

## Qualification zoo-sanitaire du naissain de captage 2014 de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (QUALIF)

Détection précoce des maladies  
en épreuve thermique de laboratoire



Qualification zoo-sanitaire  
du naissain de captage 2014  
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° 14/1211577/F

## Fiche documentaire

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> <b>Diffusion :</b> libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		<b>date de publication :</b> 30/03/2016 <b>nombre de pages :</b> 37 <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration(s) :</b> 15 figures et 6 tableaux <b>langue du rapport :</b> Français
<b>Validé par :</b> P. Boudry, responsable Unité PFOM Adresse électronique : pboudry@ifremer.fr		
<b>Titre de l'article :</b> Qualification zoo-sanitaire du naissain de captage 2014 de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (QUALIF)		
Contrat n°                                  Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
<b>Auteur principal :</b> Bruno Petton <sup>(1)</sup> Jacqueline Le Grand, Marion Riobé, Christian Mingant, Dominique Ratiskol, Sébastien Petton, Marianne Alunno-Bruscia  <sup>(1)</sup> bruno.petton@ifremer.fr	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> Ifremer, département Ressources Biologiques et Environnement Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins Laboratoire de Physiologie des Invertébrés	
<b>Contributeurs :</b>   		
Cadre de la recherche : Action QUALIF- Convention DPMA-Ifremer 2014 n° 14/1211577/F		
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  $\mu$ Var. Depuis 2010, des travaux de qualification zoo-sanitaire ont montré qu'environ un lot de naissains de captage sur deux était infecté par le virus avant l'apparition des mortalités dans le milieu naturel. En 2014, dans le cadre de la première action QUALIF, les résultats de la qualification zoo-sanitaire des naissains du captage de l'année 2013 à l'échelle nationale ont mis en évidence le caractère infectieux des maladies développées par ces naissains porteurs latents d'OsHV-1  $\mu$ Var. L'objectif 2015 du second volet QUALIF consistait à reproduire le travail de qualification zoo-sanitaire OsHV-1  $\mu$ Var pour les naissains du captage de l'année 2014. Les résultats (2014 et 2015) permettront d'aborder la variation interannuelle du statut zoo-sanitaire des naissains pour chacun des sites étudiés.

La méthodologie de l'épreuve de qualification zoo-sanitaire consiste en une période de 1 mois d'isolement des naissains en conditions contrôlées de laboratoire. Lors de cette épreuve, 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 et les analyses qPCR permettent de qualifier le statut sanitaire en terme de portage OsHV-1  $\mu$ Var de l'échantillon (infecté ou non infecté).

De début janvier à fin mars 2015, 39 échantillons de naissains âgés de 5 à 7 mois ont été prélevés dans 6 sites du littoral français (étang de Thau, bassin d'Arcachon, bassin de Marennes Oléron, baie de Bourgneuf, embouchure de La Vilaine et rade de Brest) pour être testés en épreuve thermique de laboratoire (ETL) dans l'outil expérimental Ifremer à Argenton. Les résultats montrent que 25 des 39 (soit 64 %) lots de naissains de captage testés ont développé des maladies en ETL associés à des mortalités cumulées variant de 6 à 72 %. Cette valeur de 64 % de lots détectés est plus élevée que celle précédemment observée en 2014 (55 %). Les résultats de cette seconde campagne de qualification zoo-sanitaire sont favorables pour les naissains de l'étang de Thau (absence de mortalité), moins favorables pour ceux d'Arcachon, Marennes Oléron, et ceux de la baie de Bourgneuf (réponses contrastées en terme de mortalité intra-site) et très défavorables pour les naissains de La Vilaine et de la rade de Brest (mortalités observées sur tous les échantillons testés). La principale conclusion de cette seconde étude de qualification zoo-sanitaire est identique à celle de 2014, à savoir qu'il existe dans le milieu naturel en période hivernale des lots de naissains de captage infectés par OsHV-1  $\mu$ Var sans développement apparent des maladies. Ces lots de naissains porteurs latents d'OsHV-1  $\mu$ Var sont détectables en ETL et la présence d'OsHV-1  $\mu$ Var peut alors être confirmée par qPCR.

Dans le contexte actuel d'épizooties chroniques, nos résultats confirment à nouveau qu'il est possible d'identifier précocement les lots de naissains infectés ou non par OsHV-1  $\mu$ Var. Ces animaux infectés sont un réservoir du virus en période hivernale. Dès que la température de l'eau de mer franchit le seuil de 16°C, ils participeront à la réémergence des maladies en milieu naturel. Par ailleurs, cette seconde étude de qualification zoo-sanitaire confirme la possibilité d'apprécier le risque sanitaire pour chaque zone de captage en fonction de la détection précoce des lots de naissains infectés par OsHV-1  $\mu$ Var.

## Mots-clés

Huître creuse – Naissain – Maladie - OsHV-1  $\mu$ Var – Epreuve thermique.

## Key words

Pacific oyster – Seed – Disease – OsHV-1  $\mu$ Var – Thermal challenge.

## Table des matières

<b>1. Introduction.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Matériel &amp; méthodes.....</b>	<b>8</b>
2.1. Naissains 'NSI' témoin.....	8
2.2. Epreuve thermique de laboratoire (ETL).....	8
2.2.1. Principe de l'ETL de référence.....	9
2.2.2. Principe de l'ETL simplifiée.....	10
2.3. Echantillonnage et qualification des naissains.....	11
2.3.1. Sites et prélèvements.....	11
2.3.2. Qualification zoo-sanitaire.....	15
2.4. Suivi <i>in situ</i> des mortalités des naissains.....	16
2.5. Paramètres mesurés.....	17
2.5.1. Mortalité des naissains TEST et témoin.....	17
2.5.2. Détection de la présence du virus.....	17
<b>3. Résultats.....</b>	<b>18</b>
3.1. ETL référence.....	18
3.1.1. Bilan par site.....	18
3.1.2. Synthèse à l'échelle nationale.....	24
3.2. ETL simplifiée.....	27
3.3. Mortalités des naissains en milieu naturel.....	29
<b>4. Discussion.....</b>	<b>30</b>
4.1. Qualification zoo-sanitaire du captage des naissains de 2014.....	30
4.2. Comparaison des résultats de qualification 2014 et 2015.....	31
4.3. Acquis et limites de la qualification zoo-sanitaire de l'huître creuse en épreuve thermique de laboratoire.....	32
<b>5. Conclusions &amp; Perspectives.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Références.....</b>	<b>35</b>

## Préambule

Pour la seconde année, l'action QUALIF a bénéficié d'un soutien financier de la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA) pour sa mise en œuvre en 2015 ; la DPMA demeure donc naturellement associée aux résultats de ce travail.

Les travaux de l'action QUALIF ont été rendus possibles par l'existence du réseau VELYGER (Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse sur les côtes françaises) 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). Le réseau VELYGER est coordonné par Ifremer et soutenu depuis 2011 par la DPMA. Ce réseau a pour finalité de mieux comprendre les causes de la variabilité de la reproduction de l'huître creuse en terme de recrutement dans les principaux bassins de captage. Ce projet est associé au réseau d'Observations Conchylicoles RESCO II 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), à des prestations avec des bureaux d'études, et à l'investissement des membres des équipes Ifremer des Laboratoires Environnement-Ressources (LER) de Sète et d'Arcachon et de ceux du laboratoire Physiologie des Invertébrés (UMR LEMAR à Plouzané et Argenton).

**En savoir plus sur RESCO II : [http://www.ifremer.fr/observatoire\\_conchylicole](http://www.ifremer.fr/observatoire_conchylicole)**

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



En terme opérationnel, ces partenaires du réseau VELYGER ont organisé et mené les collectes des naissains de captage nécessaires aux travaux de l'action QUALIF. De même, de nombreux ostréiculteurs ont autorisé l'approvisionnement à titre gracieux des naissains à étudier depuis leurs stocks en élevage. Merci à l'ensemble de ces personnes pour la qualité de leur investissement.

Par ailleurs, l'action QUALIF s'est appuyée sur les compétences des personnes en charge du fonctionnement du réseau VELYGER pour définir par site les points de prélèvement des naissains de captage nécessaires à la mise en œuvre de l'étude de qualification zoo-sanitaire.

# 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 en difficulté suite aux épisodes de mortalité qui touchent 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.*, 2013a). L'épizootie responsable des mortalités de naissains a été associée à l'émergence du virus OsHV-1  $\mu$ 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 (Pernet *et al.*, 2014, Petton *et al.*, 2015a).

Le transfert des huîtres d'un site à un autre est un facteur de risque sanitaire majeur par la capacité de vectoriser les pathogènes et/ou les maladies. En effet, des naissains de captage naturel peuvent être infectés par le virus OsHV-1  $\mu$ Var en période hivernale ( $T^{\circ}$  eau de mer < 16°C) en l'absence de mortalité et sans signe apparent de maladies. Cela a été mis en évidence lors des travaux de qualification zoo-sanitaire des naissains menés entre 2010 et 2013 (Petton *et al.*, 2015a). Lors de ce travail, il a été montré que 19 des 30 lots de naissains issus de captage naturel étudiés étaient infectés par le virus OsHV-1  $\mu$ Var en dehors de la période des mortalités (eau de mer < 16 °C). La détection d'OsHV-1  $\mu$ Var par qPCR pendant l'épreuve de qualification était associée à des mortalités. La qualification zoo-sanitaire en laboratoire, d'une durée de 30 jours, est basée sur une élévation de l'eau de mer à 21°C favorable à la réplication du virus dans l'huître (Petton *et al.*, 2015a, 2015b).

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 *Crassostrea angulata* à la fin des années 1960. A ces deux sites, il convient désormais d'ajouter ceux de la baie de Bourgneuf, de l'embouchure de la Vilaine ainsi que certains secteurs de la rade de Brest (Pouvreau *et al.*, 2011, 2013). Enfin, l'activité de captage dans l'étang de Thau émerge depuis 4 ans sous l'impulsion du projet régional PRONAMED (Lagarde *et al.*, 2013). Le réseau VELYGER repose sur le suivi d'une série de descripteurs adaptés sur 5 sites (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. Les résultats du réseau VELYGER en terme de reproduction et de réussite du captage pour l'année 2014 ont révélé une forte variabilité entre sites (Pouvreau *et al.* 2015).

Dans ce contexte, l'objectif principal de l'action QUALIF était de réaliser une qualification zoo-sanitaire des naissains de 6 sites de captage en France. Ainsi en 2014, ce travail a permis l'étude de 20 échantillons de naissains nés pendant l'été 2013 et prélevés l'hiver suivant dans l'étang de Thau, le bassin d'Arcachon, le bassin de Marennes Oléron, la baie de Bourgneuf, la Vilaine et en rade de Brest. Les résultats obtenus étaient proches de ceux des travaux menés entre 2010 et 2013 (environ 1 lot de naissains sur 2 était porteur latent d'OsHV-1  $\mu$ Var). De plus, la synthèse des résultats de cette première campagne nationale a mis en évidence une augmentation du nombre d'échantillons de naissains infectés depuis le site le plus au sud (étang de Thau, 0 %) jusqu'à celui le plus au nord (rade de Brest, 100 %). Au terme de cette première campagne de qualification, la reconduction de l'action QUALIF

a été décidée afin d'étudier la variance temporelle du statut zoo-sanitaires des naissains de captage des 6 sites d'étude (Petton *et al.*, 2015c).

Les objectifs de l'action QUALIF en 2015 étaient similaires à ceux affichés en 2014 : (1) l'étude nationale zoo-sanitaire précoce des naissains du captage 2014, (2) la simplification de l'épreuve de qualification zoo-sanitaire, (3) l'évaluation de la survie des naissains de captage dans le milieu naturel lors d'une période infectieuse.

## 2. Matériel & méthodes

### 2.1. Naissains 'NSI' témoin

Pour appréhender l'étude du statut zo-sanitaire des lots de naissains de captage 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, 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 par l'utilisation d'un nombre élevé 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.*, 2013a, 2015a et b, Goudenège *et al.*, 2014, Lemire *et al.*, 2014). Au total, 6 000 NSI âgés de 5 à 8 mois ont été utilisés comme témoin dans le cadre de l'action QUALIF 2015.

### 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  $\mu$ Var et de bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été développées puis transférées par le laboratoire LGP2M (Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins) de l'Ifremer, dans le cadre de ses missions de Laboratoire National de Référence, à un réseau de 9 laboratoires agréés et de 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  $\mu$ Var, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être réalisée 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 d'OsHV-1  $\mu$ Var supérieures à  $10^4$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissus frais sont le signe d'une répllication active du virus dans l'hôte et témoignent de son action dans la maladie. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode située à environ  $10^2$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissus frais. Cette limite est de nature analytique, liée au seuil de détection qui empêche l'identification 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  $\mu$ Var, basée sur l'application d'un choc thermique (Petton *et al.*, 2013b, Petton, 2015a). 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 adéquat pour les naissains (ce qui est vérifié par l'utilisation d'huîtres témoin saines). 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 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 de référence

Lors de l'épreuve de qualification zoo-sanitaire, les naissains étudiés dénommés « TEST » ont été placés en cohabitation avec un lot NSI témoin (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. Chaque échantillon TEST a été placé à son arrivée au laboratoire dans un seul bac contrairement à la campagne QUALIF précédente où ils étaient placés en deux bacs. Ce changement méthodologique avait pour objectif de permettre d'augmenter le nombre d'échantillons testés. Cette modification a été rendue possible au regard de la bonne reproductibilité des résultats de chaque échantillon étudié en ETL en 2014, que se soit en terme d'observations des mortalités ou en terme de détection d'OsHV-1  $\mu$ Var (Petton *et al.*, 2015c).



