

Département Ressources Biologiques et Environnement  
 - Unité SG2M, Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins ; Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie et Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture  
 - Unité PFOM, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés  
 - Unité IHPE Interaction Hôte Pathogène Environnement  
 Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes  
 - Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais  
 - Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire  
 ISEM, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), CNRS  
 Université Montpellier2



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

Mars 2017 - R.INT.RBE/SG2M-LGPMM

## Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens : description et facteurs liés – MORBLEU-



# **Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens: description et facteurs liés – MORBLEU**

**Rapport scientifique de l'étude MORBLEU, convention DPMA-Ifremer 2016**

## 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> 2017 <b>nombre de pages :</b> 88 <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration(s) :</b> figures et tableaux <b>langue du rapport :</b> français
<b>Validé par :</b> Christian BECHEMIN et Sylvie LAPEGUE Adresse électronique : sylvie.lapegue@ifremer.fr		
<b>Titre de l'article :</b> Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens, action – MORBLEU-2016		
Contrat n° 16/1212569    Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Jean-François PEPIN Abdellah BENABDELMOUNA Lionel DEGREMONT Stéphane GUESDON Olivier LE MOINE Benjamin MORGA Nicolas BIERNE Marie-Agnès TRAVERS Stéphane ROBERT Patrick SOLECHNIK	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>  Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins LGPMM ; Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie et Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture  Ifremer / Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes/ Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais LERPC ; Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire ISEM, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), CNRS Université Montpellier2	
<b>Contributeur(s) :</b> Dominique Hervio-Heath, Alexandre Brunet, Annick Derrien, Jean Michel Chabirand, Sylvie Génaudeau, James Grizon, Pierre Polsenaëre, Anne Schmitt, Jean Luc Seugnet, Delphine Tourbiez, Christophe Ledu, Hubert Palvadeau, Julien De Lorgeril, Philippe Souchu, Yoann Le Merrer, Julien Normand, Christian Béchemin, Sylvie Lapègue		
<b>Encadrement(s) :</b>		
<b>Cadre de la recherche :</b> Action : A070219 – / P116-0014-03 –MORBLEU-2016		
<b>Destinataires :</b> DPMA, DGAI, Ifremer		



Depuis 2014, des épisodes de mortalité anormale affectent les cheptels mytilicoles tant adultes que juvéniles. Dès l'année 2015, une première année d'étude a été réalisée au travers de l'action **MORBLEU** (Mortalité des moules Bleues). Elle a été menée dans les Pertuis charentais et la baie de Bourgneuf.

Dans ce même contexte, elle a été reconduite en 2016 afin de poursuivre l'analyse des données collectées en 2015, renouveler une campagne d'étude et d'observation in situ, **formuler des hypothèses** autour de facteurs favorisant ces épisodes de mortalité de moules, développer des essais permettant de tester ces hypothèses dans le futur et produire des lots de moules pour ces essais et pour caractériser le potentiel adaptatif des animaux face aux épisodes de mortalité. Au terme de cette deuxième année d'étude un état des connaissances acquises et des questions à approfondir sont ici abordés.

**1. Décrire le phénomène : observation de la dynamique des épisodes de mortalité 2015 et 2016.** Pour l'année 2016, les mortalités de moules observées dans les Pertuis charentais et en Vendée présentent des niveaux « exceptionnels » au regard des données historiques. Ils sont supérieurs (50% à 85%) à ceux constatés en 2015 et proches de l'année 2014 avec une tendance à l'expansion du phénomène vers le Sud (Pertuis d'Antioche) et le Nord (nord Baie de Bourgneuf).

**2. Dans quel contexte environnemental les épisodes de mortalité de moules sont-elles survenues en 2016 ?** Trois années se détachent de l'analyse hydrobiologique et climatique établie sur les 16 dernières années. 2014, 2015, 2016 présentent des conditions climatiques hivernales et printanières plutôt chaudes et pluvieuses, bien que 2015 se distingue par un hiver plus froid et moins pluvieux et de moindre mortalités.

**3. Peut-on mettre en évidence une fragilisation des moules selon les sites en lien avec des substances dissoutes ?** Les analyses menées sur les données 2015, seules complètes, ne permettent pas d'établir une relation entre les épisodes de mortalité de moules et le matériel dissous, qu'il s'agisse des éléments traces métalliques, des contaminants hydrophiles ou des sels nutritifs.

**4. Evolution à moyen terme et dynamique saisonnière des équilibres microbiens : y aurait-il un lien avec les épisodes de mortalité de moules ?** Les données sur la dynamique des communautés bactériennes planctoniques obtenues en 2015 (approche NGS, métabarcoding) montrent que des déséquilibres importants apparaissent au moment où les premières mortalités sont observées. Pour les secteurs étudiés, il semble qu'il pourrait exister un lien entre la dynamique microbienne printanière et l'initiation des épisodes de mortalité de moules.

