélèvement en bois, rinçage des flacons, etc...). Cependant pour ce paramètre, le flaconnage a été fourni par le laboratoire qui a eu la charge des analyses des métaux dissous. A chaque retour de marée, les différents prélèvements en flacon étaient conservés dans des glacières dédiées jusqu'au retour à terre. Les flacons destinés à l'analyse des métaux étaient immédiatement apportés au laboratoire d'analyses sous-traitant (Laboratoire LCA- AUREA de la Rochelle, laboratoire accrédité COFRAC pour les méthodes et analyses des métaux cibles sur la matrice eau de mer). Traités dès leur arrivée, chaque flacon était acidifié et rapidement filtré sur 0.45µm. L'échantillon était alors congelé jusqu'à l'analyse globale de l'ensemble des prélèvements pour les métaux dissous et le COD (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sb, Ba, Hg, Pb).

Les flacons destinés à **l'analyse des nutriments** étaient traités au laboratoire LERCP de l'Houmeau. Brièvement, l'échantillon d'eau était filtré sur 0.2µm. Une fraction destinée à l'analyse des silicates était conservée à +4°C, le reste pour les nitrite-nitrate, phosphates, ammonium, était congelé. L'ensemble des analyses de nutriments a été réalisé par le laboratoire LERMPL Ifremer de Nantes, accrédité COFRAC pour ces méthodes. Les analyses ont été réalisées sur des analyseurs automatiques.

4.2. Polluants chimiques

Moules sentinelles : Des moules de différentes origines et d'âge différent ont été échantillonnées à plusieurs temps au cours du projet, notamment au début et à la fin, sur nos sites suivis. Les contaminants recherchés sur ces animaux (matrice chair de moule) étaient soit les métaux lourds (Cd, Hg, Cr, Pb, Zn, analyses sous-traitées au laboratoire agréé Cofrac LCA -AUREA de la Rochelle) dosés par Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) soit les contaminants chimiques (Pesticides organochlorés, organophosphorés, PCB, herbicides divers, analyses sous-traitées au laboratoire agréé

LASAT de la Rochelle). La collecte et le conditionnement des échantillons de moules ont été réalisés au LERPC de la Tremblade en suivant les prescriptions des procédures du ROCCH et de la DCE (Claisse, 2007). Les échantillons ont été conservés congelés jusqu'à l'analyse.

Les échantillonneurs passifs de contaminants de la colonne d'eau : POCIS et SPMD

Les **POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)** sont des échantillonneurs passifs intégratifs utilisés pour le suivi des **contaminants hydrophiles** ($1 < \log K_{ow} < 4$) comme les pesticides, les substances pharmaceutiques, les détergents, les stéroïdes, les hormones, etc. Les POCIS permettent d'échantillonner la fraction dissoute et donc a priori disponible pour les êtres vivants de ces contaminants sur des périodes de temps de plusieurs semaines. Cet outil permet d'accéder la concentration moyenne des contaminants sur la durée totale de l'exposition. Les POCIS sont composés d'une phase absorbante solide emprisonnée entre deux membranes de polyéthersulfone (PES). Ces membranes présentent des diamètres de pores de 0.1 μm permettant le passage des contaminants vers la phase adsorbante. Afin d'améliorer l'aspect quantitatif de l'échantillonnage par les POCIS l'approche PRC (Performance Reference Compound) a été utilisée. Des composés de référence et de performance (PRC) ont été introduits dans les POCIS avant leur exposition. Les PRC sont des molécules non interférentes, isotopiquement substitués dont la désorption durant la période d'exposition permet de calculer un taux d'échantillonnage *in situ*. Une seule molécule PRC est utilisée en routine la DIA d_5 (déisopropyl-atrazine d_5). Ce PRC a été validé en eau de mer par le Laboratoire de chimie EPOC LPTC d'Hélène Budzinski, Université Bordeaux 1. C'est ce laboratoire qui a fourni les membranes pour l'ensemble du projet et qui assurera les analyses en soustraction. Pour les trois sites, Filière W, Eperon, Boyard, tous les 15 jours en moyenne une cage contenant 2 membranes vierges a été immergée. Le traitement et le conditionnement des membranes exposées a été assuré par le LERPC de la Tremblade selon les recommandations des protocoles AQUAREF.