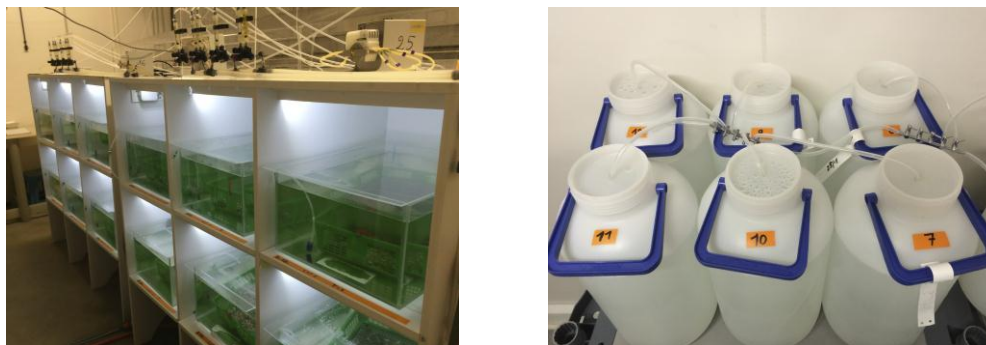
*Figure 1. Illustration de la cohabitation organisée pendant l'épreuve thermique de laboratoire (ETL), avec (de gauche à droite) le panier avec l'échantillon de naissains TEST (en bas) et son témoin NSI (en haut), puis son immersion dans de l'eau de mer à 21°C pour une durée de 30 jours marquant le début de l'ETL.*

Après nettoyage et dénombrement, les naissains TEST étaient placés dans un bac d'un volume de 50 L en cohabitation organisée avec environ 100 NSI témoin (Fig. 1, photo de gauche). Les bacs étaient alimentés de manière continue en eau de mer ( $\approx 34$  PSU) préalablement filtrée à  $1 \mu\text{m}$  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 plus témoin). Les débits relevés variaient de  $50$  à  $300 \text{ mL min}^{-1}$  selon les biomasses de naissains mises en épreuve. Il était réglé pour avoir une concentration en oxygène mesurée à la sortie du bac entre  $60\%$  et  $70\%$  de la saturation. Ensuite, un apport d'air, via un diffuseur poreux, était mis en place pour atteindre, puis maintenir pendant l'ETL, un niveau d'oxygène supérieur à  $90\%$  de la saturation. La température de l'eau de mer était comprise entre  $20^\circ\text{C}$  et  $21^\circ\text{C}$  pendant les 30 jours 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*, CCAP 927/14, volume et poids cellulaires moyens :  $40 \mu\text{m}^3$ ,  $12 \text{ pg cell}^{-1}$ ) et de *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3, volume et poids cellulaires moyens :  $80 \mu\text{m}^3$ ,  $25 \text{ pg cell}^{-1}$ ). 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  $\text{mL}^{-1}$  (*T. lutea*). La distribution du phytoplancton dans les bacs de conditionnement était continue dans le flux d'eau de mer. 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  $100 \mu\text{m}$  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 utile 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  $21^\circ\text{C}$  pendant une période de 30 jours était suffisante pour révéler leur statut zoo-sanitaire. 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 en l'absence de cohabitation avec des NSI témoins. Dans le cadre de l'ETL en version simplifiée, chaque échantillon de naissains TEST a été placé dans un bidon en plastique alimentaire translucide d'un volume unitaire de 10 L (Fig. 2, photo de droite).



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

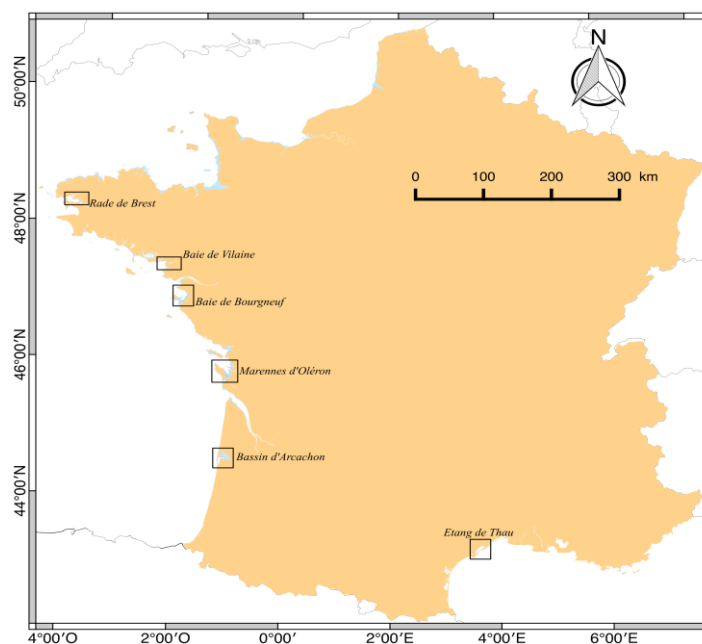
En début d'épreuve, environ 100 à 150 naissains TEST ont été disposés dans chaque bidon. Après la mise en eau des naissains, les bidons étaient fermés par un couvercle percé en son centre pour permettre le passage d'un tuyau amenant l'air jusqu'à un diffuseur placé au fond du bidon. L'aération de l'eau de mer assurait 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 du bidon. Lors de cette opération, un bilan de la survie des naissains était réalisé. 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. Echantillonnage et qualification des naissains

### 2.3.1. Sites et prélèvements

En terme opérationnel, l'action QUALIF s'est adossée à la structure VELYGER en place depuis 2011 sur les 5 sites étudiés. En plus de ces sites, la baie de Vilaine a été incluse dans QUALIF par l'intérêt de cette zone pour l'activité de captage des naissains (Fig. 3). C'est donc au total sur 6 sites qu'a porté l'étude QUALIF de qualification zoo-sanitaire des naissains issus du captage naturel de 2014.

Pour chacun des 6 sites, les points de prélèvement des naissains correspondaient aux zones de captage des ostréiculteurs. Le nombre d'échantillons étudiés en 2015 a été doublé par rapport à celui de la campagne précédente de qualification afin d'améliorer la représentativité de l'étude nationale et d'aborder les effets à petite échelle (par un nombre accru de prélèvements dans un même site).



**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 2014.**

Ce sont au total 39 lots TEST de naissains de captage de la saison de reproduction de 2014 prélevés dans les 6 sites nationaux qui ont fait l'objet de la qualification (Tableau 1). Ces 39 échantillons comportaient : 2 lots de l'étang de Thau, 10 du bassin d'Arcachon, 7 de Marennes Oléron (dont 1 prélevé à l'embouchure de la Gironde), 8 de la baie de Bourgneuf, 4 de l'embouchure de la Vilaine et enfin 8 de la rade de Brest (Tableau 1). Le nombre d'individus par lot TEST variait d'un minimum de 100 naissains pour les 2 lots de l'étang de Thau à un maximum de 1415 naissains pour un des 4 lots captés en Vilaine (Tableau 1). Signalons que pour cet écosystème de faible superficie ( $\approx 3 \text{ km}^2$ ), les 4 échantillons provenaient de 2 parcs limitrophes.

**Tableau 1. Caractéristiques des échantillons des naissains du captage 2014 pour chacun des sites de l'étude zoo-sanitaire en épreuve thermique de laboratoire de l'action QUALIF 2015 : origine géographique, nombre, poids total (g) et poids moyens (g) des 39 lots TEST et des NSI témoin placés en cohabitation pendant l'épreuve.**

Caractéristiques des lots TEST en ETL					Caractéristiques des lots NSI témoin		
Sites	Secteurs	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)	Nbre	Poids total (g)	Poids moyen (g)
<b>Etang de Thau</b>	Marseillan	100	477	4,8	100	17,6	0,18
	Bouzigues	100	1197	12	100	21	0,21
<b>Bassin d'Arcachon</b>	Lucarnan Est	218	52	0,24	100	37	0,37
	Lucarnan Ouest	149	82	0,55	100	39	0,39
	Lucarnan centre	178	24	0,14	100	39	0,39
	Le Cla	456	140	0,31	100	42	0,42
	Villa Algérienne	160	48	0,30	100	41	0,41
	Bélisaire	584	201	0,35	100	42	0,42
	Cailloc	457	200	0,44	100	41	0,41
	Graouères	352	100	0,28	100	39	0,39
	Comprian	160	27	0,17	100	35	0,35
	Grand banc	651	150	0,23	100	40	0,40
<b>Marennes Oléron</b>	Longées 1	200	338	1,69	100	38	0,38
	Longées 2	293	123	0,42	100	45	0,45
	Seudre 1	302	285	0,94	100	46	0,46
	Seudre 2	300	140	0,46	100	44	0,44
	Mouclières 1	198	265	1,33	100	47	0,47
	Mouclières 2	299	277	0,92	100	44	0,44
	Gironde	300	60	0,20	100	43	0,43
<b>Baie de Bourgneuf</b>	Bernerie Sud 1	250	121	0,48	98	23	0,24
	Bernerie Sud 2	200	133	0,67	98	23	0,24
	Bernerie Sud 3	249	180	0,72	107	23	0,21
	Les Moutiers	275	74	0,30	102	23	0,23
	Les Plaintives	343	167	0,49	103	22	0,22
	Bernerie Nord 1	150	130	0,87	112	23	0,20
	Bernerie Nord 2	200	107	0,53	101	23	0,23
	La Northe	200	71	0,36	121	21	0,17
<b>Baie de Vilaine</b>	Tréhiguier 1	189	156	0,82	100	101	1,01
	Tréhiguier 2	350	256	0,73	100	103	1,03
	Tréhiguier 3	500	141	0,28	100	102	1,02
	Tréhiguier 4	1415	255	0,18	100	103	1,03
<b>Rade de Brest</b>	Mengleuz 1	200	480	2,45	95	87	0,92
	Mengleuz 2	200	581	2,90	95	84	0,89
	Sillon des Anglais	200	343	1,71	100	83	0,83
	Lomergat	200	340	1,70	100	88	0,88
	Pte du château	200	285	1,42	100	87	0,87
	Riv. Daoulas	200	352	1,76	100	128	1,28
	Prioldy 1	200	473	2,36	100	110	1,10
	Prioldy 2	190	545	2,86	100	102	1,02

Les poids moyens des naissains des 39 lots testés étaient compris entre un minimum de 0,14 g pour le lot capté à Lucarnan centre dans le bassin d’Arcachon et un maximum de 12 g pour les naissains de Bouzigues dans l’étang de Thau (Tableau 1). La moyenne des poids de naissains pour tous les lots testés sur ces 2 écosystèmes a montré les valeurs les plus extrêmes avec respectivement 0,3 g ( $\pm 0,1$ ) et 4,8 g ( $\pm 5$ ) (Fig. 4). Signalons que les poids moyens des naissains captés à Arcachon étaient surévalués par les résidus de chaux qui sont restés accrochés après le nettoyage. La faible valeur de poids moyen des naissains échantillonnés à Arcachon est remarquable par rapport aux valeurs des moyennes pour les autres sites (Fig. 4). Cela peut être la conséquence du captage exceptionnel (fortes densités de naissains sur les coupelles) qui a pu conduire à une limitation de la nourriture disponible à petite échelle, même si les concentrations en chlorophylle *a*, à grande échelle, étaient *a priori* dans la normale en 2014 pour Arcachon (Pouvreau *et al.*, 2015). Par contre, la forte différence de poids moyens entre les 4 échantillons de Vilaine peut s’expliquer par les opérations de tri mécanique effectuées avant le prélèvement des échantillons, au moment du détroquage début 2015, à la différence des lots des autres sites. Signalons enfin que les naissains de la rade de Brest avaient un poids moyen intermédiaire de 2,1 g ( $\pm 0,6$ ) et que la variance intra-site des poids moyens des échantillons est restée inférieure à celle la variance inter-sites.

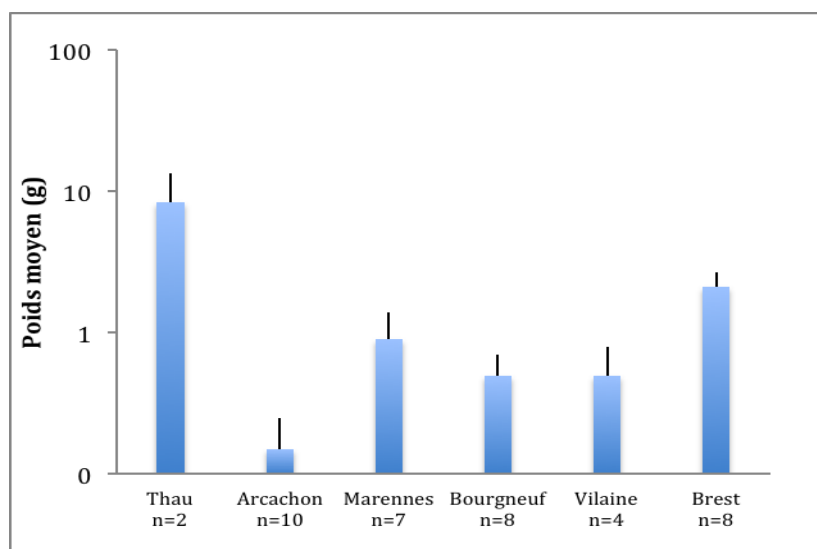


Figure 4. Poids moyens des naissains du captage de l’année 2014 par écosystème étudiés entre le 23 janvier et le 26 mars 2015 (exprimés en g, avec écart type ; échelle logarithmique) ; *n* = nombre de lots par écosystème.