**5. Une part génétique ? Les animaux affectés en 2015 et 2016 : une espèce, une population particulière touchée ?** La composition génétique de moules provenant des sites ateliers de MORBLEU/Mytilobs en 2015 et 2016 montre que ces animaux étaient des animaux appartenant à l'espèce *M. edulis* du Golfe de Gascogne, avec détection de rares hybrides *edulis/galloprovincialis*. Par ailleurs, sur ces échantillons 2015 et 2016, la recherche d'un processus néoplasique a été recherché néoplasie. Les résultats ont permis d'observer des chimères génétiques *edulis/edulis* pouvant laisser être interprétés comme un processus néoplasique transmissible.

**6. Une qualité cytogénétique variable dans les cheptels mytilicoles en relation avec les épisodes de mortalité 2015 et 2016 ?** En 2016 comme en 2015, les analyses de cytométrie en flux réalisées sur l'hémolymphe révèlent une grande variabilité des lots de moules pour le critère « qualité cytogénétique ». La qualité cytogénétique initiale est aussi significativement corrélée avec les performances de survie des moules. La qualité cytogénétique des cheptels mytilicoles est un facteur important qui pourrait conditionner leur fragilité face aux divers épisodes de mortalité.

**7. Un état physiologique particulier des moules faisant face aux mortalités ?** L'étude de l'expression des gènes a été initiée. Les données permettent de voir des tendances différentielles au niveau de la régulation de l'expression des gènes en fonction des conditions testées. L'annotation du transcriptome de novo est en cours.

**8. Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité : des niveaux de survie différents selon l'historique et l'origine de lots ?** Sur la base de résultats préliminaires obtenus en 2015, des productions de lots de moules contrastés en termes de survie ont été réalisées à l'écloserie du LGPMM pour permettre **un testage élargi avec un lot Sélectionné et un lot Témoin dans huit sites différents**. Ce suivi réalisé vise à **étudier les interactions entre les génotypes et les environnements**.

Les résultats de l'action MORBLEU acquis au cours de l'année 2016 confortent et renforcent les données et les pistes établies en 2015. Ils permettent de percevoir des liens entre les processus et d'identifier plusieurs facteurs susceptibles de moduler ou favoriser l'expression des épisodes de mortalité de moules décrites depuis l'hiver 2014 dans les Pertuis Charentais.

**Mots-clés – Moules, *Mytilus edulis*, Facteurs environnementaux, Mortalité, Equilibre microbien, Populations, Qualité cytogénétique, Anomalies hémocytaires, Expression de gènes, Physiologie**

---

## **Unités et réseaux :**

-Réseau d'observation Mytilobs

-Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton REPHY

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

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

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

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

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

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

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

## **Collaborations :**

INRA-GENOTOUL, plateforme de séquençage PlaGe, Toulouse,  
Laboratoire LSPT UMR EPOC de l'Université de Bordeaux1

## **Remerciements :**

DDTM, 85, 17, 44

Réseaux Mytilobs, Repamo, REPHY, LNR, RIC cellule Bio-info  
Direction des Phares & Balises de la Rochelle

