

Département 'Ressources Biologiques et Environnement' RBE
UMR 6539 'Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin LEMAR
Unité 'Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins' PFOM
Laboratoire 'Physiologie des Invertébrés' LPI

Bruno Petton

Ifremer

Qualification zoo-sanitaire du naissain de captage 2013 de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (QUALIF)

Détection précoce des maladies en épreuve thermique de laboratoire

Coordination & rédaction : Bruno Petton
Mars 2015
Convention DPMA-Ifremer 2014 n° 13/1210868 NYF

Qualification zoo-sanitaire
du naissain de captage 2013
de l'huître creuse *Crassostrea gigas*
(QUALIF)

Détection précoce des maladies
en épreuve thermique de laboratoire

Rapport scientifique final de l'action QUALIF
Convention DPMA-Ifremer 2014 n° 13/1210868 NYF

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		date de publication : 30/03/2015 nombre de pages : 27 bibliographie : oui illustration(s) : 11 figures et 6 tableaux langue du rapport : Français
Validé par : Pierre Boudry Adresse électronique : pboudry@ifremer.fr		
Titre de l'article : Qualification zoo-sanitaire du naissain de captage 2013 de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (QUALIF)		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur principal : Petton Bruno Contributeurs : Hugo Koechlin, Jacqueline Le Grand, Isabelle Quéau, Christian Mingant, Dominique Ratiskol, Marianne Alunno-Bruscia	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer, département Ressources Biologiques et Environnement UMR 6539 Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins Laboratoire de Physiologie des Invertébrés	
Cadre de la recherche : Action QUALIF- Convention DPMA-Ifremer 2014 n° 13/1210868 NYF		
Destinataire : DPMA, Ifremer		

Résumé

Depuis 2008, des mortalités massives d'huîtres creuses âgées de moins d'un an sont relevées sur le littoral français dès que la température de l'eau de mer atteint le seuil de 16°C. Ces mortalités de naissains sont associées à la détection du virus OsHV-1 μ Var. Des travaux de qualification zoo-sanitaire menés depuis 2010 ont montré qu'un lot de naissains issus du captage naturel sur deux était infecté par le virus bien avant l'apparition des mortalités dans le milieu naturel, mais qu'*a contrario* les naissains d'écloserie expertisés présentaient une fréquence plus faible de portage latent. Dans ce contexte de crise zoo-sanitaire chronique, l'objectif de notre étude consistait à obtenir une information du statut zoo-sanitaire OsHV-1 μ Var des populations de naissains du captage 2013 à l'échelle nationale. Ce travail avait pour finalité de permettre l'identification précoce des zones de captage associées à un risque de mortalité due à l'infection par OsHV-1 μ Var.

La méthodologie de l'épreuve thermique de laboratoire (ETL) correspond en une période de 1 mois d'isolement des naissains à évaluer en conditions contrôlées de laboratoire. Lors de cette période la température de l'eau de mer est maintenue constante à 21°C et la mortalité est relevée tous les 10 jours. La survie finale associée à des analyses qPCR permettent de qualifier le statut sanitaire en terme de portage OsHV-1 μ Var de l'échantillon (statut infecté ou non infecté). Entre février et mars 2014, vingt et un échantillons de naissains âgés de 5 à 7 mois ont été échantillonnés dans six sites du littoral français (étang de Thau, bassin d'Arcachon, pertuis Charentais, baie de Bourgneuf, baie de Vilaine et rade de Brest) pour être qualifiés par ETL au site expérimental Ifremer d'Argenton.

Les résultats de la campagne 2014 de qualification zoo-sanitaire confirment qu'en période hivernale, dans le milieu naturel, des naissains de captage peuvent être infectés par OsHV-1 μ Var sans développement apparent de maladies ni mortalité. En revanche en ETL, ces lots de naissains infectés par OsHV-1 μ Var présentent des taux de mortalité importants. Ainsi, sur les 20 échantillons de naissains de captage étudiés, onze ont révélé des maladies en ETL avec des mortalités cumulées variant de 16 % à 80 %. Ce ratio d'un échantillon sur deux de naissains infectés par OsHV-1 μ Var demeure proche de celui observé de 2010 à 2013 lors des travaux précédents qui avaient permis de définir l'ETL. Les six sites étudiés ont montré des résultats contrastés. En effet, les résultats se sont révélés favorables pour l'étang de Thau et la baie de Bourgneuf et défavorables dans le cas de la rade de Brest et la Baie de Vilaine. Pour ces deux derniers sites, tous les échantillons de naissains testés ont montré de fortes mortalités pendant l'ETL. Des différences s'observent également intra-site, notamment à Marennes Oléron avec 1 échantillon sur 3 infectés par OsHV-1 μ Var ou dans pour Arcachon avec 3 échantillons sur 5.

Dans le contexte préoccupant de l'épizootie actuelle, nos résultats confirment que certains lots de naissains de captage sont infectés par OsHV-1 μ Var dès les mois de février-mars et pourrait être des acteurs actifs dans le déclenchement annuel du processus infectieux en milieu naturel quand la température de l'eau dépasse 16°C. Par ailleurs, notre étude démontre qu'il serait possible chaque année d'obtenir une qualification sanitaire précoce des zones de captage. Cela permettrait d'améliorer la gestion des risques liés aux transferts de naissains infectés par OsHV-1 μ Var dans les différents bassins de production.

Mots-clés

Huître creuse – Naissain – Survie - OsHV-1 μ Var – Epreuve thermique.

Key words

Pacific oyster – Spat – Survival – OsHV-1 μ Var – Thermal challenge.

Table des matières

1. Introduction.....	7
2. Matériel et méthodes	8
2.1. Naissains 'NSI' témoin.....	8
2.2. Epreuve thermique de laboratoire (ETL)	8
2.2.1. Principe de l'ETL référence	9
2.2.2. Principe de l'ETL simplifiée.....	10
2.3. Sites de prélèvement des naissains de captage.....	11
2.4. Plan expérimental.....	12
2.4.1. Qualification zoo-sanitaire en ETL de référence.....	12
2.4.2. Qualification zoo-sanitaire en ETL simplifiée	13
2.5. Paramètres suivis.....	14
2.5.1. Mortalité des naissains TEST et témoin en ETL	14
2.5.2. Détection d'ADN viral	14
3. Résultats de la qualification zoo-sanitaire	15
3.1. ETL référence	15
3.1.1. Bilan par site.....	15
3.1.2. Synthèse.....	18
3.2. ETL simplifiée.....	20
4. Discussion & conclusions.....	22
4.1. Méthodologie	22
4.2. Statut zoo-sanitaire des naissains à l'échelle nationale.....	23
4.3. Statut sanitaire des naissains des différents sites.....	23
4.4. Bilans quantitatif et qualitatif du captage 2013	24
4.5. Qualification zoo-sanitaire et épizooties.....	24
4.6. Limites et perspectives.....	25
5. Références.....	26

Préambule

L'action QUALIF a bénéficié d'un soutien financier de la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA) pour sa mise œuvre en 2014 ; la DPMA est naturellement associée aux résultats de ce travail.

Les travaux de l'action QUALIF n'ont été rendus possibles que par l'existence du réseau VELYGER et par l'expérience de terrain des acteurs qui ont assuré sa mise en place, puis son développement. Ce réseau a vu le jour en 2008 répondant à une sollicitation du Comité National de la Conchyliculture (CNC). VELYGER, coordonné par l'Ifremer et soutenu depuis 2011 par des fonds nationaux de la DPMA, a pour finalité de mieux comprendre les sources des variabilités de la reproduction de l'huître creuse en terme de recrutement dans les principaux bassins de captage. Ce projet est associé au réseau RESCO (soutenu par la DGAL) en charge de la caractérisation des dynamiques de survie et de croissance de l'huître creuse pour constituer l'Observatoire National de la Conchyliculture. Construit comme une fédération de suivis régionaux, le réseau VELYGER existe grâce à une collaboration avec le Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA en Région Poitou-Charentes), à des prestations avec différents bureaux d'études et à l'investissement des membres des équipes Ifremer des LER à Sète et Arcachon ainsi de ceux du laboratoire PFOM/PI (Brest, Argenton). Il est important de signaler la participation de nombreux professionnels ostréiculteurs pour l'approvisionnement à titre gracieux des naissains à caractériser.

En savoir plus sur le RESCO : http://www.ifremer.fr/observatoire_conchylicole

En savoir plus sur VELYGER : <http://www.ifremer.fr/velyger>



En terme opérationnel, l'action QUALIF a bénéficié en 2014 de l'aide active des acteurs du réseau VELYGER, de l'échelle nationale à l'échelon local. Par ailleurs, la méthodologie de prélèvement des naissains de l'action QUALIF s'est appuyée sur celle du réseau VELYGER, en utilisant les points références VELYGER dans chacune des zones d'étude testées.

La finalité de l'action QUALIF consistait à compléter l'approche quantitative du projet VELYGER par une information qualitative en rapport avec le statut zoo-sanitaire des naissains de captage.

1. Introduction

Avec plus de 22 000 emplois et près de 100 000 tonnes de production annuelle, l'ostréiculture est l'activité aquacole majeure en France. Pourtant, depuis 2008, la filière est mise en difficulté par des épisodes de mortalités qui déciment les populations de naissains sur l'ensemble du littoral français dès que la température de l'eau de mer est supérieure à 16°C (Pernet *et al.*, 2012, Petton *et al.*, 2013). A ce phénomène épizootique annuel, dramatique pour les jeunes huîtres de moins d'un an, s'ajoutent des maladies plus spécifiques aux adultes de taille marchande. Les mortalités du stade naissain, cumulées à celles des huîtres commercialisables, peuvent prendre une ampleur considérable dans les exploitations ostréicoles.