Les premiers lots de naissains de captage TEST ont été réceptionnés à Argenton fin janvier (les 23 et 29/01/2015), en provenance de la baie de Bourgneuf et de l’étang de Thau respectivement. La seconde série d’expéditions a eu lieu en février pour les naissains d’Arcachon et de Marennes Oléron (reçus respectivement les 20 et 25/02/2015). Enfin en mars, les derniers lots ont été expédiés de la rade de Brest (le 19/03/2015) et de l’embouchure de la Vilaine (le 26/03/2015). Tous les échantillons ont été prélevés dans leur site d’origine alors que la température de l’eau de mer était inférieure à 14°C (Petton *et al.*, 2013b, 2015a).

## 2.3.2. Qualification zoo-sanitaire

Les qualifications zoo-sanitaires en ETL (de référence et simplifiée) ont commencé immédiatement après réception des échantillons TEST des naissains de captage. Deux lots NSI utilisés comme témoins pendant ces qualifications ont été étudiés séparément en ETL, d'abord au début du mois de janvier 2015 puis à la mi-février 2015. Le suivi simultané des performances de 33 lots de naissains TEST en ETL référence et ETL simplifiée a permis la comparaison des deux méthodes de qualification zoo-sanitaire (Tableau 2).

*Tableau 2 : Caractéristiques des échantillons des naissains du captage 2014 par écosystème et NSI témoin utilisés lors du comparatif méthodologique (ETL référence vs ETL simplifiée) prévu dans l'action QUALIF 2015 : origine géographique, nombre, poids total (g) et poids moyens (g) des 33 lots de captage et des 2 lots NSI témoin.*

		ETL REFERENCE			ETL SIMPLIFIEE		
Sites	Secteurs	Nbre naissains	Poids total (g)	Poids moyen (g)	Nbre naissains	Poids total (g)	Poids moyen (g)
<b>Etang de Thau</b>	Marseillan	100	477	4,8	60	127	2,11
	Bouzigues	100	1197	12	60	569	9,50
<b>Bassin d'Arcachon</b>	Le Cla	456	140	0,31	100	30	0,30
	Caillac	457	200	0,44	100	65	0,65
	Graouères	352	100	0,28	100	23	0,23
	Grand banc	651	150	0,23	100	29	0,29
<b>Marennes Oléron</b>	Longées 1	200	338	1,69	100	161	1,61
	Longées 2	293	123	0,42	124	41	0,33
	Seudre 1	302	285	0,94	150	81	0,54
	Seudre 2	300	140	0,46	130	98	0,75
	Moulières 1	198	265	1,33	100	126	1,26
	Moulières 2	299	277	0,92	119	85	0,71
	Gironde	300	60	0,20	168	33	0,19
<b>Baie de Bourgneuf</b>	Bernerie Sud 1	250	121	0,48	100	83	0,83
	Bernerie Sud 2	200	133	0,67	100	48	0,48
	Bernerie Sud 3	249	180	0,72	100	48	0,48
	Les Moutiers	275	74	0,30	100	29	0,29
	Les Plaintives	343	167	0,49	99	45	0,45
	Bernerie Nord 1	150	130	0,87	112	58	0,51
	Bernerie Nord 2	200	107	0,53	101	83	0,82
	La Northe	200	71	0,36	106	39	0,36
<b>Baie de Vilaine</b>	Tréhiguier 1	189	156	0,82	100	69	0,69
	Tréhiguier 2	350	256	0,73	200	132	1,16
	Tréhiguier 3	500	141	0,28	183	57	0,31
	Tréhiguier 4	1415	255	0,18	200	55	0,27
<b>Rade de Brest</b>	Mengleuz 1	200	480	2,45	100	246	2,46
	Mengleuz 2	200	581	2,90	71	204	2,87
	Sillon des Anglais	200	343	1,71	100	133	1,33
	Lomergat	200	340	1,70	100	97	0,97
	Pte du château	200	285	1,42	100	180	1,80
	Riv. Daoulas	200	352	1,76	100	173	1,73
	Prioldy 1	200	473	2,36	100	287	2,87
	Prioldy 2	190	545	2,86	100	313	3,13
<b>NSI témoin</b>	01/2015	107	23	0,21	107	23	0,21
	01/2015	371	202	0,54	100	38	0,38



## 2.4. Suivi *in situ* des mortalités des naissains

Pour faciliter l'interprétation des résultats de la qualification zoo-sanitaire en ETL, il nous a semblé important de pouvoir estimer les survies des lots TEST des naissains de captage dans le milieu naturel en période infectieuse (température de l'eau de mer  $>16^{\circ}\text{C}$ ). Pour cela, à chaque réception de naissains TEST au site expérimental Ifremer d'Argenton, 100 à 120 individus de chaque échantillon de captage ont été placés dans une poche ostréicole, disposée aléatoirement sur une des cinq tables ostréicoles d'un site à la Pointe du Château en rade de Brest choisi comme « jardin commun » pour ce suivi de mortalités *in situ* (Fig. 5, photo de gauche). Les poids moyens des échantillons de naissains transférés pour ce suivi étaient comparables à ceux des naissains demeurés en laboratoire pour la qualification zoo-sanitaire en ETL (Tableau 1).

Pour ce suivi en « jardin commun », 49 poches ostréicoles ont été transférées à la Pointe du Château entre le 24 janvier et le 26 mars 2015. Elles correspondaient aux 39 échantillons TEST de naissains de captage prélevés dans les 6 sites, avec en plus 10 lots de NSI témoin. Le transfert en rade de Brest de ces échantillons TEST s'est fait, comme pour les ETLs, immédiatement après la réception des lots (soit sans immersion transitoire en eau de mer).

Le site de la Pointe du Château (site atelier des réseaux RESCO II et VELYGER) était instrumenté avec des sondes permettant la mesure et l'enregistrement à haute fréquence (toutes les 30 minutes) de la température et de la salinité à proximité des poches ostréicoles (Fig. 5, photo de droite). Les données de ces relevés ont été archivées dans la base nationale publique Quadrigé<sup>2</sup> (Petton *et al.*, 2016). Placé à proximité des tables du suivi « jardin commun », le lot NSI sentinelle du RESCO (le même lot NSI que celui utilisé dans l'action QUALIF) a fourni des données en 2015 qui ont servi à l'action QUALIF pour ce suivi des mortalités en milieu naturel.

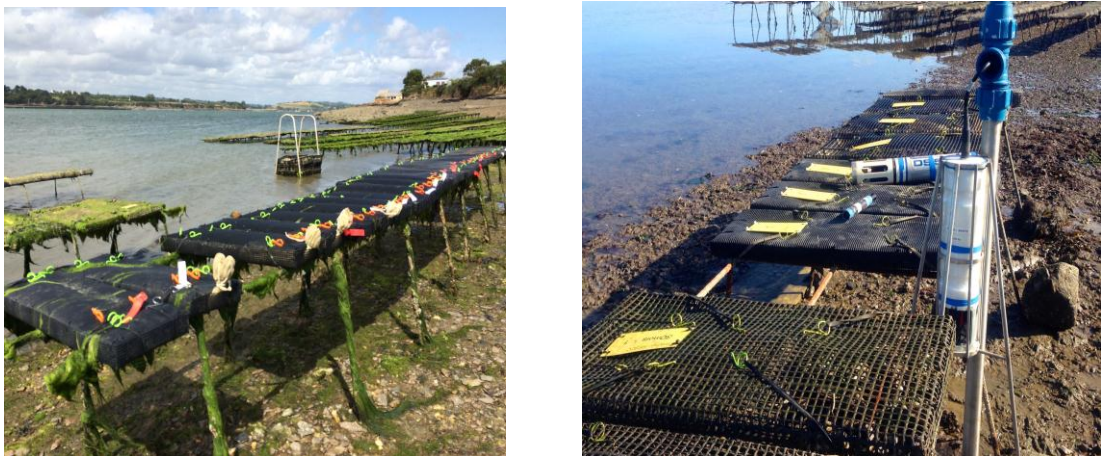


Figure 5. Site de la Pointe du Château en rade de Brest : (photo de gauche) poches et tables ostréicoles du suivi en « jardin commun » organisé dans QUALIF 2015 pour l'estimation de la survie des naissains du captage 2014 en milieu naturel infectieux (printemps et été 2015) ; (photo de droite) sondes permettant l'acquisition haute fréquence (toutes les 30 mn) des valeurs de température et de salinité de l'eau de mer à proximité des poches ostréicoles du suivi.



## 2.5. Paramètres mesurés

### 2.5.1. Mortalité des naissains TEST et témoin

En laboratoire, le relevé de la mortalité des naissains TEST et témoin pendant l'ETL a servi à qualifier l'état zoo-sanitaire de l'échantillon en expertise. Une valeur de mortalité significative supérieure à 5 % de l'échantillon TEST a été considérée comme un indicateur d'une maladie en cours. Une valeur de mortalité inférieure à 5 % pouvait être une simple conséquence de l'opération mécanique du détroquage. Le diagnostic du caractère infectieux des maladies a quant à lui été établi dès la première observation de mortalité chez les naissains NSI témoin placés en cohabitation avec les naissains TEST dans la même structure. Pendant l'ETL, un dénombrement des naissains morts a été effectué tous les 10 jours (à j0, j10, j20 et j30) pour les deux configurations de l'ETL (référence et simplifiée).

En milieu naturel, un relevé des mortalités a été fait pour les 49 lots de naissains (TEST et témoin) aux dates suivantes : 20/04, 06/05, 18/05, 22/05, 01/06, 05/06, 09/06, 02/07, 30/07. Le bilan final du suivi a eu lieu le 31 août 2015.

### 2.5.2. Détection de la présence du virus

Pour la qualification zoo-sanitaire en ETL, des prélèvements complémentaires d'huîtres entières vivantes des lots TEST et témoin ont été réalisés avant et pendant l'ETL. Chaque prélèvement était constitué de 2 fois 5 naissains (soit 2 répliquats). Tous les lots TEST et leurs témoins ont été prélevés suivant un même calendrier, soit avant le début de l'épreuve (à j0) puis pendant l'épreuve (à j10). De plus pendant ETL, les premiers animaux morts avec chair (TEST et témoin) ont été prélevés.

Des analyses individuelles de détection d'OsHV1  $\mu$ Var ont été menées *a posteriori* sur 30 individus pour 6 lots de naissains TEST prélevés avant le début de l'ETL. Le choix de ces 6 lots TEST a été fait selon le niveau de la mortalité relevée sur les NSI témoin de chaque lot, *i.e.* 0 %, 20 % et 40 % de mortalité, à raison de 2 lots TEST par niveau de mortalité. Les prélèvements ont été conservés à -20°C puis envoyés au laboratoire LABOCEA Bretagne Océane pour analyses qPCR. La méthode utilisée est celle décrite par Pépin *et al.* (2008), qui fournit une donnée qualitative et quantitative de l'ADN viral présent dans les échantillons, dans les limites de détection de la qPCR. En cas de détection d'ADN d'OsHV-1  $\mu$ Var, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique a été réalisée.

## 3. Résultats

### 3.1. ETL référence

#### 3.1.1. Bilan par site

##### 3.1.1.1. Etang de Thau

Les 2 lots de naissains TEST captés dans l'étang de Thau n'ont pas révélé de mortalité supérieure à 5 %, valeur seuil fixée en ETL (Fig. 6). La valeur moyenne des mortalités de ces 2 lots TEST était de 1,6 % ( $\pm 0,7$ ), tandis que la valeur moyenne de mortalité pour les NSI témoin en cohabitation avec ces deux lots TEST ont atteint 2,7 ( $\pm 3,8$ ) %. Au terme de l'ETL, seuls les NSI témoin placés en cohabitation avec les naissains TEST de Bouzigues révélèrent des mortalités avec une valeur de 5,4 % (Fig. 6).

Toutes les analyses qPCR effectuées sur les 2 lots TEST (2 à j0 et 4 à j10 de l'ETL) étaient négatives à la détection d'ADN viral d'OshV1  $\mu$ Var pour les naissains TEST et témoins.

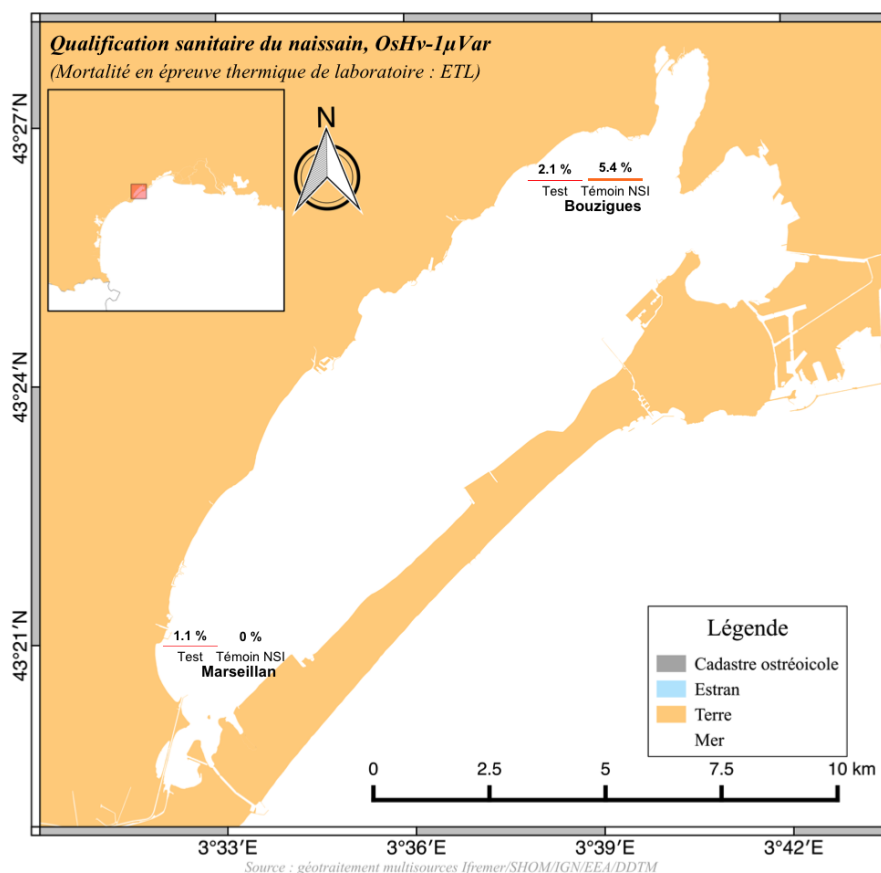


Figure 6. Mortalités (%) des lots TEST et leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 prélevés dans l'étang de Thau.