Les dispositifs SPMD (semipermeable passive sampling device) sont des échantillonneurs passifs intégratifs *in situ* qui ont la propriété d'adsorber les contaminants organiques hydrophobes ($\log K_{ow} > 3$, hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP, polychlorobiphényles PCB, pesticides organochlorés OCP). Ils contiennent comme les POCIS un cocktail de molécules de référence pour permettre une estimation quantitative du taux d'échantillonnage. Ces membranes ont été fournies par le laboratoire Exposmeter. Elles ont été exposées dans le même temps et les mêmes conditions que les POCIS. L'analyse de ces membranes exposées a été confiée au laboratoire Exposmeter en Suède.

5. Objectif 2, partie 4.6 Environnement biotique

5.1. Echantillonnage de l'eau de mer

L'échantillonnage de l'eau de mer pour aborder l'environnement biotique bactérien et phytoplanctonique a été réalisé au travers de 12 campagnes à la mer sur les trois sites étudiés, Filière W, l'Eperon et Boyard. Nous avons respecté les conditions énoncées dans le cahier de procédures du REPHY (Ifremer, 2012) pour nos démarches, à savoir brièvement : prélèvement sur site à pleine mer +/- 1h, flaconnages spécifiques dédiés, prise de mesures physiques sub-surface (Température, salinité, O₂).

Pour un site et une date, systématiquement 6 prélèvements d'eau (EDM) constituant les échantillons étaient réalisés à savoir :

- 1) EDM communautés bactériennes cultivables (2L) bidon stérile B,
- 2) EDM communautés planctoniques (ADN) (4L) bidon stérile C,
- 3) EDM communautés planctoniques en Cytométrie de flux (3 x 3ml, cryotubes)
- 4) EDM communautés phytoplanctoniques REPHY (2 x 1L), 1 flacon clair, 1 flacon brun.
- 5) EDM pour l'analyse des sels nutritifs (2L) bidon D
- 6) EDM pour l'analyse des métaux dissous (1L)

Les autres prélèvements d'eau étaient réalisés à 1 mètre sous la surface au moyen d'une bouteille NISKIN 5L. Les opérateurs portaient des gants jetables au cours de ces opérations. L'eau destinée aux flacons B, C, D était pré filtrée directement au dessus du flacon sur maille de 100µm, pour éliminer le gros particulaire. Les différents prélèvements en flacon étaient conservés dans des glacières dédiées jusqu'au retour de marée au laboratoire.

Pour l'étude des **flores par cytométrie en flux**, dès le prélèvement des flacons B, C, D, une opération particulière était réalisée pour collecter et fixer les échantillons (protocole *SOMLIT*, 2015). A partir de chaque flacon B, C, D, 3 x 3 ml était prélevés à la pipette et transférés dans un cryotube contenant 0.3ml de glutaraldéhyde 25% (Applichem), fixateur puissant. Après agitation, ces tubes étaient mis au noir 15 minutes, agités de nouveau, puis au noir 15 minutes. De retour au laboratoire, ces **échantillons fixés étaient stockés à -80°C**, jusqu'à l'analyse en cytométrie.

L'analyse des échantillons collectés en 2015 pour l'approche cytométrie en flux a été réalisée en collaboration avec C. Lambert (CNRS- UMR 6539 LEMAR) à Brest. Les protocoles mis en œuvre ont été réalisés selon les prescriptions du cahier de procédure *SOMLIT* version 2015 et sur la base des travaux de Marie *et al.*, 2014. Sur un appareil de type FacsVerse, les paramètres (FL1/FL2/FL3 SSC/ FSC) ont été réglés pour permettre l'acquisition de données sur des communautés du pico et nanoplancton et particulièrement celles des *Synechococcus* et des Cryptophytes. Des calibrations spécifiques avec des billes ont été opérées pour pouvoir créer 3 sous classes de taille au sein du nanoplancton présent dans les échantillons (2-6 µm, 6-10 µm, > 10µm). L'analyse a porté sur un des 3 tubes du triplicat de chaque date et site.