L'épizootie responsable des mortalités de naissains a été associée à l'émergence du virus OsHV-1 μ Var (Segarra *et al.*, 2010). La nature fortement pathogène de ce virus a été démontrée par des infections expérimentales (Schikorski *et al.*, 2011a, 2011b). De même, l'effet néfaste de certaines pratiques culturales sur l'ampleur, le développement et la récurrence du phénomène épizootique a été mis en évidence. Ainsi, de fortes biomasses en élevage et des conditions hydrodynamiques défavorables peuvent être des facteurs d'aggravation de l'infection, avec pour conséquence une augmentation de la mortalité cumulée finale (Pernet *et al.*, 2014, Petton *et al.*, 2015). Le transfert d'huîtres est la pratique la plus à risque en terme zoo-sanitaire par la capacité de vectorisation des pathogènes et/ou des maladies d'un environnement à un autre. En effet, des naissains issus de captage naturel peuvent être infectés par le virus OsHV-1 μ Var en dehors de la période à risque d'apparition des mortalités, quand la température de l'eau de mer est inférieure à 16 °C. Cela a été montré lors des travaux de caractérisation sanitaire menés entre 2010 et 2013 sur le site expérimental Ifremer à Argenton (Petton *et al.*, 2015). Précurseurs de l'action QUALIF, ces travaux ont consisté à réaliser l'étude de 60 échantillons de naissains, dont 30 avaient été produits en écloséries et les 30 autres étaient issus de captage naturel. Ces travaux ont montré que 19 des 30 lots de naissains de captage étaient infectés par OsHV-1 μ Var, contre 1 lot d'éclosérie sur les 30 testés. La présence d'OsHV-1 μ Var, confirmée par qPCR, a été révélée pendant l'épreuve de qualification associée à des mortalités importantes des naissains infectés en comparaison avec des lots témoins non infectés. Ces résultats obtenus en laboratoire lors d'une épreuve de 30 jours, basée sur une élévation de l'eau de mer à 21°C, ont mis en évidence la probabilité de transférer des agents infectieux lors des mouvements de naissains entre les bassins de production.

A partir de ces constats, les objectifs de l'action QUALIF étaient (1) de mettre en œuvre à l'échelle nationale une étude zoo-sanitaire précoce de lots de naissains du captage naturel issus de la saison de reproduction de l'année 2013 ; (2) de rechercher une simplification de l'épreuve de qualification de référence pour faciliter son éventuelle utilisation à plus grande échelle.

Les résultats de ce travail ont d'abord un intérêt potentiel pour la gestion des productions ostréicoles, en amenant des informations qualitatives sur la production de naissains des principaux sites de captage. Dans un cadre épidémiologique, les résultats de l'action QUALIF contribueront à mieux comprendre l'émergence annuelle des mortalités des naissains. Enfin, dans le contexte de crise zoo-sanitaire, l'Etat et les services territoriaux bénéficieront d'éléments de réflexion sur l'évolution des modalités de gestion de la filière ostréicole, dont l'incidence des transferts d'huîtres.

2. Matériel et méthodes

2.1. Naissains 'NSI' témoin

Pour appréhender l'expertise du statut sanitaire des lots de naissains de captage à étudier en milieu contrôlé, il était essentiel de disposer de matériel biologique sain, c'est-à-dire dont on pouvait certifier qu'il n'avait jamais subi de mortalité anormale susceptible de sélectionner des phénotypes ou des génotypes particuliers. Les huîtres survivantes à un épisode de mortalité sont en effet plus résistantes à une seconde infection (Dégremont 2011, Pernet *et al.*, 2012, Dégremont *et al.*, 2013). L'histoire de vie jouant un rôle déterminant sur la survie des naissains, il était important de fixer ce paramètre.

D'autre part, afin de comparer les résultats des épreuves thermiques de laboratoire (cf. section 2.2.) menées à différents moments, il fallait pouvoir disposer de lots d'huîtres «standardisés», c'est-à-dire avec une variance inter-lots (effets génétiques et/ou environnementaux) minimisée grâce à l'utilisation d'un nombre important de géniteurs d'origine sauvage et à la standardisation des conditions d'élevage en milieu contrôlé.

Ces considérations ont été prises en compte lors de la mise en place des productions de Naissains Standards Ifremer (NSI) utilisés comme matériel biologique (Petton *et al.*, 2013 et 2015, Goudenège *et al.*, 2014, Lemire *et al.*, 2014). Au total, 5 000 naissains NSI âgés de 3 à 5 mois ont servi d'animaux en témoin dans le cadre de l'action QUALIF 2014.

2.2. Epreuve thermique de laboratoire (ETL)

Depuis l'émergence du phénomène des mortalités massives d'huîtres creuses, des méthodes officielles pour la détection d'OsHV-1 μ Var et de bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été développées puis transférées par Ifremer/LGPMM (Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins), dans le cadre de ses missions de Laboratoire National de Référence, à un réseau de 9 laboratoires agréés et 13 laboratoires reconnus par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire. Ces méthodes reposent sur la détection d'ADN appartenant à OsHV-1 par PCR (Pépin *et al.*, 2008). En cas de détection d'ADN viral d'OsHV-1 μ Var, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être mesurée et associée au taux de survie du naissain. Elle informe sur l'implication potentielle de l'agent infectieux détecté en cas de mortalité. Les quantités d'ADN de OsHV-1 μ Var supérieures à 10^4 copies mg^{-1} de tissus frais sont le signe d'une réplication active du virus dans l'hôte et témoignent de son action dans le processus morbide. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode située à environ 10^2 copies mg^{-1} de tissus frais. Une limite à la méthode analytique est liée au seuil de détection qui empêche la détection des individus porteurs d'une faible charge en particules virales.

Dans ce projet, nous utilisons une méthode simple de révélation de l'état pathologique du naissain d'huître creuse vis-à-vis d'OsHV-1 μ Var, basée sur l'application d'un choc thermique (Petton *et al.*, 2013, Petton *et al.*, 2015). Cette méthode repose sur les observations de terrain qui suggèrent qu'OsHV-1 est détecté dans les huîtres moribondes suite à une augmentation de la température de l'eau de mer au-dessus de 16°C . L'épreuve thermique de qualification sanitaire en laboratoire (ETL) consiste à immerger les naissains à expertiser dans une eau de mer à une température de 21°C pendant une période de 30 jours. Le taux de renouvellement en eau de mer du bac est le second paramètre clé en ETL, après la température. Il va en effet être déterminant pour la mise en évidence des maladies par le niveau de confinement qu'il va créer dans la structure d'élevage, tout en maintenant un milieu de vie acceptable pour les naissains (ce qui est vérifié par l'utilisation de témoins

sains). La vidange et le nettoyage des structures d'élevage sont effectués à intervalle de 10 jours pendant l'épreuve. Lors de cette opération, les naissains morts des conditions TEST et témoin sont dénombrés puis enlevés de la structure.

Au moment du prélèvement des naissains dans les différents sites de captage, la température de l'eau de mer était inférieure à 14°C. Immédiatement après leur prélèvement, les naissains ont été acheminés vers le site expérimental Ifremer à Argenton par transporteur express, sans immersion en eau de mer depuis leur collecte dans le milieu naturel jusqu'au début de l'ETL. Avant mise à l'eau au laboratoire, les échantillons de naissains ont été nettoyés, pesés et dénombrés.

2.2.1. Principe de l'ETL référence

Lors de l'épreuve, les naissains à étudier dénommés TEST ont été placés en cohabitation avec un lot témoin de NSI (Fig. 1). En lien avec les mortalités relevées et les analyses qPCR, cette cohabitation en ETL permettait de vérifier (1) le statut sanitaire des naissains TEST, et (2) le caractère infectieux des maladies des naissains TEST.



Figure 1 : de gauche à droite, panier avec l'échantillon de naissains TEST (en bas) et son témoin NSI (en haut) en cohabitation organisée dans le cadre de l'épreuve thermique de laboratoire. Début de l'épreuve avec immersion des naissains dans une eau de mer à 21°C pour une durée de 30 jours.

Chaque échantillon de naissains TEST a été réparti dans deux structures d'élevage d'un volume de 50 L en cohabitation organisée avec environ 100 NSI témoin (Fig. 2, photo de gauche). Les bacs étaient alimentés de manière continue en eau de mer (≈ 34 PSU) préalablement filtrée à 1 μm et après passage dans un système d'irradiation par UV. Le débit d'eau de mer des structures était ajusté au premier jour de l'ETL en fonction de la biomasse de naissains dans le bac (TEST et témoin). Le débit relevé variait de 50 à 150 mL min^{-1} selon l'importance des biomasses de naissains mises en épreuve. Il était déterminé lorsque la concentration en oxygène mesurée à la sortie du bac était comprise entre 60 % et 70 % de la saturation. A ce stade, un apport d'air, via un diffuseur poreux, était mis en place pour atteindre, puis maintenir pendant l'ETL, un niveau d'oxygène supérieure à 90 % de la saturation relevée dans l'eau de mer en sortie de bac. La température de l'eau de mer était comprise entre 20°C et 21°C pendant la durée de l'ETL.