### 3.1.1.2. Bassin d’Arcachon

Sur les 10 lots de naissains captés à Arcachon, 6 lots TEST et leurs témoins respectifs ont révélé des mortalités > à 5 % au terme de l’ETL (Fig. 7). Les 4 autres échantillons TEST et leurs témoins ont présenté peu ou pas de mortalité (< 5 %). La valeur moyenne de la mortalité des 10 échantillons TEST s’établissait à 6,6 % ( $\pm 5,5$ ) ; elle était inférieure à celle relevée pour les 10 lots de NSI témoin (15,9 %  $\pm 16,6$ ). Les naissains de captage prélevés à Grand Banc se distinguaient en ETL avec les plus fortes mortalités pour les lots TEST et témoins, de 14,8 % et 43,6 % respectivement.

Les 10 analyses initiales de détection d’ADN viral effectuées sur les lots TEST étaient négatives. Par contre, à j10 de l’ETL, les analyses sont devenues positives pour les lots TEST et leurs témoins avec mortalité. Les valeurs variaient de  $4,94.10^4$  à  $5,26.10^6$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus pour les naissains TEST et de  $4,11.10^6$  à  $1,67.10^8$  pour les NSI témoin. La détection d’OsHV1  $\mu$ Var demeurait également négative pour les naissains de Lucarnan Ouest et leurs témoins pour lesquels de faibles mortalités avaient été relevées en ETL (8,4 % et 6,6 %) ainsi que pour les 4 lots TEST et témoin sans mortalité (Le Cla, Lucarnan centre et Est, Villa Algérienne).

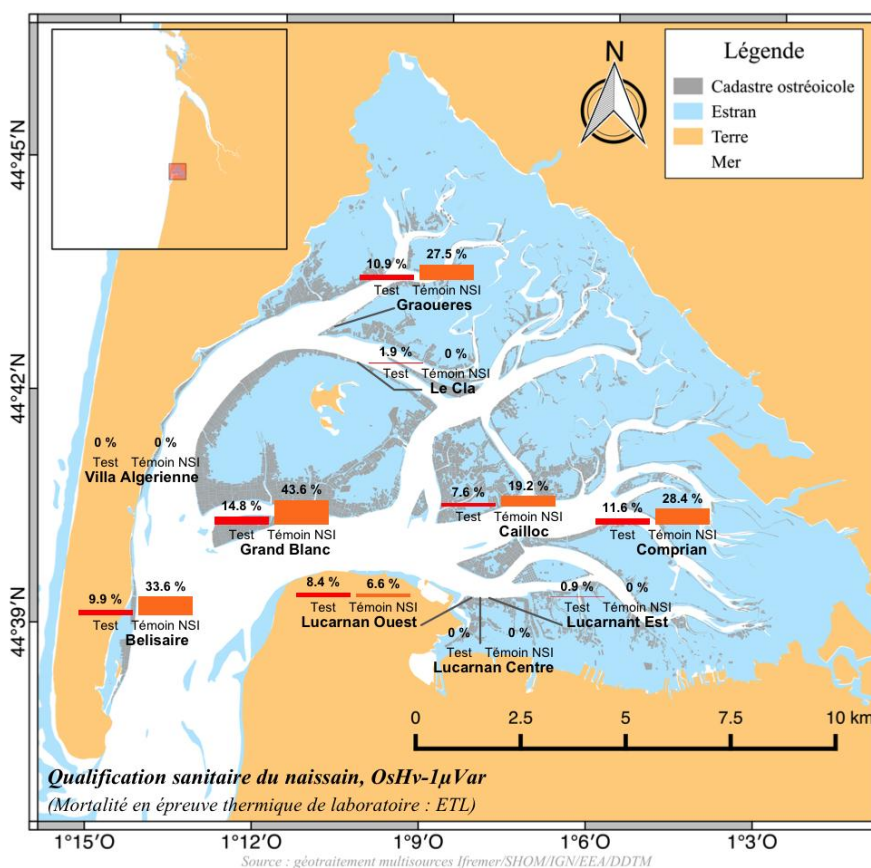


Figure 7. Mortalités (%) des lots TEST et leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 prélevés dans le bassin d’Arcachon.

### 3.1.1.3. Marennes-Oléron

Sur les 7 lots de naissains des Pertuis Charentais, 2 lots TEST et 3 lots témoins (dont les deux témoins des deux TEST avec mortalité) ont exprimé des mortalités  $>$  à 5 % au terme de l'ETL (Fig. 8). La valeur moyenne de la mortalité des 7 lots TEST s'établissait à 5,8 ( $\pm$  6,8) %, inférieure à celle de 16,7 % ( $\pm$  21,9) relevée pour les 10 témoins. Les naissains de captage des Longées 1 se sont distingués au terme de l'ETL avec une faible mortalité (2,5 %) mais avec une valeur de mortalité très élevée pour leurs témoins NSI (44,5 %).

Les analyses qPCR menées avant l'ETL sur les naissains des 7 lots de captage étaient négatives. Par contre, après 10 jours en ETL, les analyses des naissains des 2 lots TEST avec mortalité et leurs témoins étaient positives à la détection d'OsHV1  $\mu$ Var ( $1,45.10^7$  et  $2,74.10^8$  copies.  $mg^{-1}$  de tissus). Les résultats des analyses qPCR du lot des Longées 1 étaient faiblement positifs ( $<$   $4.10^4$  copies d'ADN viral.  $mg^{-1}$  de tissus), contrairement à leurs témoins (44,5 % de mortalité) qui affichaient des valeurs élevées d'ADN viral ( $2,7.10^8$  copies.  $mg^{-1}$  de tissus).

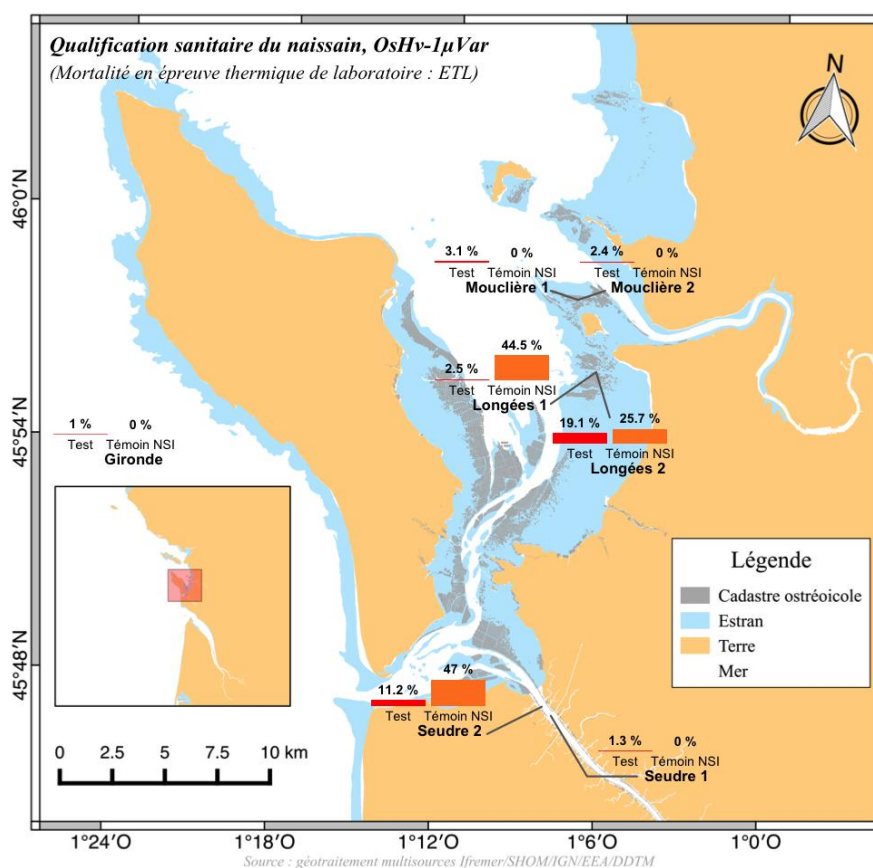


Figure 8. Mortalités (%) des lots TEST et de leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 prélevés à Marennes-Oléron.

### 3.1.1.4. Baie de Bourgneuf

Sur les 8 lots TEST de naissains captés en baie de Bourgneuf, 5 lots TEST et leurs témoins exprimaient des mortalités (> 5 %) au terme de l'ETL. Aucune mortalité n'a en revanche été observée pour les 3 autres lots TEST et leurs témoins (Fig. 9). La plus forte valeur était relevée pour un lot de la Bernerie Sud avec 42,4 %, et en parallèle 48,4 % de mortalité pour son lot NSI témoin. Les valeurs moyennes de mortalité des 10 échantillons TEST et des 10 lots témoins s'élevaient respectivement à 15,9 % ( $\pm 17,7$ ) et 20,1 % ( $\pm 19,2$ ).

Seule l'analyse qPCR à j0 de l'ETL des naissains de la Bernerie Sud 2 était faiblement positive à la détection d'OsHV1  $\mu\text{Var}$  ( $< 4.10^4$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus). Par contre, à j10, OsHV1  $\mu\text{Var}$  était détecté pour 3 lots TEST avec mortalité (Bernerie Sud 2, Bernerie Nord 2 et Les Moutiers). Les quantifications qPCR donnaient pour ces 5 analyses des valeurs identiques ( $> 2.10^8$  copies.mg<sup>-1</sup>). Pour les lots TEST avec mortalité en ETL (> 5 %) des Plaintives et de la Bernerie Sud 3, les analyses (TEST et témoin) demeuraient négatives (absence d'OsHV1  $\mu\text{Var}$ ).

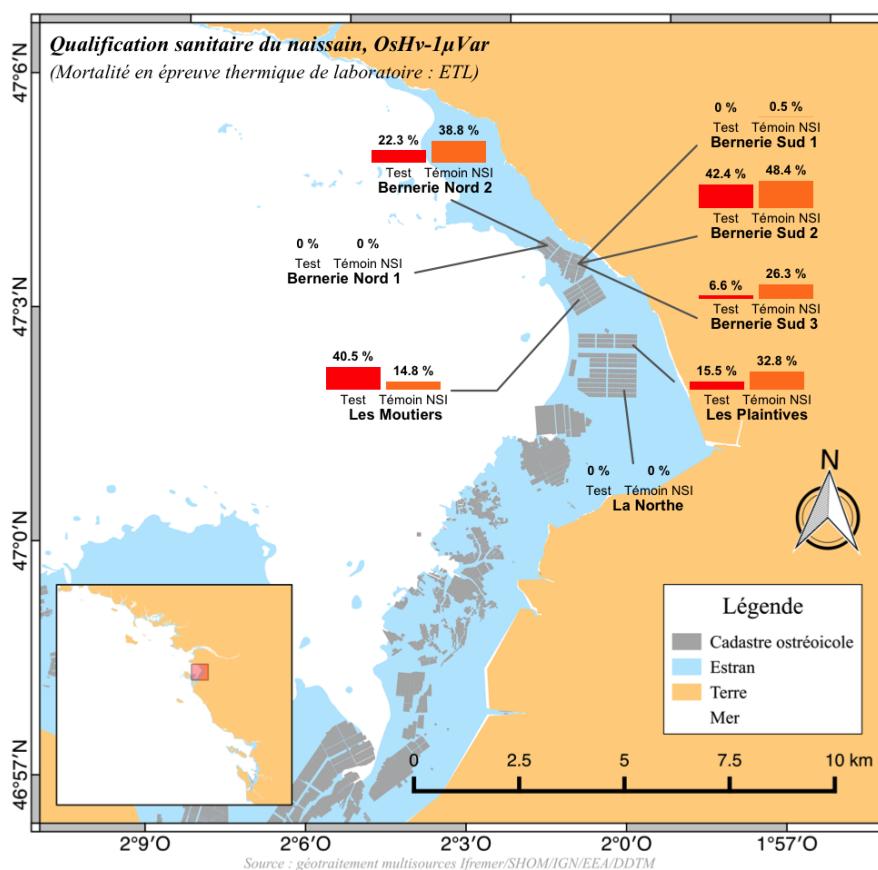
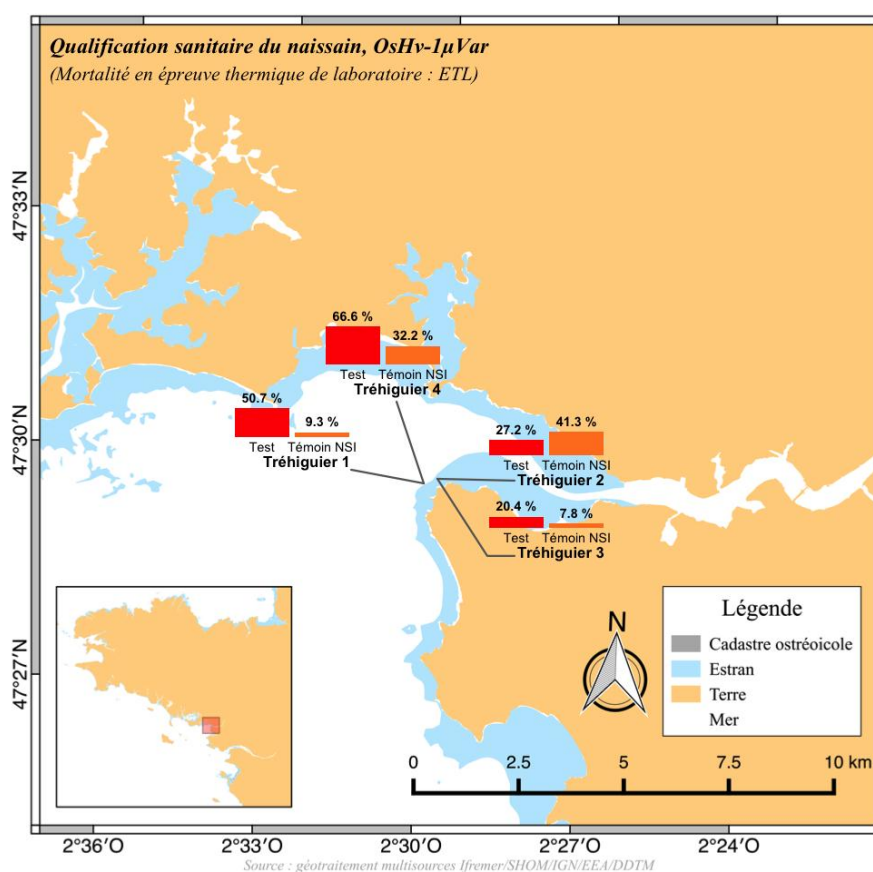