L'eau collectée pour l'examen du phytoplancton par le REPHY était traitée au laboratoire LERPC de l'Houmeau, le jour même ou le lendemain de la marée selon la procédure standard de lecture (Grossel, 2010 ; Neaud-Masson, 2015). Les données de lecture de ces échantillons REPHY étaient archivées dans la base de données Quadrigé2.

5.2. Des filtrations spécifiques

Pour aborder les études des communautés bactériennes cultivables, les flores bactériennes et phytoplanctoniques en suspension dans l'eau il a été nécessaire de concentrer ces organismes sur des membranes filtrantes, qui constituent ensuite l'échantillon à traiter. Ainsi, dès le retour au laboratoire, chaque prélèvement d'eau respectif est filtré de manière séquentielle sous conditions stériles. Ce travail de filtration doit se réaliser au plus dans les 20h qui suivent le retour de mer. Il a été réalisé au laboratoire LERPC de l'Houmeau dans un espace dédié, avec du matériel décontaminé (ADN) et stérile.

5.3. Extraction des ADN totaux à partir des membranes filtrantes

Pour pouvoir réaliser l'amplification de séquences de gènes cibles par PCR, il est nécessaire de disposer d'ADN en quantité suffisante et en qualité optimale. Les ADN totaux ciblés sont principalement présents à l'intérieur des cellules filtrées piégées sur les membranes filtrantes.

Les laboratoires participants à cette approche n'ayant pas l'expérience antérieure de protocoles optimisés pour l'extraction des ADN totaux procaryotes et eucaryotes sur différents types de filtres à partir d'échantillons d'eau de mer en vue d'amplification par PCR, un travail préliminaire conséquent de mise au point et d'optimisation a dû être réalisé. Il s'est agi à travers la littérature récente de trouver des protocoles proches de nos conditions (filtres nitrocellulose et polycarbonate) (Bostrom et al., 2004, Weinbauer et al., 2002, Urakawa et al., 2010, Alvez Junior et al., 2015). Un protocole basé sur une extraction Phénol-chloroforme a été posé comme une référence dans notre test comparatif. Il est basé sur une adaptation du protocole d'Urakawa avec une modification du tampon de lyse (ajout de Protéinase K et SDS 10%).

Par ailleurs, des kits d'extraction d'ADN commerciaux sont disponibles aussi pour ces approches et nous avons choisi d'en tester deux différents, le Mobio PowerWater DNA isolation kit (Sassoubre et al., 2015) et le kit Nuclisens. Avant toute étape de lyse des cellules, une étape d'extraction et de fragmentation des membranes filtrantes a fait l'objet d'une optimisation. Pour ce test, nous avons comparé le broyage des filtres sous agitation avec différents calibres de billes, de différentes qualités.

5.4. Constitution des pools de filtres pour extraction des ADN totaux

La turbidité forte des échantillons collectés dans les pertuis nous a contraint de devoir utiliser un nombre important de filtres, notamment pour la porosité de 8 μm et pour les filtres en polycarbonate qui colmatent plus rapidement que les filtres nitrocellulose. Dans les faits il est arrivé fréquemment après une saturation trop rapide des filtres en PC, que l'on réalise la filtration du volume restant avec des filtres NC. En moyenne sur les 12 campagnes pour la porosité 8 μm et le filtre en PC, il aura fallu 6 filtres à Filière W, 11 à L'Eperon et 8 filtres à Boyard, pour traiter 4 litres (NB : les filtrations réalisées pour la flore bactérienne cultivable ont uniquement fait appel aux filtres en NC, moins sujet au colmatage). Cette situation nous a obligés à réaliser pour chaque date, chaque site, chaque porosité (8 ou 0.2 μm), chaque type de filtres (PC ou NC), la constitution préalable de pools à partir de tous les filtres utilisés pour filtrer les 4 litres.