Le régime nutritionnel des naissains pendant l'ETL était constitué d'un mélange (distribué à équivalence de biomasse) de *Tisochrysis lutea* (précédemment nommé *Isochrysis affinis galbana* T-Iso, CCAP 927/14, volume et poids cellulaires moyens : 40 μm^3 , 12 pg cell^{-1}) et de *Chaetoceros muelleri* (UTEX LB2658, volume et poids cellulaires moyens : 80 μm^3 , 25 pg cell^{-1}). Les deux micro-algues ont été produites selon une méthode de culture en volumes successifs (batch) en cylindres de 300 L, à une densité cellulaire moyenne comprise entre 5

millions (*C. muelleri*) et 10 millions mL^{-1} (*T. lutea*). La distribution du phytoplancton dans les bacs de conditionnement était continue dans le flux d'eau de mer alimentant les bacs. L'environnement phytoplanctonique dans les bacs a été maintenu entre 1000 et 2000 $\mu\text{m}^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Rico-Villa *et al.*, 2009), et contrôlé par mesure dans l'effluent de sortie du bac à l'aide d'un compteur de particules (Multisizer 3, Beckman Coulter) équipé d'un orifice de 100 μm d'ouverture.

2.2.2. Principe de l'ETL simplifiée

L'ETL dite de référence a été définie en 2010 et optimisée jusqu'en 2013. La méthodologie développée nécessite un équipement complet en terme de moyen d'élevage (bacs, unité de traitement et de chauffage de l'eau de mer, production et distribution continue des algues) plus une production de NSI témoin. Dans l'optique d'un transfert de la méthodologie ETL pour une utilisation par des centres techniques ou des ostréiculteurs, il a semblé nécessaire de rechercher une simplification aussi bien en terme de moyens, qu'en terme de modalités de gestion. La proposition de simplification était basée sur l'hypothèse qu'une simple immersion des naissains TEST dans un volume d'eau de mer à 21°C pendant une période de 30 jours était suffisante pour révéler leur statut zoo-sanitaire.

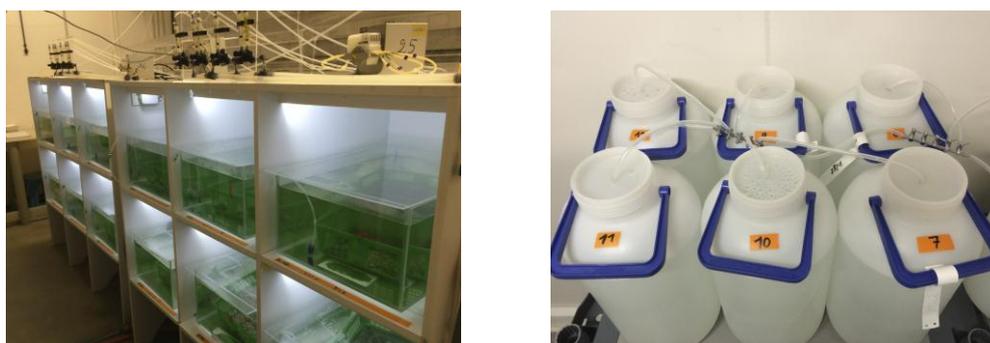


Figure 2 : structures utilisées pour la qualification des naissains, soit des bacs de 50 litres pour l'ETL de référence (photo de gauche,) soit des bidons en matière plastique alimentaire d'un volume de 10 litres pour l'ETL simplifiée (photo de droite).

La méthodologie simplifiée permet de qualifier les naissains TEST mais ne permet plus d'établir le caractère infectieux des maladies révélées lors de l'épreuve car aucun témoin NSI n'est placé en cohabitation. Dans le cadre de l'ETL version simplifiée, chaque échantillon de naissains TEST a été placé dans deux bidons en plastique alimentaire translucide d'un volume unitaire de 10 L (Fig. 2, photo de droite).

En début d'épreuve, 100 à 150 naissains TEST ont été disposés dans chaque bidon. Après la mise en eau des naissains, les bidons étaient fermés par un couvercle percé en son centre d'un trou de 5 mm de diamètre permettant le passage d'un tuyau pour amener l'air jusqu'à un diffuseur. L'aération de l'eau de mer assure le maintien d'une valeur d'oxygène dissous supérieure à 90 % de la saturation pendant les 30 jours de l'ETL. L'eau de mer a été renouvelée tous les 10 jours après un nettoyage à l'eau douce des parois des bidons. Cette opération était mise à profit pour réaliser un bilan de la survie des naissains. La température de l'eau de mer dans les bidons de 10 L a été maintenue entre 20°C et 21°C par l'air ambiant régulé de la salle pendant les 30 jours de l'ETL.

2.3. Sites de prélèvement des naissains de captage

Depuis les années 1970 et l'introduction de l'huître creuse *C. gigas* en France, le captage naturel est la source d'approvisionnement en naissains, principalement à partir des bassins de Marennes Oléron (*e.g.* Geay et Bouquet, 2009) et d'Arcachon (*e.g.* Maurer *et al.*, 2009a). Ces deux bassins ont permis la relance de la culture de l'huître creuse après l'épizootie qui a touché l'huître portugaise à la fin des années 1960. Il faut désormais ajouter à ces deux sites la baie de Bourgneuf, l'embouchure de la Vilaine et la rade de Brest, sites pour lesquels le captage commence à devenir une activité régulière (Pouvreau *et al.*, 2011, 2013). Enfin, l'activité de captage dans l'étang de Thau émerge depuis 3 ans sous l'impulsion du projet régional PRONAMED (Lagarde *et al.*, 2013). Cependant, d'une année à l'autre et d'un secteur à l'autre, la reproduction et le recrutement présentent des performances variables. Pour mieux comprendre les causes de cette variabilité, l'Ifremer a mis en place en 2008 un projet d'envergure nationale sur cette problématique, intitulé VELYGER (Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse sur les côtes françaises). Le réseau VELYGER repose sur le suivi d'une série de descripteurs adaptés sur 5 écosystèmes (Arcachon, Marennes Oléron, baie de Bourgneuf, rade de Brest et étang de Thau) assez espacés sur un plan latitudinal, afin de couvrir une large gamme de conditions hydro-climatiques.

En terme opérationnel, l'action QUALIF s'est adossée à la structure VELYGER en place depuis 2011 sur les 5 écosystèmes étudiés. En plus de ces sites, la baie de Vilaine a été incluse dans QUALIF du fait de l'intérêt de certaines zones de cet écosystème pour l'activité de captage de naissains (Fig. 3). Les résultats du réseau VELYGER en terme de réussite du captage pour l'année 2013 ont révélé une forte variabilité entre écosystèmes. Ainsi, la synthèse des résultats issus du rapport annuel VELYGER (Pouvreau *et al.*, 2014) a montré que pour les 5 écosystèmes étudiés :

- La rade de Brest était caractérisée par un captage modéré à excellent avec des valeurs moyennes variant de 138 à 245 naissains par coupelle.
- La baie de Bourgneuf était caractérisée par un captage faible à nul, avec des valeurs comprises entre 0 et 4 naissains par coupelle.
- Le bassin de Marennes Oléron était caractérisé par un captage modéré, avec des valeurs variant de 25 à 56 naissains par coupelle, avec à signaler de meilleurs résultats pour le secteur Seudre.
- Le bassin d'Arcachon était caractérisé par un captage bon à excellent avec des valeurs, par secteur, comprises entre 177 et 429 naissains par coupelle.
- L'étang de Thau était caractérisé par un captage faible à modéré avec des valeurs extrêmement variables comprises entre 8 et 122 naissains par coupelle.
- Enfin pour la baie de Vilaine, les résultats de l'étude menée en 2013 par le Comité Régional de la Conchyliculture de Bretagne sud a montré que le captage était qualifié de médiocre à moyen avec des valeurs d'environ 40 naissains par coupelle.

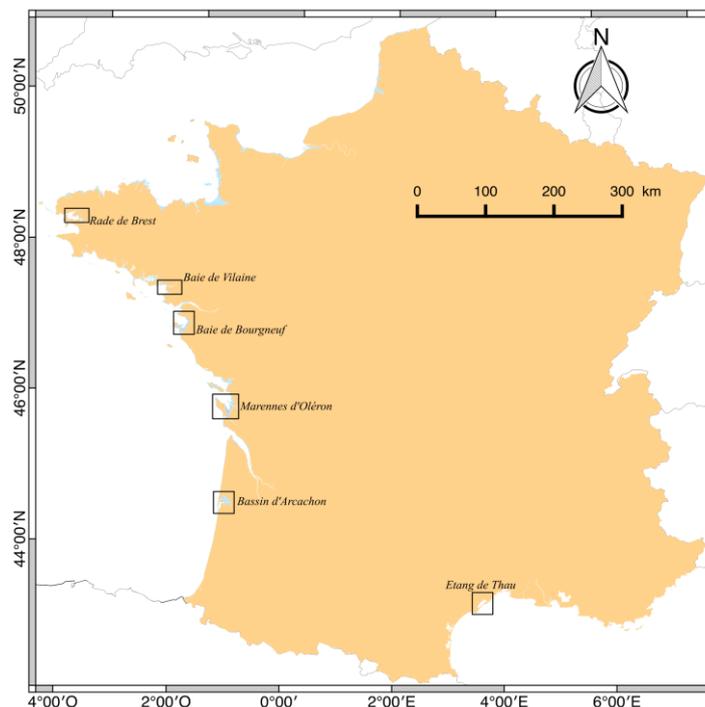


Figure 3 : répartition géographique des 6 écosystèmes identifiés dans l'action QUALIF pour l'expertise zoo-sanitaire des naissains de captage de l'huître creuse issus de la reproduction de l'année 2013.