Figure 9. Mortalités (%) des lots TEST et de leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 prélevés en baie de Bourgneuf.

### 3.1.1.5. Baie de Vilaine

L'étude zoo-sanitaire des naissains captés en baie de Vilaine a montré des mortalités en ETL pour les naissains des 4 lots TEST et leurs témoins (Fig. 10). La valeur de mortalité moyenne était de 40 % ( $\pm 22,5$ ) pour les 4 lots TEST et de 22,2 % ( $\pm 16,4$ ) pour leurs témoins. Les mortalités observées en ETL se différençaient pour les lots TEST des deux exploitations ostréicoles de la zone de Tréhiguier. Elevée pour les deux lots de naissains de la première exploitation avec 58,7 % ( $\pm 11,2$ ), la mortalité était plus faible pour les deux lots de naissains TEST de la seconde exploitation (21,3 %  $\pm 1,3$ ). Les valeurs moyennes des mortalités relevées pour les naissains témoins étaient plus homogènes avec 21,3 ( $\pm 1,3$ ) % et 24,6 ( $\pm 23,7$ ) % au terme de l'ETL.

Les analyses de détection d'OshV1  $\mu$ Var menées sur les 4 lots TEST avant le début de l'ETL étaient négatives. Au jour 10, alors que les mortalités étaient en cours, 7 (4 TEST et 3 témoins) des 8 analyses mettaient en évidence une prolifération du virus. Seule l'analyse du lot de naissains témoin associée à la plus faible valeur de mortalité TEST (20,4 %) demeurait négative.



**Figure 10. Mortalités (%) des lots TEST et de leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 prélevés à l'embouchure de la Vilaine.**



### 3.1.1.6. Rade de Brest

Les 6 lots TEST ont révélé des mortalités lors de l'étude zoo-sanitaire en ETL avec une valeur moyenne de 44,0 % ( $\pm 22,6$ ) contre 24,6 % ( $\pm 12,4$ ) pour leurs témoins NSI (Fig. 11). La plus forte valeur de mortalité était relevée pour le lot TEST du sillon des Anglais (72,7 %) alors que la plus faible correspondait aux naissains de la rivière de Daoulas (6,7 %).

Les analyses qPCR menées avant le début de l'ETL sur les 8 lots TEST ne mettaient pas en évidence d'ADN viral d'OsHV1  $\mu$ Var. A j10 de l'ETL, 7 lots TEST ont montré une forte charge virale, comprise entre  $2,68.10^6$  et  $8,12.10^6$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus. Seuls les naissains TEST captés en rivière de Daoulas demeuraient négatifs en terme de détection d'ADN d'OsHV1  $\mu$ Var. La transmission du virus était confirmée pour 6 lots de NSI témoin. Enfin, seuls les résultats des analyses de détection d'ADN d'OsHV1  $\mu$ Var pratiquées pour les lots témoins avec les lots TEST de la Pointe du Château et de la rivière de Daoulas étaient négatifs à j10 de l'ETL. Les valeurs d'ADN viral pour les lots NSI témoin allaient de  $1,33.10^5$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus à une valeur supérieure au seuil de détection de  $2.10^8$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus.

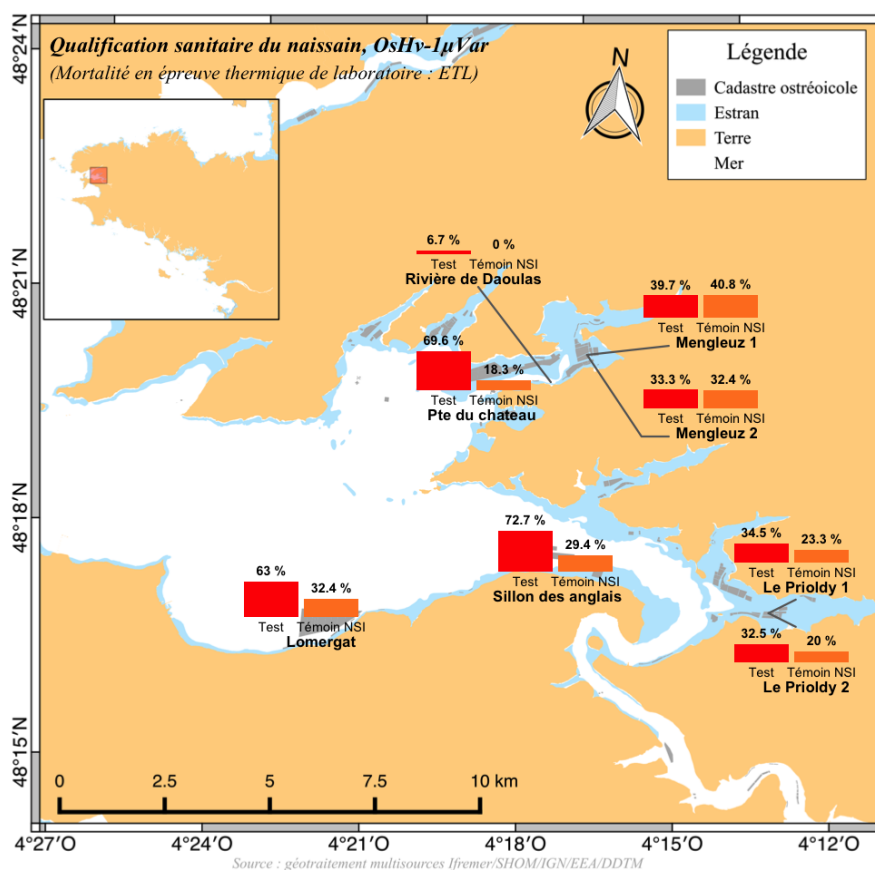


Figure 11. Mortalités (%) des lots TEST et de leurs témoins, obtenues en ETL pour les naissains de captage de 2014 en rade de Brest.

### 3.1.2. Synthèse à l'échelle nationale

#### 3.1.2.1. Pour tous les lots TEST

Les résultats de l'étude zoo-sanitaire des naissains de captage de l'année 2014 en ETL référence pour les 39 lots TEST des 6 écosystèmes étudiés et sur leurs lots NSI témoin ont été exprimés en terme de mortalités (%) et de détection d'OsHV1  $\mu$ Var par qPCR, et sont regroupés dans le Tableau 3 (annexe 1).

Les moyennes des mortalités des naissains relevées pour les 39 lots TEST étaient de 19 % ( $\pm$  18,5) et de 17,1 % ( $\pm$  7,8) pour les 39 lots NSI témoin en cohabitation (Tableau 4). Le nombre de lots TEST avec constat de mortalité > 5 % était de 25, soit 64 % des échantillons de naissains étudiés. Tous les lots témoins (100 %) en cohabitation avec ces 25 lots TEST ont subi des mortalités à la suite de celles relevées pour les lots TEST. Un seul lot NSI témoin a exprimé des mortalités importantes (44,5 %) alors que son lot TEST (Longée 1 de Marennes Oléron) ne présentait qu'une faible mortalité (2,5 %). Au final, parmi les 39 lots TEST, 26 lots (66 %) ont montré une capacité à transmettre les maladies aux NSI sains placés en cohabitation (Tableau 4).

Aucun des lots TEST de l'étang de Thau (0 %) n'a présenté de mortalité tandis qu'à l'opposé, tous les lots TEST sans exception (100 %), des deux sites de La Vilaine et de la rade de Brest ont déclaré des mortalités (> 5 %). Pour Arcachon, Marennes Oléron et Bourgneuf, la proportion de lots TEST exprimant des mortalités se situe entre 29 % et 62 % (Tableau 4).

**Tableau 4. Synthèse de l'étude de qualification zoo-sanitaire des naissains de *C. gigas* par écosystème étudié : valeurs moyennes des mortalités (%),  $\pm$  écart type) de tous les lots TEST et témoin, relevées au terme de l'épreuve thermique de laboratoire.**

Ecosystème	Nbre d'échantillons TEST expertisés	Nbre et % lots TEST avec mortalité (>5%)	Nbre et % lots témoin avec mortalité (>5%)	Moy. mortalités TEST (%)	Moy. mortalités témoin (%)
Etang de Thau	2	0 (0 %)	1 (50%)	1,6 ( $\pm$ 0,7)	2,7 ( $\pm$ 3,8)
Bassin Arcachon	10	6 (60 %)	6 (60%)	6,6 ( $\pm$ 5,5)	15,9 ( $\pm$ 16,6)
Marennes Oléron	7	2 (29 %)	3 (43%)	5,8 ( $\pm$ 6,8)	16,7 ( $\pm$ 21,9)
Baie de Bourgneuf	8	5 (62 %)	5 (62%)	15,9 ( $\pm$ 17,7)	20,1 ( $\pm$ 19,2)
Baie de Vilaine	4	4 (100 %)	4 (100%)	40,0 ( $\pm$ 22,5)	22,7 ( $\pm$ 16,7)
Rade de Brest	8	8 (100 %)	7 (88%)	44,0 ( $\pm$ 22,6)	24,6 ( $\pm$ 12,4)
Total	39 (100 %)	25 (64 %)	26 (66 %)	<b>Moy. générale 19,0 (<math>\pm</math> 18,5)</b>	<b>Moy. générale 17,1 (<math>\pm</math> 7,8)</b>

Les moyennes des mortalités des lots TEST de chaque écosystème augmentent le long d'un gradient latitudinal sud-nord, de 1,6 % ( $\pm$  0,7) pour la valeur la plus faible pour l'étang de Thau jusqu'à 44,0 % ( $\pm$  22,6) pour la plus forte valeur en rade de Brest ( $R^2 = 0,93$  ; Fig. 12). Les moyennes des mortalités des NSI témoin augmentent de façon linéaire de l'étang de Thau à la rade de Brest ( $R^2 = 0,82$  ; Fig. 12).



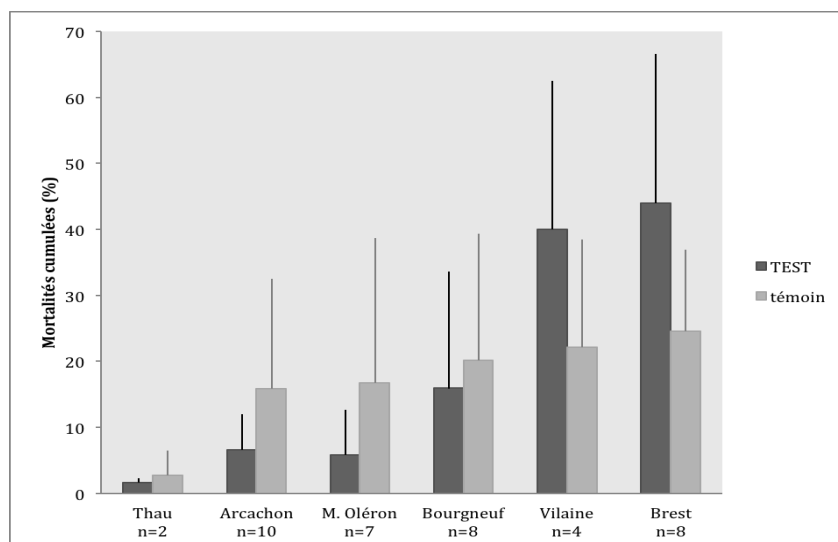


Figure 12. Moyennes des mortalités (%  $\pm$  écart type) par écosystème pour l'ensemble des lots TEST et témoin de naissains de *C. gigas* (valeurs relevées en épreuve thermique de laboratoire pour les naissains du captage de l'année 2014).