Par ailleurs, pour évaluer les effets combinés du niveau de turbidité, de la porosité et du type de filtre sur : le rendement d'extraction ADN, la qualité des acides nucléiques extraits et la qualité d'amplification obtenue après PCR (inhibiteurs), une étude spécifique a été réalisée. Ses résultats devaient aider au choix du type d'échantillon et des échantillons à sélectionner pour l'analyse finale de la collection. Brièvement, un échantillon d'eau de mer hors de la série, à 10 NTU et 1.5 NTU de turbidité, a été filtré en conditions identiques et à volume égal sur des filtres PC ou NC, avec 8 ou 0.2 µm de porosité. Des pools de tiers-filtres ont été réalisés à partir des filtres obtenus pour chaque condition. Au final, trois pools identiques par condition ont permis de tester les trois protocoles d'extraction d'ADN retenus pour l'essai (Mobio PowerWater®, Nuclisens®, Phénol-Chloroforme modifié).

5.5. Extraction des ADN à partir des filtres

A l'issue des différents tests précédemment décrits un protocole optimisé a été sélectionné pour cette étude. A titre de contrôle de process et de qualité, un blanc d'extraction (filtres vierges) a été réalisé dans les mêmes conditions pour être inclus comme un échantillon témoin dans toutes les étapes jusqu'au séquençage final.

5.6. Choix des gènes cibles et des amorces pour l'amplification par PCR

Pour explorer la diversité bactérienne des prélèvements d'eau recueillis au cours des campagnes MORBLEU, le choix du gène 16S rDNA a été retenu, avec une paire d'amorces ciblant la région V3-V4, spécifique des procaryotes.

Pour le compartiment planctonique eucaryote, selon la littérature (Stoeck et al., 2010, Pawlowski, 2012, Massana et al., 2015) et les échanges avec Laure Guillou du MNHN de Roscoff (PELGAS, Biomarks), il a été retenu de cibler la région V4 du gène 18S rDNA. Ce choix permet d'avoir une séquence plus résolutive et la disponibilité de plus de références dans les banques de séquences dédiées au plancton (Guillou et al., 2013).

Séquences des amorces avec adaptateurs P5 et P7 (en italique) préconisés pour le séquençage MiSeq. Illumina par la plateforme Inra de Toulouse, GenoToul. Ces amorces ont été commandées à la société Eurogentec (Seraing, Belgique).

- Séquences des amorces pour V3-V4 16S (amplicon 460 pb hors amorces)

Forward (42 pb) PCR1F_460 5' *CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG*

Reverse (47 pb) PCR1R_460 5' *GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAAT-CCT*

- Séquences des amorces pour V4 18S (amplicon 380 pb, hors amorces)

Forward (48 pb) V4F_380 5' *CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGCASCYGGGTAATTCC*

Reverse (46 pb) V4R_380 5' *GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTTCGTTCTTGATY-RA*

5.7. Optimisation des PCR 16S et 18S

Bien que la littérature soit riche en protocoles d'amplification de ces régions, des étapes d'optimisation sont indispensables pour s'adapter aux conditions du laboratoire (LGP2M à la Tremblade, appareillage, réactifs) et de l'étude (origine et nature des échantillons). Nous avons comparé et testé deux kits de mix PCR utilisant deux Taq polymérases différentes, MolTaq 16S (Molzym) et la Phusion HF DNA (Thermo scientific) et une Taq supplémentaire la Go Taq G2(Promega).

Les essais d'optimisation ont permis de retenir pour chaque PCR un protocole spécifique et bien adapté pour obtenir des amplicons en quantité et de taille requise, 380 et 460pb pour le 18S et le 16S respectivement.

Les 50 ADN extraits des filtres ont donc été ensuite amplifiés selon ces conditions optimisées pour les deux régions ciblées. Les 100 amplicons obtenus ont été contrôlés par migration sur gel d'agarose 1% (mono bande). Deux échantillons qui serviront de témoins négatifs des réactions, 1 blanc de PCR 16S et 1 blanc de PCR 18S ont été réalisés à partir d'eau MilliQ. Ils seront incorporés dans le projet de séquençage comme contrôles.

Cette première étape d'amplification ciblée avec incorporation d'un demi-adaptateur Illumina aux amorces est désignée PCR1. Les produits obtenus ont été déposés (50 µl > 30ng/µl) dans des plaques PCR 96 puits, filmées et congelées.