2.4. Plan expérimental

2.4.1. Qualification zoo-sanitaire en ETL de référence

Lors de ce travail de qualification zoo-sanitaire, 21 lots de naissains ont été caractérisés en ETL correspondant à 20 lots de captage issus des 6 écosystèmes identifiés dans le cadre de l'action QUALIF (Tableau 1). Le dernier lot correspondait au lot des naissains de la condition témoin (NSI) produit dans le site expérimental Ifremer à Argenton en 2013. L'expertise nationale par écosystème a été établie à partir de 3 échantillons prélevés dans l'étang de Thau et de 5 pour le bassin d'Arcachon. Pour Marennes Oléron et la baie de Bourgneuf, 3 lots de naissains ont été expertisés par site. Enfin, pour la baie de Vilaine et la rade de Brest, 2 et 4 échantillons respectivement ont été testés dans QUALIF. Le nombre d'individus par échantillon variait d'un minimum de 62 pour le lot Loupian (étang de Thau) à un maximum de 640 pour ceux prélevés à Arcachon (Villa Algérienne) ainsi que pour le lot de Pointe du Château en rade de Brest (Tableau 1). La forte variance initiale du nombre d'individus se retrouvait en terme de biomasse avec une gamme de valeurs comprise entre 39 g pour les naissains prélevés à Compriant (bassin d'Arcachon) jusqu'à une valeur maximale de 600 g (pointe du château, rade de Brest). Ces différences initiales de biomasse étaient entre autres liées aux différences entre les dates de ponte dans chacun des sites (plus ou moins précoces) ainsi qu'aux conditions trophiques contrastées (densité d'huîtres, productivité primaire). Les épreuves en laboratoire ont débuté au mois de février 2014 avec les naissains de l'étang de Thau pour finir au mois d'avril avec ceux de rade de Brest.

Tableau 1 : caractéristiques des échantillons de naissains du captage 2013 (nombre, poids total (g) et poids moyens (g)) : lots TEST, prélevés dans les 6 écosystèmes pour l'expertise zoo-sanitaire en épreuve thermique de laboratoire de l'action QUALIF 2014 avec leurs lots témoin respectifs (chaque lot a été réparti dans 2 bacs, sauf l'échantillon de la Pointe du Château de la rade de Brest distribué en 3 bacs).

Caractéristiques des lots TEST en expertise zoo-sanitaire					Caractéristiques des lots NSI témoin		
Sites	Secteurs	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)
Etang de Thau	Marseillan	417	175	0,42	98	62	0,63
	Loupian	430	42	0,09	40	19	0,47
	Loupian	62	238	5,66	60	40	0,66
Bassin d'Arcachon	Lucarnan	500	253	0,50	123	88	0,71
	Villa Algérienne	640	160	0,25	121	92	0,76
	Graouères	352	75	0,21	60	46	0,76
	Comprian	340	39	0,11	60	45	0,75
	Bélisaire	460	400	0,87	224	14	0,06
Marennes- Oléron	Les Longès	444	380	0,85	224	14	0,06
	Seudre	337	268	0,79	209	14	0,06
	Moulières	368	88	0,24	151	14	0,09
Baie de Bourgneuf	Les Moutiers	480	400	0,83	140	14	0,10
	Bernerie Nord	300	400	1,33	140	14	0,10
	Bernerie Sud	300	400	1,33	140	14	0,10
Baie de Vilaine	Tréhiguier	365	507	1,39	120	60	0,50
	Tréhiguier	409	180	0,44	120	68	0,56
Rade de Brest	Le Pryoldi	430	347	0,78	210	14	0,06
	Mengleuz	465	386	0,83	226	14	0,06
	Lomergat	572	300	0,52	217	14	0,06
	Pte Château	640	600	0,93	302	21	0,07
NSI témoin	Argenton	210	14	0,06			

2.4.2. Qualification zoo-sanitaire en ETL simplifiée

Le protocole expérimental mis en œuvre dans le cadre de la recherche de simplification de l'épreuve thermique en laboratoire était basé sur l'expertise simultanée en ETL de référence et en ETL simplifiée de six lots de naissains. Ils étaient constitués par trois échantillons TEST provenant des secteurs du Mengleuz, du Prioldy et de Lomergat en rade de Brest plus deux lots de naissains prélevés en baie de Bourgneuf (Bernerie Sud et les Moutiers). Le dernier lot étudié correspondait à un lot de naissains NSI pour la condition témoin. Le plan expérimental comprenait trois conditions : (1) ETL de référence, (2) ETL simplifiée avec une distribution journalière d'algues (200 mL·jour⁻¹), (3) ETL simplifiée sans distribution d'algues (Tableau 2).

Tableau 2 : caractéristiques des lots de naissains (biomasse et poids moyen (g)) utilisés lors de l'essai de simplification de l'épreuve thermique de laboratoire (ETL). Chaque lot de naissains a été réparti dans 2 bacs (ETL de référence) ou dans 2 bidons dans le cas des ETL simplifiées. Les naissains ont été prélevés en rade de Brest (RDB) ou en baie de Bourgneuf (BGN).

Lots expérimentaux	ETL de référence			ETL simplifiée avec algues			ETL simplifiée sans algues		
	Secteurs	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)	Nbre	Poids total (g)
(RDB) Mengleuz	465	386	0,83	230	170	0,74	253	170	0,74
(RDB) Le Prioldy	430	347	0,81	191	170	0,89	228	170	0,74
(RDB) Lomergat	572	300	0,52	256	140	0,54	256	140	0,54
(BGN) Bernerie Sud	300	400	1,33	127	170	1,34	127	170	1,34
(BGN) Les Moutiers	480	400	0,83	210	170	0,81	207	170	0,82
NSI témoin	500	130	0,26	607	170	0,28	654	170	0,26

2.5. Paramètres suivis

2.5.1. Mortalité des naissains TEST et témoin en ETL

Le relevé de la mortalité des naissains TEST et témoin pendant l'ETL participe à qualifier l'état zoo-sanitaire de l'échantillon étudié. Une valeur de mortalité cumulée supérieure à 5 % de l'échantillon TEST a été considérée comme indicatrice d'une maladie en cours pour le lot étudié. Par contre, le diagnostic du caractère infectieux des maladies est établi dès la première observation de mortalité des naissains NSI de la condition témoin placés en cohabitation dans la même structure. Pendant l'épreuve thermique, un dénombrement des naissains morts a été effectué tous les 10 jours (j0, j10, j20 et j30) pour les deux configurations d'ETL (référence ou simplifiée).

2.5.2. Détection d'ADN viral

Les prélèvements de naissains pour la détection d'ADN du virus OsHV-1 μ Var ont été réalisés sur des échantillons d'huîtres entières vivantes des lots TEST et témoin pendant la qualification zoo-sanitaire. Chaque prélèvement était constitué de deux fois cinq naissains (2 répliquats). Pendant les ETL, tous les lots en étude plus leurs témoins ont été prélevés suivant un même calendrier, soit avant le début de l'épreuve (j0) puis après 10 jours (j10). De plus, les premiers animaux morts observés pendant les épreuves de qualification zoo-sanitaire en ETL ont été prélevés. Les prélèvements ont été conservés à -20°C puis envoyés au laboratoire LABOCEA Bretagne Océane. La méthode d'analyse utilisée est basée sur celle publiée par Pépin *et al.* (2008). Cette approche fournit une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la PCR.

3. Résultats de la qualification zoo-sanitaire

3.1. ETL référence

3.1.1. Bilan par site

3.1.1.1. Etang de Thau

L'étude menée sur trois lots de naissains captés dans l'étang de Thau a donné en ETL une faible valeur moyenne de mortalité de 3 % (± 2). Elle était nulle au terme des 30 jours en épreuve pour les témoins placés en cohabitation avec les naissains TEST (Fig. 5).

Une seule des six analyses qPCR effectuées sur les trois lots TEST avant le début ETL révélait une faible détection d'ADN viral d'OsHV1 μ Var ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹). Les naissains détectés positifs provenaient du secteur de Marseillan. A j10 de l'ETL, les six analyses menées sur les trois échantillons TEST, ainsi que les six analyses pour les trois lots de naissains témoin étaient négatives.

3.1.1.2. Bassin d'Arcachon

Les valeurs moyennes de mortalité pour les cinq échantillons TEST expertisés étaient de 17 (± 8) % et de 19 (± 21) % pour les témoins. Ces valeurs proches entre lots TEST et NSI témoin étaient contrastées entre les cinq secteurs de prélèvement, variant de 5 % pour les naissains du secteur de Graouères jusqu'à 25 % pour ceux de Lucarnan. Les mortalités pour les lots témoin étaient comprises entre 0 et 46 % (Fig. 6).

Neuf des dix analyses initiales de détection d'ADN viral effectuées sur les cinq échantillons TEST se sont révélées négatives. Seule une des deux menées sur l'échantillon Bélisaire a révélé des traces d'ADN viral ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹). Par contre, à j10 de l'ETL, huit analyses étaient positives et étaient toutes associées aux lots TEST avec mortalité. Seuls les naissains de Graouères pouvaient être qualifiés de non infectés par le virus herpès avec deux résultats négatifs. Ces constats étaient confirmés par les analyses des naissains témoin, négatives pour ceux de Graouères et positives pour tous les autres lots jusqu'à des valeurs supérieures à 2.10^8 copies.mg⁻¹ de tissus.

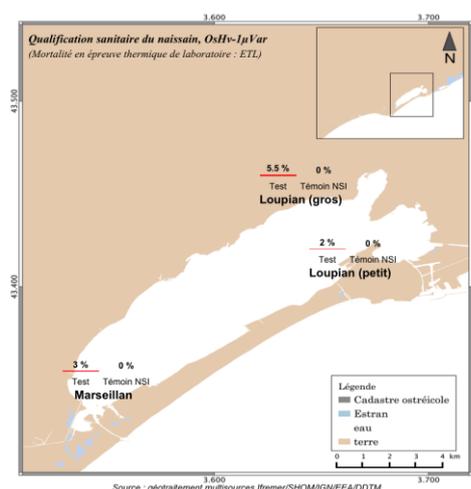


Figure 5 : résultats de la qualification zoo-sanitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 de l'étang de Thau.