Pour 36 des 39 lots de naissains de captage étudiés (soit 92 %), la réponse en terme de présence ou absence de mortalité (seuil de 5 %) était fortement corrélée entre les lots TEST et leurs NSI témoin. En revanche, les mortalités cumulées des 39 lots TEST n'ont expliqué que partiellement celles relevées pour leurs lots NSI témoin respectifs (corrélation linéaire,  $R^2 = 0,20$ ).

### 3.1.2.2. Pour les lots TEST avec mortalité

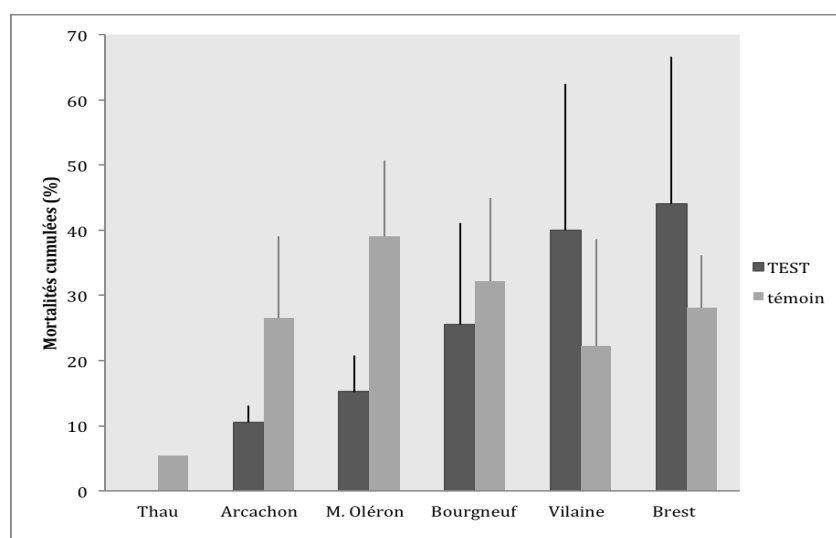
La mortalité moyenne des naissains présentant une mortalité cumulée supérieure à 5 % en ETL, pour tous les écosystèmes réunis, a été estimée à 23,8 % ( $\pm 19,2$ ) pour la condition TEST (n = 25) et à 25,4 % ( $\pm 11,4$ ) pour la condition témoin (n = 26) (Tableau 5).

Tableau 5. Synthèse des résultats de l'étude zoo-sanitaire nationale par écosystème : valeurs moyennes des mortalités (%  $\pm$  écart type) des lots TEST et témoin relevées au terme de l'épreuve thermique de qualification zoo-sanitaire.

Ecosystèmes	Nbre d'échantillons TEST avec mortalité > à 5 %	Nbre d'échantillons témoin avec mortalité	Moy. mortalités TEST (%)	Moy. mortalités témoin (%)
Etang de Thau	0	1	0	5,4
Bassin d'Arcachon	6	6	10,5 ( $\pm 2,6$ )	26,5 ( $\pm 12,6$ )
Marennes Oléron	2	3	15,2 ( $\pm 5,6$ )	39,1 ( $\pm 11,6$ )
Baie de Bourgneuf	5	5	25,5 ( $\pm 15,6$ )	32,2 ( $\pm 12,7$ )
Baie de Vilaine	4	4	40 ( $\pm 22,5$ )	22,2 ( $\pm 16,4$ )
Rade de Brest	8	7	44 ( $\pm 22,6$ )	28,1 ( $\pm 8$ )
	Total	Total	<b>Moy. générale</b>	<b>Moy. générale</b>
	25	26	<b>23,8 (<math>\pm 19,2</math>)</b>	<b>25,4 (<math>\pm 11,4</math>)</b>

Les valeurs moyennes par site des mortalités des lots TEST (avec mortalité) augmentent linéairement depuis le sud de la France vers les sites les plus au nord ( $R^2 = 0,98$  ; fig. 13). La plus faible valeur de mortalité moyenne des lots TEST correspond à l'étang de Thau (0 %) tandis que la plus forte valeur coïncide à nouveau avec la rade de Brest (44 %, cf. Tableau 4). Par contre, les mortalités moyennes par site pour les NSI témoin n'évoluent pas aussi clairement selon un gradient nord-sud (Fig. 13). En effet, la valeur de mortalité moyenne est maximale pour les NSI témoin de Marennes-Oléron, soit 39,1 %. A partir de ce site central, les mortalités moyennes pour les autres sites diminuent aussi bien vers le Sud (Arcachon et Thau) que pour les sites plus au Nord de la baie de Bourgneuf, l'embouchure de La Vilaine et de la rade de Brest (Fig. 13).

Enfin, les valeurs des mortalités moyennes des NSI témoin correspondant aux lots TEST de l'étang de Thau, d'Arcachon et de Marennes-Oléron se distinguent en étant deux fois supérieures environ aux valeurs des mortalités moyennes des lots TEST de ces mêmes sites. Ce n'est pas le cas pour la baie de Bourgneuf où les mortalités moyennes des NSI sont très proches de celles des lots TEST, ni pour La Vilaine et la rade de Brest où les mortalités moyennes des lots NSI sont environ 2 fois inférieures aux mortalités de leurs lots TEST (Fig. 13).



**Figure 13. Moyennes des mortalités (% ,  $\pm$  écart type) par écosystème des lots TEST (n=25) et témoin (n=26) présentant une valeur de mortalité cumulée  $>$  à 5 % par rapport au nombre de naissains présents au début de l'ETL.**

Les 39 analyses qPCR effectuées (sur groupes de 5 naissains) avant l'élévation de la température de l'eau de mer (à j0 de l'ETL) pour les lots TEST ont mis en évidence une détection d'OsHV-1  $\mu$ Var pour 1 seul des 39 échantillons (Bernerie Sud 2). Ce lot TEST détecté faiblement positif à OsHV1  $\mu$ Var ( $< 4.10^4$  copies.mg<sup>-1</sup> de tissus) à j0 allait révéler en ETL la valeur la plus élevée en terme de mortalité pour ce site (42,4 %, Tableau 3).

A j10 de l'ETL référence, 41 analyses qPCR positives étaient associées à des lots TEST (22 analyses) ou NSI témoin (19 analyses) présentant des fortes valeurs de mortalité ( $>$  5 %). Néanmoins, pour certains échantillons des TEST ou NSI témoin avec mortalité ( $>$  5 %), les analyses de détection de OsHV1  $\mu$ Var sont demeurées négatives (Tableau 3, annexe 1).

### 3.2. ETL simplifiée

Trente trois lots TEST ainsi que 2 lots NSI témoin ont été étudiés simultanément en ETL référence et en ETL simplifiée (Tableau 2).

La qualification zoo-sanitaire des 2 lots NSI témoin a fourni des résultats identiques en ETL référence et en ETL simplifiée, avec l'absence de mortalité et la détection négative à OsHV1  $\mu$ Var dans les deux cas (Tableau 6).

Pour les 33 lots TEST, certains résultats étaient identiques entre ETL simplifiée et ETL de référence, mais des différences au niveau d'autres résultats ont été observées entre les deux méthodologies (Tableau 6). Pour 22 des 33 lots TEST, les résultats en terme de mortalité cumulée étaient identiques entre ETL simplifiée et référence en fin d'épreuve (à j30). Et globalement pour les 33 lots TEST, les valeurs moyennes de mortalité relevées à j30 n'étaient pas significativement différente entre ETL référence (19 %  $\pm$  12,4) et ETL simplifiée (17,2 %  $\pm$  8,4). Neuf lots TEST, identiques pour les deux ETLs, ne présentaient pas ou uniquement de faibles mortalités (< 5 %) avec les deux méthodologies. De même pour 13 lots TEST, les mortalités étaient supérieures à 5 % dans les deux ETLs. En revanche, le nombre de lots TEST avec mortalité (> 5 %) était de 14 à la fin de l'ETL simplifiée, soit environ 42 % des lots TEST, contre 67 % en ETL référence (Tableau 6). Pour 11 lots TEST notamment, les deux épreuves ont fourni des résultats divergents : 7 de ces 11 échantillons TEST révélaient en ETL référence des mortalités (> 5 %) qui n'étaient pas relevées en ETL simplifiée ; et vice versa pour les 4 autres lots TEST (mortalités notées en ETL simplifiée mais absentes en ETL référence). Ces 11 lots avec des résultats finaux divergents entre les deux ETLs correspondaient au lot TEST de Grand Banc à Arcachon, aux 4 lots TEST de Marennes-Oléron, à 5 lots TEST de la baie de Bourgneuf et enfin à 1 lot TEST de Tréhiguier pour la Vilaine (Tableau 5).

Les valeurs de mortalités moyennes par site étaient plus contrastées selon la méthode d'épreuve utilisée (Fig. 14). Ce constat était particulièrement marqué pour le site de la baie de Bourgneuf avec une valeur de mortalité cumulée moyenne pour les 8 lots TEST de 15 % ( $\pm$  17,7) en ETL référence contre 1,6 % ( $\pm$  12,4) en ETL simplifiée.

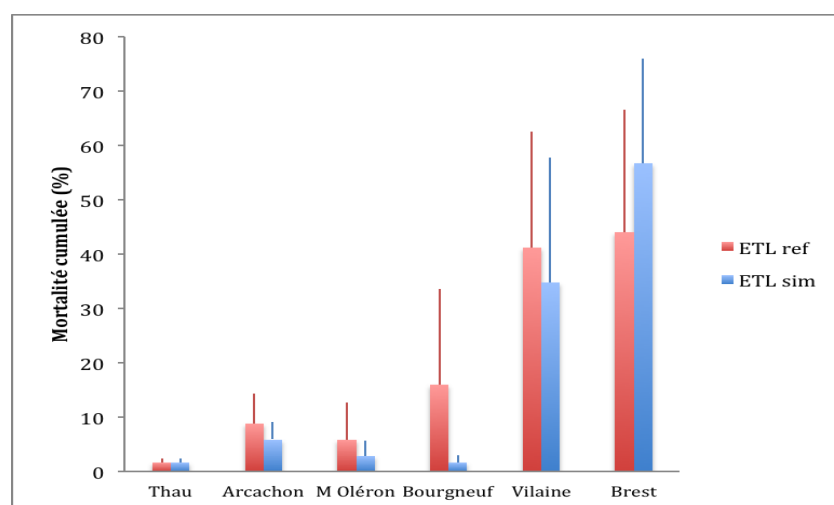


Figure 14. Moyennes des mortalités (%  $\pm$  écart type) des naissains de captage par site de prélèvement intégrant les résultats des 33 échantillons TEST étudiés en ETL référence (ETL ref) et simplifiée (ETL sim).

La finalité de l'ETL est de permettre la réplication du virus chez des porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var, difficilement détectable par qPCR. Dans ce cas de figure, les résultats des analyses de détection d'OsHV1  $\mu$ Var sur des échantillons à j10 de l'épreuve pour les 33 lots TEST a permis la détection de 20 lots positifs en ETL référence, contre uniquement 12 lots en ETL simplifiée (Tableau 6). Il faut noter que le lot de naissains captés en rivière de Daoulas (rade de Brest) demeurait négatifs en ETL référence alors que le résultat d'analyses s'était révélé positif en ETL simplifiée.

**Tableau 6. Résultats de la qualification zoo-sanitaire de 35 lots TEST en ETL référence et en ETL simplifiée : mortalité cumulée (%) et analyses de détection d'OsHV1  $\mu$ Var (à j10 de l'ETL).**

	ETL REFERENCE			ETL SIMPLIFIEE	
	Secteurs	Mortalité (%)	OsHV1 (J10)	Mortalité (%)	OsHV1 (J10)
<b>Etang de Thau</b>	Marseillan	1,1	ND	2,1	ND
	Bouzigues	2,1	ND	1,1	ND
<b>Bassin d'Arcachon</b>	Le Cla	1,9	ND	3,2	ND
	Cailloc	7,6	POS	10,4	ND
	Graouères	10,9	POS	5,4	ND
	Grand banc	14,8	POS	4,3	ND
<b>Marennes Oléron</b>	Longées 1	2,5	POS	2,1	ND
	Longées 2	19,1	POS	0	ND
	Moulières 1	3,1	ND	0	ND
	Moulières 2	2,4	ND	6,2	ND
	Seudre 1	1,3	ND	0	ND
	Seudre 2	11,2	POS	3,2	ND
	Gironde	1	ND	7	ND
<b>Baie de Bourgneuf</b>	Bernerie Sud -1	0	ND	1,1	ND
	Bernerie Sud - 2	42,4	POS	2,1	ND
	Bernerie Sud - 3	6,6	ND	2,1	ND
	Les Moutiers	40,5	POS	4,1	POS
	Les Plaintives	15,5	ND	2,1	ND
	Bernerie Nord 1	0	ND	1,1	ND
	Bernerie Nord 2	22,3	POS	0	ND
	La Northe	0	ND	0	ND
<b>Baie de Vilaine</b>	Tréhiguier 1	50,7	POS	54,4	POS
	Tréhiguier 2	27,2	POS	1,5	ND
	Tréhiguier 3	20,4	POS	39,9	POS
	Tréhiguier 4	66,6	POS	43,3	POS
<b>Rade de Brest</b>	Mengleuz 1	39,7	POS	30,7	POS
	Mengleuz 2	33,3	POS	30,3	POS
	Sillon des Anglais	72,7	POS	54,8	POS
	Lomergat	63,0	POS	70,8	POS
	Pte du château	69,6	POS	58,3	POS
	Riv. Daoulas	6,7	ND	76,9	POS
	Prioldy 1	34,5	POS	27,1	POS
	Prioldy 2	32,5	POS	35,5	POS
<b>NSI témoin</b>	01/2015	0,0	ND	0	ND
	01/2015	0,0	ND	0	ND

### 3.3. Mortalités des naissains en milieu naturel

Le bilan final des mortalités des 49 lots TEST et témoin a été effectué le 31 août 2015, après six mois en « jardin commun » en rade de Brest. La valeur moyenne des mortalités des 39 lots TEST était de 37,4 % ( $\pm 14,9$ ), et de 34,9 % ( $\pm 5,5$ ) pour les 10 lots de NSI témoin.