5.8. Projet de séquençage haut débit des amplicons par la technique MiSeq® Illumina sur la plateforme de séquençage du GenoToul (Toulouse) pour permettre l'approche en metabarcoding

Cette étape a été en grande partie sous traitée par l'équipe Get-PlaGe, INRA Auzeville a Castanet-Tolosan. Deux agents Ifremer y ont participé (novembre 2015). Ce séquençage a utilisé un run 2 x 250pb-cycles avec un kit 2 x 300pb-cycles et un kit chimie V3 MiSeq, afin de réduire le temps de réaction qui 'fatigue' les réactifs. Brièvement ce travail a comporté les étapes suivantes :

- purification des produits de la PCR1 et contrôle qualité des amplicons purifiés par BIOANALYSER DNA.
- PCR2 pour générer des amplicons qui auront intégrés des index (1 index de 6 pb par échantillon), marquage d'identification unique au sein du projet pour permettre l'analyse en multiplexage aux étapes finales.
- purification des produits PCR2 et contrôle qualité des amplicons purifiés.
- dilution de tous les échantillons a une concentration équimolaire (7 nanomolaire) et constitution du pool avec l'ensemble des échantillons, quantification contrôle du pool par qPCR, dilution du pool.
- run de séquençage, kit Illumina 2x300pb pour run de 2x 250pb-cycles (500 cycles, séquençage paired-end).

6. Objectif 5, Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?

6.1. Matériel biologique

Des animaux issus d'un lot de captage naturel (origine cordes du Pertuis Breton) déployé en septembre 2014 sur les 8 sites MYTILOBS, ont été prélevés tous les mois, à raison de **30 individus** par mois, de décembre 2014 à juin 2015. Ces animaux étaient congelés en azote liquide après retrait de la coquille et conservés à -80°C jusqu'au choix des échantillons.

Le Tableau 211 présente les pourcentages de mortalités cumulées enregistrés sur les différents sites et les lots d'animaux ici étudiés. Un suivi temporel sur le site de Filière a été privilégié, avec un point de comparaison pour le mois d'avril avec le site contrasté d'Aiguillon.

Tableau 211 : Mortalités cumulées enregistrées sur les animaux déployés par MYTILOBS et utilisés ici pour l'étude transcriptomique (cases colorées en vert).

			déc-14	janv-15	févr-15	mars-15	avr-15	Mai-15	Juin-15
Pays de Loire	Pertuis Breton	Aiguillon	2%	2%	4%	4%	4%	11%	11%
		Filière	0%	1%	1%	3%	12%	29%	29%

6.2. Mise en poudre et extractions d'ADN pour quantification des bactéries du groupe *Splendidus* et extraction d'ARN totaux

Des broyats de moules entières ont été réalisés en azote liquide (Roescht). Les poudres ont été conservées à -80°C avant d'être utilisées pour des extractions individuelles d'ADN et d'ARN.

Les concentrations en bactéries du groupe *Splendidus* présentes dans les poudres de moules ont été estimées après extraction des ADN totaux grâce au kit QIamp DNA mini de Qiagen, selon les instructions du fournisseur. La quantification des bactéries du groupe *splendidus* a été réalisée par PCR en temps réel dans les thermocycleurs MX3000 et MX3005 (Agilent) en utilisant du Brilliant III Ultrafast kit (Stratagene) selon le 'Standard Protocol' de l'EURL. En parallèle des échantillons, une gamme étalon à partir d'ADN génomique titré de *V. tasmaniensis* (10^8 à 10^1 copie/ml) est réalisée sur chaque plaque. Le Ct (cycle threshold) calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales.

Les extractions des ARNs totaux ont été réalisées à partir une prise d'essai de 100mg de poudre. Ce processus d'extraction se décline en trois grandes étapes, 1) Extraction des ARNs totaux par la méthode Trizol, 2) élimination des possibles contaminations en ADN génomique par la TURBO™ DNase puis 3) purification des ARNs totaux par la méthode direct-zol RNA MiniPrep (ZYmo Research). Les ARNs ont été élués dans 60µl d'eau DNase/RNase free. Leur qualité a été validée au bioanalyseur (Agilent). Les échantillons ont ensuite été poolés (4 pools de 3 individus par temps en condition équimolaire) en fonction des résultats de quantification bactérienne obtenus en qPCR (réalisation de pools orientée).