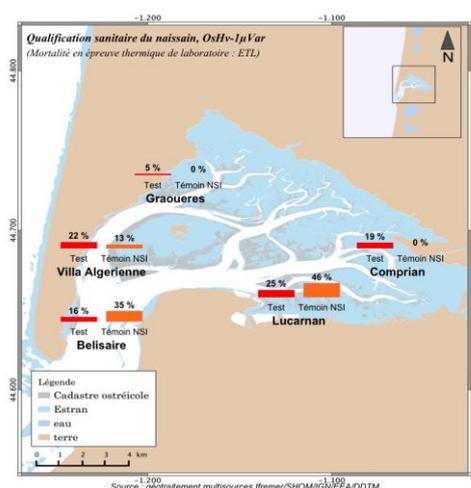


Figure 6 : résultats de la qualification zoo-sanitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 du bassin d'Arcachon.

3.1.1.3. Marennes Oléron

Les valeurs moyennes des mortalités relevées en ETL étaient de 22 (\pm 39) % pour les trois lots TEST et de 14 (\pm 24) % pour leurs NSI témoin. La variance des résultats trouvait son origine dans le fort contraste de mortalité inter-échantillons.

La Seudre, avec 67 %, était le seul secteur avec mortalité en ETL. Le caractère infectieux des naissains de la Seudre se révélait par une mortalité de 42 % des naissains témoin en cohabitation. Les naissains des Longes et des Moulières ont passé l'ETL sans mortalité des naissains TEST et témoin (Fig. 7).

Les analyses qPCR avant ETL ont montré qu'un des deux échantillons de naissains de la Seudre était détecté faiblement positif à OsHV1 μ Var ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹). A cette date, les autres analyses des lots TEST étaient négatives. De même, à j10 seules les analyses des naissains de la Seudre et de leurs témoins étaient positives. Les charges de particules virales étaient supérieures à 2.10^8 copies.mg⁻¹ de tissus pour les naissains tests et égales à $6,23.10^5$ copies.mg⁻¹ de tissus pour les naissains de la condition NSI témoin.

3.1.1.4. Baie de Bourgneuf

Aucune mortalité n'a été relevée en ETL pour les trois échantillons de naissains prélevés en baie de Bourgneuf (Fig. 8). Le constat était identique pour les lots témoin confirmant le caractère peu infectieux des naissains TEST de ce site.

Les résultats des qPCR (avant ETL) mettaient en évidence une faible détection d'ADN d'OsHV1 μ Var pour les échantillons des Moutiers et de la Bernerie Nord ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹), alors que les analyses des naissains de la Bernerie Sud étaient négatives. A j10 en ETL, les six analyses menées sur les trois lots TEST étaient positives avec des valeurs inférieures au seuil de quantification ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹). Seul un lot témoin (1/6) était positif ($< 4.10^4$ copies.mg⁻¹) à cette date ; il s'agissait du lot prélevé à la Bernerie Nord.

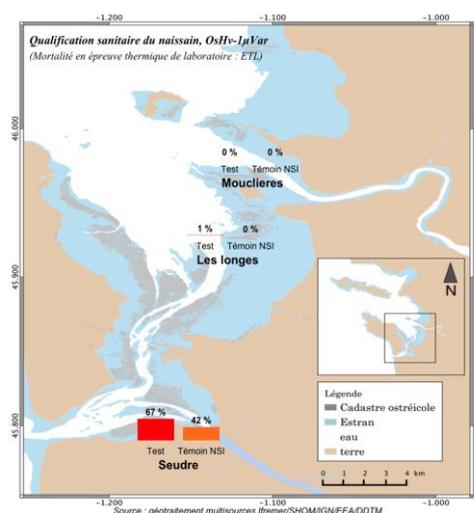


Figure 7 : résultats de la qualification zoonitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 du bassin de Marennes et Oléron.

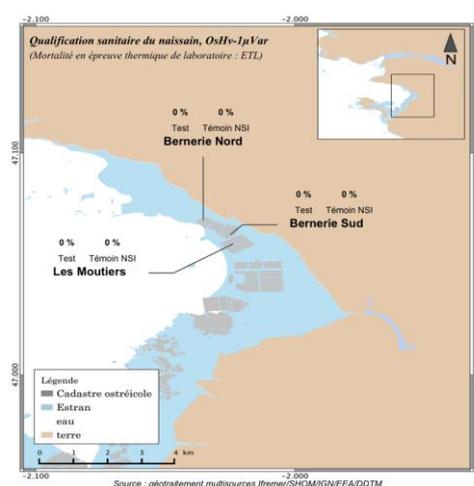


Figure 8 : résultats de la qualification zoonitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 en baie de Bourgneuf.

3.1.1.5. Baie de Vilaine

Deux échantillons de naissains captés à l'embouchure de La Vilaine ont été expertisés en ETL à la mi-février 2014 (Fig. 9). Pour ces deux lots TEST des mortalités ont été relevées au terme de l'ETL (54 et 27 %) de même pour leurs témoins respectifs (63 et 16 %). Les valeurs moyennes de mortalité pour cet écosystème s'établissaient pour les naissains TEST à 40 (\pm 19) % et à 39 (\pm 33) % pour leurs témoins.

Les quatre analyses de détection d'OsHV1 μ Var menées sur les naissains TEST avant le début de l'épreuve étaient négatives. A j10, alors que les mortalités étaient en cours depuis deux jours, les nouvelles analyses mettaient en évidence une prolifération du virus, et ce pour tous les prélèvements des naissains TEST (6/6) et dans une moindre mesure pour les naissains témoin (2/4). Les valeurs maximales étaient supérieures au seuil de détection de la qPCR, soit 2.10^8 copies.mg⁻¹ de tissus pour les deux conditions (TEST et témoin).

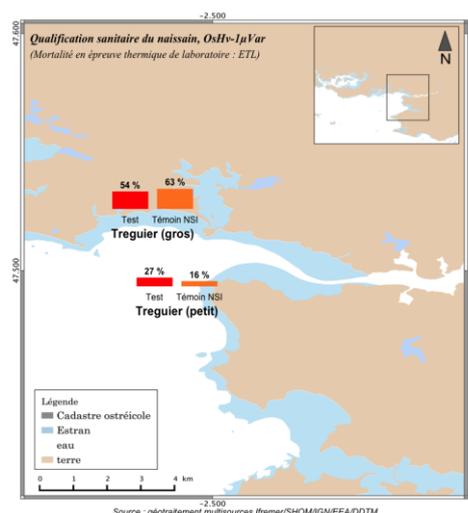
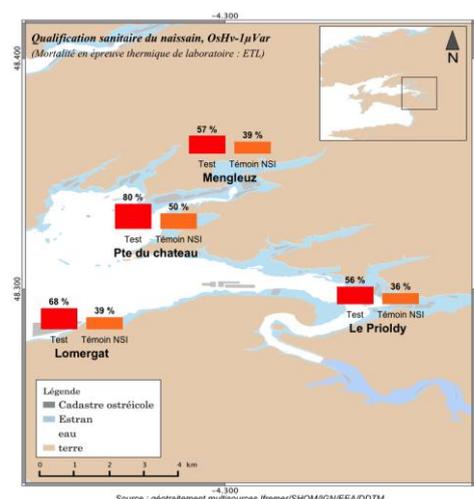


Figure 9 : résultats de la qualification zoo-sanitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 de l'embouchure de la Vilaine.

3.1.1.6. Rade de Brest

Le naissain de captage de la rade de Brest a révélé en ETL les plus fortes mortalités des six sites étudiés. La mortalité moyenne des quatre échantillons de naissains TEST était de 65 (\pm 11) % et celle des naissains témoin s'établissait à 41 (\pm 6) %. La plus faible valeur de mortalité était relevée pour l'échantillon du Prioldy (56 %) et la plus forte pour les naissains de la pointe du Château (80 %).

Les huit analyses qPCR menées avant le début de l'ETL sur les échantillons de naissains des quatre secteurs expertisés en rade de Brest étaient positives (ADN OsHV1 μ Var détecté). Six des huit résultats de ces analyses donnaient des valeurs inférieures au seuil de quantification de la qPCR ($<4.10^4$ copies.mg⁻¹), tandis que celles associées aux naissains du Mengleuz et de la pointe du Château étaient respectivement de $2,86.10^5$ copies.mg⁻¹ et de $5,92.10^5$ copies.mg⁻¹ de tissus. Ces deux dernières valeurs étaient les plus élevées pour les vingt échantillons de naissains expertisés dans le cadre de QUALIF. La mortalité massive relevée au dixième jour en ETL pour les échantillons de naissains des quatre secteurs était associée à une forte réplication du virus. Ainsi, les huit analyses du jour 10, menées sur des individus morts des quatre échantillons donnaient pour les naissains TEST des valeurs de



sanitaire en terme de mortalité (%) des conditions TEST et témoin obtenus en ETL pour les naissains de captage de l'année 2013 en rade de Brest.

détection d'ADN au-dessus du seuil de quantification de la qPCR ($> 2.10^8$ copies.mg⁻¹ de tissus). La transmission du virus, depuis les conditions TEST vers les naissains témoin, était confirmée par les résultats des analyses (n = 8) de détection d'ADN de OsHV1 μ Var. Les valeurs allaient d'un minimum de $5,92.10^5$ à des valeurs supérieures au seuil de détection de 2.10^8 copies.mg⁻¹ de tissus.