Tous les lots TEST ont présenté des mortalités ( $> 5$  %) au terme de la période en « jardin commun », mais avec des valeurs extrêmement variables. Ainsi, le lot de Bouzigues (étang de Thau) plus celui de Le Cla (Arcachon) présentaient les deux seules valeurs inférieures à 10 % (4,6 % et 7,2 %) alors que les deux valeurs maximales (66,3 % et 63,9 %) étaient respectivement relevées pour un lot capté en Vilaine (Tréguier 1) et pour le lot de la Pointe du Château (rade de Brest).

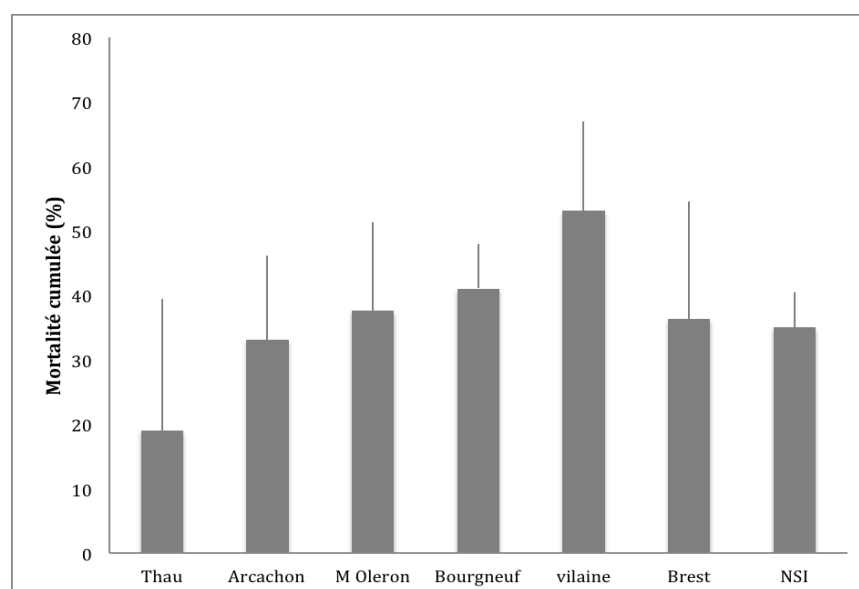


Figure 15. Moyennes des mortalités (%  $\pm$  écart type) relevées en « jardin commun » en rade de Brest pour les NSI témoin ( $n=10$ ) et les lots TEST des naissains de captage ( $n=39$ ) en fonction du site d'origine.

Les valeurs moyennes des mortalités des lots TEST par site ont augmenté de manière linéaire ( $R^2 = 0,94$ ) entre l'étang de Thau (19,0 %) et La Vilaine (53,1 %). Cette augmentation linéaire le long d'un gradient latitudinal sud-nord s'infléchissait nettement avec la valeur moyenne (36,6 %) des mortalités des 8 lots captés en rade de Brest (Fig. 15).

## 4. Discussion

### 4.1. Qualification zoo-sanitaire du captage des naissains de 2014

La seconde campagne de qualification zoo-sanitaire menée début 2015 a permis d'une part d'identifier parmi les naissains du captage de 2014 les animaux porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var, dans 5 des 6 sites étudiés, et d'autre part de mettre en évidence leur caractère infectieux. Le statut de porteurs latents du virus herpès s'est traduit systématiquement en ETL par un événement de mortalité entre 5 et 10 jours après le début de l'épreuve, quelle que soit l'origine géographique des naissains. Cette période « d'incubation » de la maladie est identique depuis 2010, année des premiers essais de qualification zoo-sanitaire en ETL (Petton *et al.*, 2015a, 2015c). Elle correspond probablement au temps nécessaire à la réplication du virus chez les naissains porteurs latents, puis au développement de la maladie jusqu'au stade ultime de mortalité pour certains des individus. Le caractère infectieux de la maladie développée par les naissains porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var a été montré comme en 2014. En effet, la contamination des NSI de la condition témoin a été constatée dans tous les cas d'une cohabitation organisée avec un lot TEST à mortalité significative (> 5 %) 48 heures après le début de la mise en contact. Les analyses qPCR ont confirmé la forte charge virale pour 88 % et 73 % des constats de mortalité cumulées (> 5 %), respectivement pour les naissains TEST et témoin. Ces valeurs de détection relevées à j10 de l'ETL sont à relier à la quasi-absence de détection à j0. Rappelons qu'à j0 une seule analyse détectait de l'ADN viral à un niveau inférieur au seuil de quantification chez des naissains TEST. C'est pourquoi, nous faisons ici l'hypothèse que l'ETL permet la réplication du virus chez des naissains porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var et le déclenchement de la maladie associée.

Au-delà de ce résultat confirmant la constance de la réponse des naissains porteurs latents en ETL en terme de développement et de transmission de la maladie, il ressort que le nombre moyen d'échantillons de naissains infectés par le virus est d'environ 1 sur 2 pour les lots TEST captés en 2014. Cette valeur ne change pas par rapport aux années précédentes (Petton *et al.*, 2015a, 2015c). Par contre, ce rapport varie entre les sites d'origine des naissains captés. En effet, les naissains provenant des sites les plus au Sud et les plus au Nord ont montré des résultats très tranchés au terme de l'ETL. Les 2 lots de naissains captés dans l'étang de Thau étaient considérés comme non infectés par le virus en l'absence de mortalité (0 %), et avec des résultats d'analyses qPCR négatives. A l'inverse, tous les lots (100%) de La Vilaine (n=4) et de la rade de Brest (n=8) ont présenté de fortes mortalités associées à une détection d'OsHV1  $\mu$ Var. Enfin, pour les 3 autres écosystèmes occupant une position latitudinale intermédiaire (Arcachon, Marennes-Oléron et Bourgneuf), la proportion de lots de naissains infectés par le virus était de 50 % en moyenne. Ce gradient latitudinal s'observe également pour la moyenne des mortalités cumulées intégrant tous les lots TEST et témoin, à la fois en ETL et pour le suivi réalisé en milieu naturel (« jardin commun » en rade de Brest). Dans les deux cas, les moyennes des mortalités par écosystème montrent une tendance marquée à progresser du Sud vers le Nord.

Dans le contexte actuel de maladies infectieuses affectant l'huître creuse, il est cependant important de souligner que les plus fortes moyennes de mortalités cumulées des NSI témoin, pour les lots en cohabitation avec les lots TEST à mortalité > 5%, correspondent à 3

sites de captage : Marennes Oléron, Arcachon et Bourgneuf (Fig. 13). Bien qu'intermédiaires en terme de pourcentage d'échantillons infectés, ces sites sembleraient se distinguer, pour les échantillons TEST détectés porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var, par une capacité d'infection plus élevée.

Ces résultats obtenus en ETL conduisent à l'hypothèse que les réponses observées lors de la qualification zoo-sanitaire des naissains naturels pourraient être liées aux conditions environnementales spécifiques à la fois aux sites et à l'année de captage. De même, il est possible qu'après 8 années consécutives de mortalité des naissains de *C. gigas*, une sélection naturelle des huîtres s'opère (la résistance à OsHV-1 ayant été démontrée comme héritable) et puisse avoir une incidence sur la sensibilité aux maladies des naissains captés, plus ou moins importante selon les sites (Dégremont *et al.*, 2011). Pour les naissains de Thau par exemple, ce processus de sélection des naissains de captage pourrait être directement lié aux huîtres en élevage plutôt qu'aux animaux sauvages présents dans l'étang en très faible biomasse.

## 4.2. Comparaison des résultats de qualification 2014 et 2015

Les deux études successives (2014 et 2015) de qualification zoo-sanitaire des naissains captés en 2013, puis en 2014, permettent de faire une comparaison interannuelle des résultats relevés en ETL. Elles ont été menées en période hivernale (température de l'eau de mer < 14°C) pour étudier les 6 mêmes zones de captage le long d'un gradient latitudinal maximal (de l'étang de Thau à la rade de Brest). Lors de la première étude en 2014 (captage 2013), 50 % des lots TEST (n=25) avaient été détectés porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var (Petton *et al.*, 2015c). Ce pourcentage atteint 64 % en 2015 (pour le captage de l'année 2014). Ces valeurs de 50 % et 64 % d'échantillons de naissains infectés par le virus en période hivernale sont très proches des celles relevées dans les études menées depuis 2010 (Petton *et al.*, 2015a). La valeur moyenne de mortalité en ETL de l'ensemble des lots TEST captés en 2013 (n=20) était de 25,0 % ( $\pm$  25,0) contre 19,0 % ( $\pm$  18,5) pour les lots TEST (n=39) du captage 2014.

Le potentiel infectieux des lots TEST présentant une valeur de mortalité cumulée > 5 % en ETL a été vérifié par le constat de mortalité des NSI témoin en cohabitation dans 83 % des cas en 2014, contre 100 % en 2015. Malgré cet écart, les valeurs moyennes des mortalités cumulées de tous les lots de NSI témoin étaient quasi-identiques en 2014 et 2015, avec respectivement 19,0 % ( $\pm$  18,0 %) et 17,1 % ( $\pm$  7,8 %). En revanche, les valeurs moyennes des mortalités des lots TEST considérés au terme de l'ETL comme porteurs latents du virus diffèrent entre les deux années d'étude, *i.e.* 40,0 % ( $\pm$  27,0) en 2014 pour les 12 lots TEST détectés infectés contre 23,8 % ( $\pm$  19,2) pour les 25 lots TEST de 2015. Enfin, la transmission des maladies en terme de mortalités des NSI témoin en cohabitation avec les lots TEST infectés s'est traduite par des valeurs moyennes de mortalité très proches pour les deux années d'étude : 29,0 % ( $\pm$  18,0) en 2014 et 25,4 % ( $\pm$  5,5) en 2015. Les coefficients de variation des valeurs de mortalités des naissains TEST et témoin en 2014 et en 2015 étaient également proches.

Les campagnes de qualification zoo-sanitaire des naissains de captage de 2013 et 2014 révèlent toutes deux que c'est l'origine géographique des naissains de captage qui apporte le plus de contraste au niveau des résultats. En effet, ce contraste en terme de mortalité des

lots TEST et témoin est très marqué entre le site le plus méridional, l'étang de Thau (0 % d'échantillons TEST infectés) et les sites les plus septentrionaux (Vilaine et rade de Brest avec 100 % d'échantillons infectés). De même, pour les 2 années, les sites géographiques médians ont présenté des résultats de qualification intermédiaires, avec environ 50 % de lots infectés. Ce gradient latitudinal se confirme également au niveau de la tendance de mortalités moyennes par site pour les lots TEST, et en terme de transmission sur les lots NSI témoin.

Trois constats majeurs, identiques pour les deux années de qualification zoo-sanitaire des naissains de captage de *C. gigas*, se dégagent clairement : *i*) le pourcentage d'échantillons TEST infectés constant pour les captages 2013 et 2014 ; *ii*) des valeurs de mortalités moyennes par site des lots TEST croissantes le long d'un gradient latitudinal sud-nord marqué ; et *iii*) la réplication active du virus lors d'un constat de mortalité en ETL. Le portage latent d'OsHV1  $\mu$ Var en période hivernale, ou en dehors des périodes « à risque » en terme de maladies, a par ailleurs été confirmé sur les deux années consécutives pour les 5 mêmes sites parmi les 6 étudiés. Dans le contexte actuel d'émergence des maladies chez *C. gigas*, cette information est essentielle du point de vue épidémiologique. Par contre, la valeur moyenne des mortalités des lots TEST infectés (à mortalité cumulée > 5 %) varie entre les deux années, en étant plus élevée en 2014 qu'en 2015. Ceci pourrait signifier qu'à proportion égale d'échantillons infectés, le portage latent du virus serait quantitativement variable avec pour conséquence en ETL une expression différenciée en terme de virulence. Ceci est partiellement conforté par les analyses de détection qPCR réalisées avant le début de toutes les ETL en suivant la même méthodologie (pool de 5 huîtres) les deux années, qui montrent une détection d'OsHV1  $\mu$ Var pour 33 % des échantillons TEST lors de la campagne 2014 contre seulement 3 % en 2015.