6.3. Séquençage RNA-seq

Les banques d'ADNc ont été fabriquées à partir de les ARN totaux de 24 échantillons. Ces échantillons d'ARN étaient conformes aux critères de pureté requis ($A260 / A230$ et $A260 / A280 > 1,8$) et le niveau de qualité (RNA Integrity Number RIN > 8) pour préparer une banque d'ADNc pour le séquençage. Les banques d'ADNc ont été construites en utilisant le kit «Truseq ARN v2 Sample Preparation" (Illumina), selon les instructions du fabricant. Les ARNm contenant du poly (A) ont été purifiés en utilisant le poly magnétique (T) des billes de 1-4 ug de chaque échantillon d'ARN totaux. Un tampon de fragmentation a été ajouté pour fragmenter l'ARNm en courts fragments d'une longueur moyenne de 155 pb (120-210 pb). A partir de ces fragments, les premiers brins ont été synthétisés en utilisant hexamère aléatoire amorce et les deuxièmes brins d'ADNc ont ensuite été synthétisés. Après purification et la réparation de l'extrémité, ces courts ADNc ont été ligués à des adaptateurs de séquençage (60 pb de chaque côté) et enrichis par réaction en chaîne par polymérase (PCR, 12 cycles). Une série de fragments d'ADNc de 320 ± 20 pb a été sélectionné à l'aide E-GEL SIZESELECT 2% (Invitrogen). Les 24 banques d'ADNc ont été normalisées puis chargées sur une flow-cell pour y être séquençées sur un appareil de type HiSeq Illumina™ 3000 à Get-Plage (Plateforme Génomique, INRA, Toulouse), en utilisant le kit TruSeq PE Cluster Kitv3 (2 x 150 pb).

6.4. Traitement des données de RNAseq

Les données de séquençage des banques RNAseq sont analysées sous le portail galaxy de l'Ifremer. Le workflow designé pour identifier des gènes différentiellement exprimés est présenté dans la Figure 29. Ce workflow constitue deux étapes majeures dans le traitement des données.

Etape 1 : Construction d'un méta-transcriptome *de novo* chez la moule bleue (MouTon) à partir des données disponibles dans les bases de données publiques et à partir des données issues de nos bibliothèques. Cette étape est nécessaire car actuellement il n'existe pas de génome ou de transcriptome de référence chez la moule bleue *M. edulis*. Il a été identifié un jeu de données disponible et pertinent (Romiguiet *et al.* 2014). L'utilisation de Trinity *de novo* RNAseq permet de construire ce transcriptome de novo, suite à la création de Blueton, une annotation sera réalisée à l'aide de Blast2go et InterproScan afin d'annoter les contigs précédemment construits.

Etape 2 : Cette deuxième étape consiste à aligner toutes les séquences des 24 bibliothèques sur le méta-transcriptome de novo, cet alignement permet de déterminer le niveau d'expression. Une analyse statistique (Deseq2, Love *et al* 2015) de ces résultats aboutit à la sélection de gènes candidats qui seront validés par qPCR.

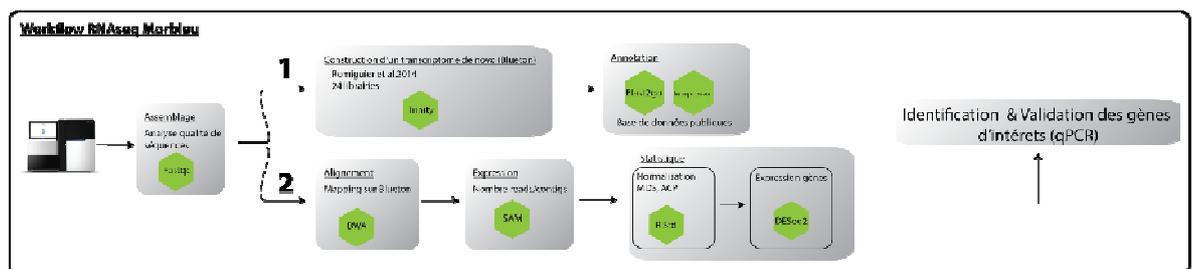


Figure 29: Workflow d'analyse des données de RNAseq comprenant assemblage, alignement, expression, annotation et statistiques