3.1.2. Synthèse

L'étude zoo-sanitaire en ETL des naissains de captage 2013 au début de l'année 2014 a porté sur vingt échantillons prélevés dans six sites, depuis la Méditerranée jusqu'à la Bretagne. Les moyennes des mortalités relevées pour les vingt lots de naissains TEST étaient de 25 (\pm 25) % et de 19 (\pm 18) % pour les vingt lots de NSI témoin en cohabitation (Tableau 3). Le nombre d'échantillons TEST avec un constat de mortalité supérieure à 5 % était de douze, soit 60 % des échantillons TEST étudiés. Parmi ces douze échantillons, dix (83 %) ont montré leur pouvoir infectieux en transmettant les maladies aux animaux sains placés en cohabitation. En effet, ces dix lots de NSI de la condition témoin ont révélé des mortalités consécutives à celles constatées pour les dix lots de naissains TEST.

Tableau 3 : synthèse des résultats de l'étude de qualification zoo-sanitaire nationale des naissains de captage de l'année 2013 par écosystème : nombre d'échantillons étudiés, nombre d'échantillons TEST et témoin avec mortalité (> 5 %) et valeurs moyennes des mortalités (% , \pm écart type) relevées en ETL référence.

Ecosystème	Nbre d'échantillons TEST expertisés	Nbre d'échantillons TEST avec mortalité	Nbre d'échantillons témoin avec mortalité	Moy. mortalités TEST (%)	Moy. mortalités témoin (%)
Etang de Thau	3	1	0	3 (\pm 2)	0
Bassin Arcachon	5	4	3	17 (\pm 8)	19 (\pm 21)
Marennes-Oléron	3	1	1	22 (\pm 39)	14 (\pm 24)
Baie de Bourgneuf	3	0	0	0	0
Baie de Vilaine	2	2	2	40 (\pm 19)	39 (\pm 33)
Rade de Brest	4	4	4	65 (\pm 11)	41 (\pm 7)
	Total 20	Total 12	Total 10	Moy. générale 25 (\pm 25)	Moy. générale 19 (\pm 18)

A l'exception du résultat relevé pour les naissains de la baie de Bourgneuf (absence de mortalité), la valeur moyenne des mortalités des naissains TEST par site augmente de manière remarquable depuis le sud vers le nord de la France, avec une valeur de minimale de 3 % pour les naissains de l'étang de Thau et maximale de 65 % pour ceux de la rade de Brest (Tableau 3). En terme de mortalité des NSI de la condition témoin (transmission de la maladie), le constat est le même avec des valeurs plus fortes pour les sites les plus au Nord par rapport à ceux plus au Sud (Fig. 11). Les valeurs de mortalité en ETL des vingt échantillons de naissains TEST expliquent en partie celles relevées pour leurs lots de NSI témoin ($R^2 = 0,78$).

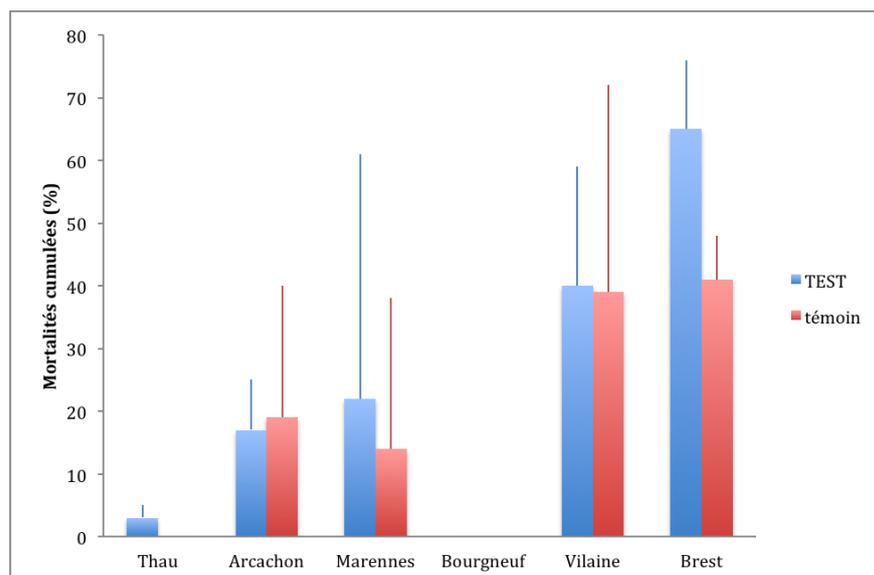


Figure 11 : mortalités cumulées moyennes (% \pm écart type) par site pour les naissains des conditions TEST et témoin, relevées en épreuve thermique de laboratoire de référence pour les animaux du captage naturel de l'année 2013.

Les valeurs moyennes de mortalité des vingt échantillons de naissains TEST étudiés en ETL permettent de classer les six sites de prélèvement en trois grandes catégories. La première regroupe l'étang de Thau et la baie de Bourgneuf pour lesquels de faibles mortalités (< 5 %) ont été relevées en ETL, pour les naissains TEST comme pour leurs témoins. La seconde catégorie est constituée par les écosystèmes à résultats contrastés en terme de mortalité. Dans cette seconde catégorie se trouvent les naissains du bassin d'Arcachon et ceux de Marennes-Oléron, avec respectivement trois lots sur cinq et un lot sur trois avec mortalité importante en ETL. Pour ces deux écosystèmes, les valeurs moyennes intégrant l'ensemble des valeurs de mortalité des échantillons expertisés étaient proches de 20 % (TEST comme témoin). Enfin, la troisième catégorie est constituée par la baie de Vilaine et la rade de Brest, qui ont présenté les plus fortes valeurs moyennes de mortalité pour les lots TEST et témoin (> 40 %). Pour ces deux derniers écosystèmes, il faut relever l'uniformité de la réponse en ETL avec des mortalités importantes pour tous les lots expertisés (Tableau 3).

Pour l'ensemble des lots TEST avec mortalité, les valeurs moyennes s'établissent à 40 (\pm 27) % (n=12) et à 29 (\pm 18) % pour les dix lots de NSI témoin en cohabitation (Tableau 4). Les valeurs moyennes de mortalité des lots TEST les plus faibles sont toujours liées aux deux écosystèmes les plus au sud (5,5 % pour l'étang de Thau et 21 % pour Arcachon) tandis que les plus fortes valeurs correspondent à Vilaine (40 %) et à Brest (65 %).

Par contre, les valeurs de mortalité des NSI de la condition témoin sont moins contrastées spatialement avec des réponses moyennes homogènes proches de 40 % pour le bassin d'Arcachon, Marennes-Oléron, la baie de Vilaine et la rade de Brest. Signalons qu'aucune mortalité n'a été relevée sur les lots NSI témoin en cohabitation avec des lots TEST de l'étang de Thau et de la baie de Bourgneuf (Tableau 4).

Tableau 4 : synthèse des résultats de l'étude de qualification zoo-sanitaire nationale des naissains de captage de l'année 2013 par écosystème : nombre d'échantillons TEST et témoin avec mortalité (> 5 %) et valeurs moyennes des mortalités (% , ± écart type) relevées en ETL référence.

Ecosystèmes	Nbre d'échantillons TEST avec mortalité > à 5 %	Nbre d'échantillons témoin avec mortalité	Moy. mortalités TEST (%)	Moy. mortalités témoin (%)
Etang de Thau	1	0	5,5	0
Bassin d'Arcachon	4	3	21 (± 4)	31 (± 17)
Marennes Oléron	1	1	67	42
Baie de Bourgneuf	0	0		
Baie de Vilaine	2	2	40 (± 19)	39 (± 33)
Rade de Brest	4	4	65 (± 11)	41 (± 7)
	Total 12	Total 10	Moy. générale 40 (± 27)	Moy. générale 29 (± 18)

Les analyses qPCR effectuées avant l'élévation de la température (à j0 de l'ETL) pour les naissains TEST ont mis en évidence une détection d'OsHV-1 μ Var pour onze des vingt lots étudiés. Pour sept de ces onze échantillons de naissains de captage, le passage en ETL s'est caractérisé par des mortalités massives alors qu'aucune mortalité n'a été relevée pour les quatre lots restants (ni pour leurs lots témoin).

A j10, les analyses qPCR se sont révélées positives pour quinze lots TEST parmi lesquels se trouvent les onze échantillons avec mortalité. Les analyses à j0 ont permis d'identifier 63 % des futurs échantillons TEST infectés par OsHV-1 μ Var. A j10, 100 % des lots TEST qui étaient positifs (présence d'OsHV-1 μ Var). La meilleure adéquation entre les résultats des analyses qPCR et les valeurs de mortalité concerne les NSI témoin en cohabitation. En effet, à j10, douze lots témoins ont été identifiés positifs parmi lesquels se trouvaient les onze lots témoin des onze échantillons TEST avec mortalité.

3.2. ETL simplifiée

La comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodologies ETL (référence *versus* simplifiée) montre une parfaite similitude de résultats pour les six échantillons de naissains TEST étudiés. En effet, des mortalités massives ont été observées aussi bien en ETL de référence qu'en ETL simplifiée (versions avec ou sans algues), pour trois lots de naissains captés en rade de Brest. Ces mortalités étaient associées à des analyses positives de détection d'OsHV-1 μ Var. Les trois autres lots de naissains (deux captés en baie de Bourgneuf et un lot NSI témoin) n'ont révélé aucune mortalité lors de l'ETL de référence et de l'ETL simplifiée (versions avec ou sans algue, Tableau 5). Par contre, la comparaison des résultats entre ETL de référence et ETL simplifiée met en évidence une différence marquée entre les deux méthodologies ETL dans les cumuls des mortalités enregistrées. En effet, pour les trois lots TEST avec mortalité, les valeurs relevées au terme de l'épreuve ont été environ deux fois supérieures en ETL référence par rapport à celles obtenues en ETL simplifiée (Tableau 5), avec une variance intra-condition des mortalités relevées en ETL de référence inférieure à celle observée en ETL simplifiée.