### 4.3. Acquis et limites de la qualification zoo-sanitaire de l'huître creuse en épreuve thermique de laboratoire

La récurrence annuelle des maladies infectieuses associées aux mortalités massives des naissains d'huîtres creuses a conduit à développer l'épreuve thermique de laboratoire (ETL) afin de détecter précocement les lots de juvéniles porteurs latents d'OsHV1  $\mu$ Var. Les premiers essais menés depuis 2010 en ETL référence ont ainsi permis de révéler qu'un lot de naissains issus de captage naturel sur deux était infecté par le virus en période hivernale bien avant l'apparition des mortalités dans le milieu naturel ; mais qu'*a contrario* les juvéniles d'écloserie présentaient une fréquence plus faible de juvéniles porteurs latents du virus (Petton *et al.*, 2015a). Par ailleurs, cette approche de qualification zoo-sanitaire a été élargie aux huîtres adultes *a priori* non malades dans une autre étude non présentée ici. Cette dernière a démontré qu'en période hivernale des huîtres adultes étaient infectées par des agents pathogènes, et ceci dans de nombreux sites naturels. Néanmoins et contrairement aux mortalités enregistrées pour les naissains de captage en ETL, celles des huîtres adultes TEST et NSI témoin n'étaient pas associées à une détection d'OsHV1  $\mu$ Var. Ces analyses négatives conduites chez des huîtres adultes mortes et chez les NSI morts lors de la cohabitation ont amené à l'hypothèse de maladies d'origines bactériennes (Petton *et al.*, 2015b). Ces deux études ont démontré que l'ETL référence permettait le développement des maladies microbiennes (d'origine virale et/ou bactérienne) pour des huîtres juvéniles comme adultes. Ces résultats sont d'autant plus probants qu'aucune mortalité n'était relevée au moment des prélèvements dans le milieu naturel pour ces lots d'huîtres, adultes et naissains.



Si la méthode de qualification zoo-sanitaire mise en œuvre en 2014 et 2015 a fourni des résultats clairs (*e.g.* révélation d'animaux porteurs latents d'agents pathogènes non détectés en analyses qPCR, statut infectieux des naissains TEST avec mortalité (infectés) révélé par les mortalités des NSI témoin en cohabitation), l'interprétation de certains résultats doit être nuancée. Les résultats de la détection des lots infectés par OsHV1  $\mu$ Var en ETL peuvent en effet être discutés car ils sont obtenus en conditions contrôlées au laboratoire. Il est probable qu'une distorsion existe entre ces réponses en laboratoire et la réalité du milieu naturel dans lequel de multiples interactions ont une incidence sur le développement et la transmission des maladies (Petton *et al.*, 2015a ; Pernet *et al.*, 2014). Néanmoins, dans le contexte actuel des maladies infectieuses touchant l'huître creuse, ces éléments de connaissance du statut zoo-sanitaire des huîtres en dehors des périodes de mortalité sont précieux voire essentiels pour la mise en œuvre d'une démarche préventive de limitation des risques épizootiques (Vannier, 2014).

Les résultats des analyses individuelles de détection d'OsHV1  $\mu$ Var menées avant le début de l'ETL sur des lots TEST ( $n = 30$ ) n'expliquent pas les différences extrêmes de mortalité cumulée de leurs lots de NSI témoin (0 % à 40 %). Le seuil de sensibilité des analyses qPCR pour la détection d'OsHV1  $\mu$ Var est un facteur limitant pour établir avec précision la part des individus infectés dans une population. De même, l'absence de connaissance précise sur l'historique de vie de ces naissains ne permet pas notamment de savoir s'ils ont, ou pas, été déjà touchés par les maladies ou des épisodes de mortalité. Ces deux constats démontrent la difficulté d'établir précisément, pour chaque lot testé, la proportion des naissains sensibles aux maladies, infectés ou rescapés d'un événement infectieux passé. Ceci est vrai aussi pour des lots TEST sans mortalité. A partir de ces éléments, il est délicat d'interpréter les valeurs absolues proprement dites des mortalités cumulées relevées en ETL dans le cadre d'une qualification zoo-sanitaire. En effet, et bien que tous les événements de mortalité relevée en laboratoire trouvent leur origine dans la présence d'huîtres infectées par un agent pathogène, il est probable que le nombre total des naissains morts au final soit plus important que le nombre des naissains initialement porteurs latents du virus. En ETL référence, la maladie va se développer dans les naissains infectés, puis s'étendre progressivement vers les naissains TEST sensibles pour enfin contaminer les NSI témoin. En ETL, les moyennes des mortalités cumulées par site des lots TEST infectés montrent globalement la même tendance en terme de gradient latitudinal que celle relevée en « jardin commun » (Figs. 13 & 15). Les valeurs des mortalités cumulées en ETL doivent être interprétées comme une estimation prédictive de la capacité de survie de ces lots de naissains en milieu naturel lorsqu'il sera devenu infectieux (température de l'eau de mer > 16°C).

Pour les lots des sites présentant des résultats homogènes en ETL référence, *i.e.* Thau, La Vilaine et rade de Brest, les réponses ont été identiques en ETL simplifiée, et les effets de la variance des résultats à petite échelle spatiale (intra-écosystème) sont minimes. En revanche, pour les sites où des résultats hétérogènes ont été relevés en ETL référence, *i.e.* pour Arcachon, Marennes-Oléron, Bourgneuf, la détection des lots TEST porteurs latents du virus est moins bonne en ETL simplifiée, et les résultats comparés à petite échelle varient fortement. Malgré ces limites de l'ETL simplifiée, son utilité demeure évidente du fait d'une mise en œuvre simple et peu onéreuse, qui permettrait la détection des lots à risques majeurs en terme sanitaire.

## 5. Conclusions & Perspectives

Les principaux résultats communs aux campagnes 2014 et 2015 de qualification zoo-sanitaire des naissains de captage de l'huître creuse en ETL référence ont montré que :

- ce procédé permet, en dehors des périodes de développement et transmission des maladies en milieu naturel, la détection d'échantillons de naissains infectés par OsHV1  $\mu$ Var plus efficacement que les analyses qPCR ;
- le constat de mortalité des NSI témoin placés en cohabitation avec les naissains des lots TEST est l'indicateur du portage latent d'OsHV1  $\mu$ Var par les naissains TEST et du caractère infectieux des maladies développées ;
- un lot de captage naturel sur deux était infecté par OsHV1  $\mu$ Var lors des deux campagnes de l'action QUALIF ;
- un contraste spatial marqué en terme de pourcentage de lots infectés par OsHV1 est observé entre les sites étudiés, avec un gradient latitudinal sud-nord (0 % des échantillons infectés par le virus dans l'étang de Thau contre 100 % des échantillons infectés dans l'embouchure de la baie de La Vilaine et la rade de Brest). Pour Arcachon, Marennes-Oléron et la baie de Bourgneuf, on relève une hétérogénéité de résultats intra-site.

A partir de ces conclusions, la qualification zoo-sanitaire des naissains pourrait être d'intérêt pour la filière ostréicole comme base de réglementation des transferts d'animaux entre sites de captage, ce qui constituerait une action sanitaire préventive, associée à un passeport sanitaire et à la traçabilité des huîtres. Aujourd'hui, les mouvements d'animaux ne sont pas ou que peu encadrés, bien que cette pratique culturelle est utilisée de manière régulière et qu'elle est associée à un risque sanitaire important de transfert d'agents pathogènes. De plus, les éventuelles interdictions de transferts arrivent le plus souvent trop tard, c'est-à-dire après le déclenchement des mortalités (température de l'eau > 16°C).

Dans un cadre épidémiologique, l'épreuve thermique de laboratoire pourrait être utilisée pour étudier l'évolution temporelle de l'état sanitaire des sites naturels de production ostréicole *via* l'état de santé des huîtres natives de chacun des sites. En effet, la qualification zoo-sanitaire des naissains de captage, réalisée à intervalles de temps réguliers, permettrait d'évaluer le portage latent en agents pathogènes et de mieux comprendre l'évolution des réponses de l'huître de captage en terme de sensibilité aux maladies. De même, il serait intéressant de s'appuyer sur la capacité de l'ETL à révéler précocement les maladies des huîtres, plusieurs mois avant que les conditions environnementales ne soient favorables à leur développement et leur transmission, pour établir la dynamique d'infection d'huîtres saines (NSI) exposées en milieu naturel aux agents pathogènes présents, actuels ou émergents. Cette démarche proactive et prédictive serait un complément précieux aux réseaux de surveillance actuels (*e.g.* RESCO II), qui n'ont actuellement pas ce caractère prédictif.

## 6. 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 AL. (2009) Suivi du recrutement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en Charente-maritime en 2009 : Rapport de synthèse. Rapport de contrat Creaa-SRC Poitou Charentes, 32 p + annexes
- Goudenège D., Travers MA., Lemire A., Petton B., Haffner P., Labreuche Y., Tourbiez D., Mangenot S., Calteau A., Mazel D., Nicolas JL., Jacq A., Le Roux F. (2014) A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Env Microbiol* 1-11.
- 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. (2014) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME Journal* 1-9.
- 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. (2009) 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 R. (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. (2013b). Méthode de qualification sanitaire (herpes virus OsHV-1  $\mu$ 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. (2013a) 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. (2015a) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 6 : 205–222.
- Petton B., Bruto M., James A., Labreuche Y., Alunno-Bruscia M., Le Roux F. (2015b) *Crassostrea gigas* mortality in France : the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* 6 : 686.
- Petton B., (2015c) Qualification zoo-sanitaire du naissain de captage 2013 de l'huître

creuse *Crassostrea gigas* (QUALIF). Rapport scientifique final de l'action QUALIF convention DPMA-Ifremer 13/1210868 NYF.

- Petton S., Le Roy V., Bellec G., Queau I., Le Souchu P., Pouvreau S. (2016). Marine environmental station database of Daoulas bay. <http://dx.doi.org/10.17882/42493>
- 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 JF., Collin K., Fortune M., Palvadeau H., Bedier E., Robert S., Pepin JF., 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.. Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France : Le Réseau Velyger. Rapport annuel 2015.
- 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 JF., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153 : 92- 99.
- 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. *Vet Res* 42.
- Vannier P. (2014) Rapport à Monsieur la Directeur Général de l'alimentation : mission conchylicole, amélioration de la situation zoosanitaire, état des lieux et propositions d'amélioration.

- **Annexe 1.**

**Tableau 3. Qualification zoo-sanitaire en ETL référence des naissains de captage naturel de *C. gigas* en 2014 : mortalités (%) et détection d'OshV1  $\mu$ Var (ND = non détecté ; détecté) des lots TEST provenant de 6 écosystèmes et de leurs lots NSI témoin.**

Sites	Secteurs	Lots naissains TEST			Lots NSI témoin		
		Mortalité (% au J30)	Oshv1 (J0)	Oshv1 (J10)	Mortalité (% au J30)	Oshv1 (J0)	Oshv1 (J10)
<b>Etang de Thau</b>	Marseillan	1,1	ND	ND	0,0	ND	ND
	Bouzigues	2,1	ND	ND	5,4	ND	ND
<b>Bassin d'Arcachon</b>	Lucarnan Est	0,9	ND	ND	0,0	ND	ND
	Lucarnan Ouest	8,4	ND	ND	6,6	ND	ND
	Lucarnan centre	0,0	ND	ND	0,0	ND	ND
	Le Cla	1,9	ND	ND	0,0	ND	ND
	Villa Algérienne	0,0	ND	ND	0,0	ND	ND
	Bélisaire	9,9	ND	Détecté	33,6	ND	Détecté
	Cailloc	7,6	ND	Détecté	19,2	ND	Détecté
	Grauères	10,9	ND	Détecté	27,5	ND	Détecté
	Comprian	11,6	ND	Détecté	28,4	ND	Détecté
	Grand banc	14,8	ND	Détecté	43,6	ND	Détecté
<b>Marennes Oléron</b>	Longées 1	2,5	ND	Détecté	44,5	ND	Détecté
	Longées 2	19,1	ND	Détecté	25,7	ND	Détecté
	Moulières 1	3,1	ND	ND	0,0	ND	ND
	Moulières 2	2,4	ND	ND	0,0	ND	ND
	Seudre 1	1,3	ND	ND	0,0	ND	ND
	Seudre 2	11,2	ND	Détecté	47,0	ND	Détecté
	Gironde	1,0	ND	ND	0,0	ND	ND
<b>Baie de Bourgneuf</b>	Bernerie Sud -1	0,0	ND	ND	0,5	ND	ND
	Bernerie Sud -2	42,4	Détecté	Détecté	48,4	ND	Détecté
	Bernerie Sud -3	6,6	ND	ND	26,3	ND	ND
	Les Moutiers	40,5	ND	Détecté	14,8	ND	Détecté
	Les Plaintives	15,5	ND	ND	32,8	ND	ND
	Bernerie Nord - 1	0,0	ND	ND	0,0	ND	ND
	Bernerie Nord - 2	22,3	ND	Détecté	38,8	ND	ND
	La Northe	0,0	ND	ND	0,0	ND	ND
<b>Baie de Vilaine</b>	Tréhiguier - 1	50,7	ND	Détecté	9,3	ND	Détecté
	Tréhiguier - 2	27,2	ND	Détecté	41,3	ND	Détecté
	Tréhiguier - 3	20,4	ND	Détecté	7,8	ND	ND
	Tréhiguier - 4	66,6	ND	Détecté	32,2	ND	Détecté
<b>Rade de Brest</b>	Mengleuz - 1	39,7	ND	Détecté	40,8	ND	Détecté
	Mengleuz - 2	33,3	ND	Détecté	32,4	ND	Détecté
	Sillon des Anglais	72,7	ND	Détecté	29,4	ND	Détecté
	Lomergat	63,0	ND	Détecté	32,4	ND	Détecté
	Pte du château	69,6	ND	Détecté	18,3	ND	ND
	Riv. Daoulas	6,7	ND	ND	0,0	ND	ND
	Prioldy - 1	34,5	ND	Détecté	23,3	ND	Détecté
	Prioldy - 2	32,5	ND	Détecté	20,0	ND	Détecté