Tableau 5 : mortalité (% , ± écart type) des lots TEST en ETL de référence (en bacs, avec renouvellement continu de l'eau de mer et apport d'algues) et en ETL simplifiée (en bidons, avec un renouvellement de l'eau de mer tous les 10 jours, avec algues ou sans algue).

Epreuve thermique appliquée (ETL)		Rade de Brest			Baie de Bourgneuf		témoin
		Mengleuz	Prioldy	Lomergat	Bernerie	Moutier	NSI
ETL Référence		57 ± 4	56 ± 1	68 ± 1	0	0	0
ETL simplifiée	Sans algue	26 ± 29	32 ± 2	20 ± 4	0	0	0
	Avec algues	17 ± 10	20 ± 28	22 ± 4	0	0	0

4. Discussion & conclusions

4.1. Méthodologie

L'épreuve thermique en laboratoire (ETL) a été développée pour révéler le portage latent de OsHV-1 μ Var chez les naissains d'huître creuse. Elle a été utilisée pour la première fois pendant l'hiver 2010-2011 pour caractériser plusieurs lots de naissains captés en rade de Brest au cours de l'été 2010 (Petton *et al.*, 2015). Depuis, les éléments clés de l'ETL demeurent inchangés : élévation de la température à 21°C et confinement des animaux (Petton *et al.*, 2013). Cette méthode permet de déterminer le statut zoo-sanitaire OsHV-1 μ Var d'un lot de naissains par l'observation de présence ou d'absence de mortalité au terme de l'ETL. Des analyses de quantification de l'ADN viral par PCR sur chaque lot de naissains, avant et pendant l'épreuve, complètent les observations en terme de mortalité. Jusqu'au début de l'année 2014, ces deux approches complémentaires (relevé des mortalités et analyses PCR) fournissaient les informations pour qualifier l'état zoo-sanitaire des animaux.

Pourtant, dans le cadre de l'action QUALIF, il a semblé nécessaire de faire évoluer sensiblement la méthodologie d'expertise sanitaire en ETL pour déterminer le potentiel infectieux des lots TEST. Pour cela, des naissains sains dits témoin ont été placés en cohabitation avec chaque échantillon à caractériser. Pendant l'ETL, ces animaux témoin ont été suivis au même titre et avec la même méthodologie que les lots TEST, aussi bien en terme de mortalité qu'en terme de quantification de la charge virale. Dans le contexte actuel de récurrence annuelle des maladies, cette évolution méthodologique permet d'identifier efficacement des lots de naissains présentant un risque zoo-sanitaire en terme d'infection par le virus OsHV-1 μ Var. Signalons que les NSI témoins utilisés comme indicateur de la nature infectieuse des lots de naissains TEST ont subi une expertise en ETL (absence de mortalité et analyses OsHV-1 μ Var négatives) avant d'être placés en cohabitation avec les lots TEST. En ETL, les mortalités relevées pour neuf des douze lots TEST ont débuté entre le cinquième et le dixième jour en ETL, tandis que pour les trois lots restants, les mortalités ne sont apparues qu'entre le onzième et le vingtième jour. Ces résultats sont conformes aux premiers travaux de qualification zoo-sanitaire menés depuis 2010 (Petton *et al.*, 2015) et suggèrent que la durée d'expertise de 30 jours en ETL pourrait être ramenée à 25 voire à 21 jours. Les mortalités des animaux de la condition témoin sont survenues environ 48 heures après celles des naissains TEST. Ces constats dans la chronologie d'apparition des mortalités (TEST ou témoin) améliorent la caractérisation zoo-sanitaire des lots en précisant le statut infecté des naissains TEST (initiateur de la maladie) et le caractère contagieux de la maladie révélée.

Les réponses en terme de mortalité relevée en ETL référence de tous les échantillons étudiés sont reproductibles. En effet, les valeurs de mortalité des vingt lots de naissains TEST sont proches entre les deux bacs d'un même échantillon, associés à une faible variance. Ceci est le cas pour les douze lots avec mortalité comme pour les huit autres lots pour lesquels la survie n'a pas été impactée. Ce constat effectué pour les lots TEST est identique pour les valeurs de mortalité des vingt lots de NSI de la condition témoin. La maîtrise méthodologique, en terme de reproductibilité des résultats en ETL, est un point essentiel à l'application à plus grande échelle de la méthodologie proposée ici.

4.2. Statut zoo-sanitaire des naissains à l'échelle nationale

La qualification zoo-sanitaire réalisée début 2014 sur les naissains de captage de la saison de reproduction 2013, échantillonnés alors que la température de l'eau de mer était inférieure à 14°C et en l'absence de mortalité sur le terrain, a confirmé la présence d'animaux infectés par OsHV-1 μ Var au sein des différents sites étudiés (Petton *et al.*, 2015). Lors de cette campagne et pour la première fois en ETL, le caractère infectieux des maladies développées par les naissains TEST a été clairement démontré pour dix échantillons TEST sur les douze avec des mortalités significatives (> 5 %). La transmission effective de agents infectieux a été vérifiée par l'observation de mortalités sur les NSI de la condition témoin quelques jours après le début de celles des naissains TEST. Ce constat de dix lots sur vingt de naissains de captage porteurs latents de OsHV-1 μ Var est proche de celui obtenu entre 2010 et 2013 lors des premières études en ETL (Petton *et al.*, 2015). Il est probable que ces animaux porteurs d'OsHV-1 μ Var participent activement à la résurgence annuelle des mortalités de naissains sur le littoral français dès que la température de l'eau de mer devient supérieure à 16°C.

4.3. Statut sanitaire des naissains des différents sites

La caractérisation zoo-sanitaire du naissain obtenue après la synthèse des résultats des ETL montre globalement un gradient sud-nord, avec un nombre de lots infectés et infectieux croissants depuis l'étang de Thau jusqu'à la rade de Brest. Seule la baie de Bourgneuf se démarque en présentant les meilleurs résultats, c'est-à-dire avec absence de mortalité pour les lots TEST expertisés et les lots témoin en cohabitation. Ce gradient latitudinal de l'intensité des mortalités du naissain de captage en ETL pourrait être en lien avec une plus grande précocité de ponte depuis le sud vers le nord de la France. Il est possible que lors d'une même saison de reproduction, des naissains captés plus tôt dans les sites du Sud meurent au cours de la même année, alors que la ponte n'a pas encore eu lieu dans les autres écosystèmes. Cette hypothèse paraît vraisemblable pour les naissains de l'étang de Thau avec un événement de ponte précoce à la mi-juillet 2013 (Pouvreau *et al.*, 2014). La fixation de ces larves, tôt dans la saison de reproduction alors que le milieu est infectieux, permet un contact prolongé avec les agents pathogènes, avec pour conséquence des mortalités dès le premier été. Il est donc probable que les naissains de l'étang de Thau étudiés en ETL en février 2014 ne soient que les survivants d'un événement antérieur de mortalité (été 2013). Ces naissains impactés en année 0 sont alors moins sensibles et moins infectieux en année 1 (Dégremont, 2011) et pourrait devenir une source d'approvisionnement intéressante. Cette hypothèse devrait être confortée par un suivi précoce (en année 0) de la survie des larves et naissains. Pour les animaux de la baie de Bourgneuf et de l'étang de Thau, le passage en ETL n'a révélé aucune mortalité sur les lots TEST et témoin. Pourtant l'historique de vie des naissains de la baie de Bourgneuf a été très différent de ceux captés dans l'étang de Thau. En effet, la ponte à Bourgneuf est survenue tardivement (fin août 2013) avec en prime une longue phase larvaire (T° de l'eau de mer < 20°C). La fixation a donc été très tardive dans un milieu de vie probablement peu infectieux. Contrairement à Thau, les naissains de Bourgneuf n'auraient *a priori* pas (ou seulement que très partiellement) été infectés par le virus OsHV-1 μ Var lors du premier été de vie. Ces deux phénoménologies extrêmes pour les sites de Thau et de Bourgneuf conduisent à un constat zoo-sanitaire similaire en ETL. Les naissains de ces deux sites présentent une meilleure qualité zoo-sanitaire que les naissains des quatre autres sites étudiés.

4.4. Bilans quantitatif et qualitatif du captage 2013

Les bilans du captage de l'année 2013 concernant les aspects quantitatif (VELYGER) et qualitatif (QUALIF) mènent à des conclusions opposées (Tableau 6). Ainsi, la faiblesse du captage est mise en avant à Bourgneuf et dans l'étang de Thau alors que la qualification zoo-sanitaire des échantillons de naissains issus de ces deux écosystèmes est bonne. En terme zoo-sanitaire, ces deux sites sont classés comme présentant le plus faible risque. A l'opposé, pour le captage pléthorique de la rade de Brest et d'Arcachon, le bilan zoo-sanitaire est mauvais (Tableau 6).

Tableau 6 : comparaison des bilans proposés par le projet VELYGER (aspects quantitatifs de recrutement) et de l'action QUALIF (aspects qualitatifs zoo-sanitaires) concernant les naissains du captage de l'huître creuse.

Bilan du captage 2013	Aspects quantitatifs : VELYGER	Aspects qualitatifs : QUALIF
Bon	Brest – Arcachon	Thau – Bourgneuf
Médiocre	Marennes Oléron – Vilaine	Arcachon – Marennes Oléron
Mauvais	Thau – Bourgneuf	Vilaine – Brest

Dans le contexte de crises zoo-sanitaires récurrentes, le volet quantitatif ne peut être le seul déterminant des modalités de gestion de *C. gigas* et des écosystèmes conchylicoles exploités. Des indicateurs qualitatifs, dont le statut zoo-sanitaire, pourraient être utilisés dans l'avenir pour prévenir ou réduire l'impact des maladies, par exemple par l'établissement d'un « passeport » zoo-sanitaire de bonne santé associé à une traçabilité des animaux.

4.5. Qualification zoo-sanitaire et épizooties

Il convient de rappeler que l'action QUALIF n'avait pas de vocation opérationnelle. Les travaux réalisés avaient pour objectif d'explorer les possibilités de mener de futures actions à plus grande échelle, afin de limiter l'expansion des maladies contagieuses au sein de la filière de production ostréicole. Cette étude devra être renouvelée une seconde année afin d'affiner la compréhension et l'interprétation de ces premiers résultats. Les conclusions globales de ces deux années d'étude contribueront à élaborer des propositions en terme de prévention des maladies infectieuses.

Les recommandations préliminaires découlant des résultats de ce premier travail de qualification zoo-sanitaire sont relativement simples et directes pour les sites dans lesquels tous les échantillons qualifiés en ETL ont fourni une réponse identique : *i*) pas ou peu de mortalité pour les naissains de l'étang de Thau et de la baie Bourgneuf, donc un *a priori* favorable en terme zoo-sanitaire ; *ii*) mortalités massives pour ceux de la baie de Vilaine et de la rade de Brest, d'où un *a priori* défavorable en terme sanitaire. En revanche, lorsque les résultats sont contrastés (Arcachon), les recommandations sont plus délicates, voire impossibles à faire dans l'état des connaissances. Seul un travail à petite échelle par écosystème permettrait de définir un zonage en fonction d'un risque sanitaire avéré. Les éventuelles variations interannuelles de ces caractéristiques zoo-sanitaires demeurent une réelle interrogation qui devra être abordée lors de nouvelles campagnes.

4.6. Limites et perspectives

Les résultats obtenus en 2014 en terme de qualification zoo-sanitaire des naissains à l'échelle nationale montrent le risque potentiel inhérent aux transferts d'animaux. Par ailleurs, le rôle de ces naissains infectés par OsHV-1 μ Var dans le processus infectieux a été clairement établi : dès que la température de l'eau de mer dépasse 16°C, ils vont libérer les premières particules virales dans la colonne d'eau de mer (Pernet *et al.*, 2012) et ainsi diffuser cet agent pathogène. Par contre, dans le contexte actuel d'une épizootie installée dans tous les sites de production français, l'effet de mesures préventives (contrôle zoo-sanitaire avant transfert) en terme de gestion des mortalités pourrait être limité.

Ce travail sera reconduit en 2015, avec un plus grand nombre de lots étudiés, afin d'apprécier la variation de ces premiers résultats d'une année à l'autre. La comparaison entre les deux méthodes d'ETL (référence et simplifiée) sera élargie à l'ensemble des lots étudiés en prenant en compte la prévalence initiale à OsHV-1 μ Var de l'échantillon de naissains TEST.

Au-delà de ce travail, de nombreuses questions demeurent aujourd'hui sans réponse concernant les naissains de captage identifiés porteurs d'OsHV-1 μ Var en période hivernale : (1) quel est le processus de contamination de ces animaux ? ; (2) ces animaux ont-ils déjà présenté des maladies et des mortalités avant la date de l'épreuve de qualification, partiellement ou pas du tout ; si non, pourquoi ? ; (3) ces lots de naissains infectés contribuent-ils seuls au processus de déclenchement annuel des mortalités ou d'autres vecteurs existent-ils (huîtres adultes, bancs sauvages, autres espèces présentes dans les écosystèmes côtiers) ? En lien avec la première question, des hypothèses sont proposées liées à une contamination possible des parents vers les ovocytes avec une latence de la maladie chez certains naissains, ou plus simplement à une contamination depuis l'environnement vers les larves et/ou naissains. Mais au delà du mode de contamination, une autre interrogation demeure cruciale en terme épidémiologique : pourquoi ces naissains infectés, nés en période estivale la plus favorable à l'exposition aux maladies et donc aux mortalités (Pernet *et al.*, 2012, Petton *et al.*, 2013,) n'ont-ils pas été déjà frappés par les mortalités ?

Ces questions nécessitent des réponses afin de mieux comprendre le processus infectieux annuel et pour décliner des mesures préventives appropriées en terme de gestion des risques zoo-sanitaires.

5. Références

- Dégremont L. (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317 : 94-98
- Dégremont L., Guyader T., Tourbiez D., Pépin J.-F. (2013) Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture* 408–409 : 51-57
- Geay A., Bouquet A.L. (2009) Suivi du recrutement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en Charente-maritime en 2009 : Rapport de synthèse. Rapport de contrat CREEA-SRC Poitou Charentes, 32 p + annexes
- Goudenège D., Travers MA., Lemire A., Petton B., Haffner P., Labreuche Y., Tourbiez D., Manganot S., Calteau A., Mazel D., Nicolas J.-L., Jacq A., Le Roux F. (2014) A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Env Microbiol* 17 : 4189-4199.
- Lagarde F., Roque D'Orbcastel E., Perignon A., Mortreux S., Fuhrmann M., Le Gall P., Leurion A., Chiantella C., Bec B., Roques C., Bonnet D., Cochet H., Boj M., Gervasoni E., Miron G., Fiandrino A., Pouvreau S., Pernet F. (2013) Larval recruitment of *Crassostrea gigas* in a French Mediterranean lagoon. 40th CIESM Congress, 28 October - 1 November 2013, Marseille.
- Lemire A., Goudenège D., Versigny T., Petton B., Calteau A., Labreuche Y., Le Roux F. (2015) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME Journal* 9 : 1523-1531.
- Maurer D., Auby I., Barbier C., Schirr Bonnans I., Tournaire MP., Rumèbe M., Cantin C., Debort H., Cariou T., Navarro R., Simonnet B., Mayer M. (2009a) Reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon : Année 2009. RST/LER/AR/09- 009, 47 p.
- Pépin J.-F., Riou A., Renault T. (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149 : 269-276
- Pernet F., Barret J., Le Gall P., Corporeau C., Dégremont L., Lagarde F., Pépin J.-F., Keck N. (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon. *Aquaculture Env Interact* 2 : 215–237.
- Pernet F., Lagarde F., Le Gall P., Roque D'Orbcastel E. (2014) Associations between farming practices and disease mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a Mediterranean lagoon *Aquaculture Env Interact* 5 : 99–106.
- Petton, B. (2013). Méthode de qualification sanitaire (herpes virus OsHV-1 μ Var) de naissains de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de ses bassins d'élevage. Enveloppe SOLEAU (Institut National de la Propriété Industrielle) n° 485105, juillet 2013.
- Petton B., Pernet F., Robert R., Boudry P. (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 3 : 257-273.
- Petton B., Alunno-Bruscia M., Boudry P., Pernet F. (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 6 : 205–222.
- Pouvreau S., Bernard I., Le Souchu P., Huvet A., Talarmain E., Auby I., Maurer D., Barbier C., Tournaire MP., D'Amico F., Rumebe M., Neaud-Masson N., Bédier E., Martin AG., Claude S., Langlade A., Bouget JF., Hitier B., Stanisiere JY., Breerette S., Robert S., Guilpain P., Seugnet JL., Guesdon S., Soletchnik P., Le Moine O., Dumas F., Quemener L., Barbot S., Repecaud M., Mille D., Geay A., Bouquet AL. (2011) Projet VELYGER (2008-2010) : Observer, Analyser et Gérer la variabilité du recrutement de

l'huître creuse en France.

- Pouvreau S., Bellec G., Le Souchu P., Queau I., Talarmain E., Alunno-Bruscia M., Auby I., Maurer D., Barbier C., Tournaire M.P., D'Amico F., Rumebe M., Fleury E., Langlade A., Bouget J.F., Collin K., Fortune M., Hitier B., Bedier E., Robert S., Guilpain P., Grizon J., Seugnet J.L., Guesdon S., Lagarde F., Le Gall P., Messiaen G., Réseau VELYGER : Roque D'Orbcastel E., Gohin F., Bryere P., Quemener L., Repecaud M., Bucas K., Barbot S., Guillemot A., Nonnotte L., Duros W., Bonnat A., Tarot S., Mille D., Geay A., Bouquet A.L. (2013) Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France : Le Réseau VELYGER. Rapport annuel 2012.
- Pouvreau S., Petton S., Queau I., Bellec G., Talarmain E., Le Souchu P., Alunno-Bruscia M., Auby I., Maurer D., D'Amico F., Passoni S., Barbier C., Tournaire M., Rigouin L., Rumebe M., Fleury E., Langlade A., Bouget J.F., Collin K., Fortune M., Palvadeau H., Bedier E., Robert S., Pepin J.F., Grizon J., Seugnet J., Chabirand J., Le Moine O., Guesdon S., Lagarde F., Mortreux S., Le Gall P., Messiaen G., Roque D'Orbcastel E., Quemener L., Repecaud M., Bucas K., Barbot S., Guillemot A., Nonnotte L., Duros W., Bonnat A., Tarot S., Mille D., Geay A., Bouquet A. (2014). Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France : Le Réseau Velyger. Rapport annuel 2013. <http://dx.doi.org/10.13155/31091>
- Rico-Villa B., Pouvreau S., Robert R. (2009) Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 287(3-4) : 395-401.
- Segarra A., Pépin J.-F., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153 : 92- 99.
- Schikorski D., Faury N., Pépin J.-F., Saulnier D., Tourbiez D., Renault T. (2011a) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* 155 : 28–34.
- Schikorski D., Renault T., Saulnier D., Faury N., Moreau P., Pépin J.-F. (2011b) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1 : demonstration of oyster spat susceptibility. *Virus Res* 155 : 28-34.