M.Rioux, mytiliculteur sur bouchots à Maison Blanche, Noirmoutier

Benoît et François Durivaud, mytiliculteurs à Charron

Mickaël Vérine, mytiliculteur du Pertuis Breton

Laurent Hurtaud, mytiliculteur du Pertuis Breton

M. Baudet, mytiliculteur à Boyard

# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	7
<b>Liste des figures</b> .....	8
<b>Liste des tableaux</b> .....	11
<b>1. Introduction générale</b> .....	12
1.1. Rappel et contexte.....	12
1.2. Objectifs.....	13
1.3. Stratégie de bancarisation et de mise à disposition des données.....	13
1.4. Eléments de communication du projet MORBLEU.....	14
<b>2. Objectif 1 : Description du phénomène dans les Pertuis et en Vendée</b> .....	17
2.1. Dispositif et stratégie d'échantillonnage.....	17
2.2. Résultats des observations et des suivis 2015-2016 – Objectif 1 : Décrire les mortalités et leur contexte environnemental.....	19
2.2.1. Mortalités observées dans les Pertuis Charentais et en Vendée.....	19
2.2.2. Contextualisation environnementale des mortalités, l'environnement abiotique.....	23
<b>3. Objectif 2 : Quelles hypothèses explorer pour évaluer les facteurs favorisant les épisodes de mortalité de moules? 4141</b>	
3.1. Hypothèses concernant l'environnement.....	41
3.1.1. Etude de la relation entre les épisodes de mortalité de moules 2014, 2015 et 2016 et certains paramètres environnementaux abiotiques : Une fragilisation des moules selon les sites en lien avec des substances dissoutes ?.....	41
3.1.2. Evolution à moyen terme et dynamique saisonnière des équilibres microbiens : Y aurait-il un lien avec les mortalités de moules ?.....	43
3.2. Hypothèses concernant l'animal (hôte) et les agents pathogènes.....	49
3.2.1. Une virulence particulière des vibrions isolés lors des mortalités de moules ? Bilan sur les essais de caractérisation des souches bactériennes : virulence et mode de contamination.....	49
3.2.2. Une part génétique ? Les animaux affectés en 2015 et 2016 : une espèce, une population particulière touchée ?.....	51
3.2.3. Une qualité cytogénétique variable dans les cheptels mytilicoles en relation avec la mortalité 2015 et 2016?.....	54
3.2.4. Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?.....	61
<b>Conclusion et perspectives :</b> .....	65
<b>4. Objectif 3 : Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité.</b>	71
4.1. Introduction.....	71
4.2. Lots produits en 2015 et suivi en 2016.....	71
4.3. Lots produits en 2016.....	74
<b>5. Conclusions générales</b> .....	75
<b>6. Références bibliographiques</b> .....	78
<b>7. Annexes</b> .....	82
Annexe 1 : Décrire les mortalités de moules observées en 2016 et préciser leur contexte environnemental, observation in situ.....	82
Annexe 2 : Caractérisation hydrologique et chimique de 3 stations de l'étude : substances dissoutes (nutriments, éléments trace métalliques-contaminants). Premiers éléments descriptifs.....	83
Annexe 3: Premiers signalements de mortalités dans le pertuis Breton en février 2014 et apports des fleuves.....	90
Annexe 4 : Quel lien établir entre la période de ponte dans le Pertuis Breton (Filières) et les premières mortalités?.....	91
Annexe 5 : Quel lien établir entre l'état physiologique, le transcriptome des moules et les mortalités rencontrées ?.....	92

# Liste des figures

Figure 1 : Carte gauche, position du site atelier de Maison Blanche en Baie de Bourgneuf. Carte droite, position des sites ateliers dans les Pertuis, Filière W, Eperon, Loix, Boyard	18
Figure 2 : Réseau national Mytilob campaign 2016. Evolution de la mortalité mensuelle instantanée (bleu) et de la mortalité cumulée (rouge). Les pics de mortalité sont représentés par un losange rouge	20
Figure 3 : Carte indiquant les sites suivis par le réseau Mytilob en 2016	22
Figure 4 : Évolution des températures et des salinités journalières à la station Filière (agrégées à partir des mesures in situ à haute fréquence d'acquisition) aux 1ers semestres de 2014, de 2015 et de 2016 représentées par les lignes bleues, vertes et rouges respectivement. Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" au regard de l'historique de 2009 à 2016. Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles. Enfin, les polygones verticaux bleus, verts et rouges (transparents) symbolisent les périodes estimées de début d'épisode de mortalités sur la zone des Filières du pertuis Breton en 2014, 2015 et 2016.	23
Figure 5 : Chronique des températures et salinités (respectivement en haut et en bas) observées sur 4 stations suivis dans le cadre du projet Morbleu en 2016 : valeurs issues de mesures in situ enregistrées à haute fréquence d'acquisition et agrégées à la journée.	25
Figure 6 : Comparaison des nutriments (médianes) mesurées en 2015 et 2016, avec des valeurs de référence (2000-2015 ; –réseau RePHY- Boxplots) sur le site de Boyard, pour trois périodes (janvier-mars ; avril-mai et juin-juil.).	26
Figure 7 : Evolution des concentrations en nitrates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles	28
Figure 8 : Evolution des concentrations en phosphates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles.	29
Figure 9 : Evolution des concentrations en silicates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles.	30
Figure 10 : Distribution des concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) en éléments métalliques (ETM) pour les 3 sites ateliers en 2015 et 2016 (Boxplots)	31
Figure 11 : Médianes des concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ) en éléments métalliques (ETM) sur les 3 sites ateliers en 2015 et 2016 (Boxplots)	31
Figure 12 : Evolution et distribution des concentrations en baryum (Ba) (a), en cadmium (Cd) (b), en cuivre (Cu) (c) et en nickel (Ni) (d) par station et par année : Filière w 2015 en rouge, Filière w 2016 en rouge foncé, Eperon 2015 en vert, Eperon 2016 en vert foncé, Boyard 2015 en bleu et Boyard 2016 en bleu foncé. Pour chaque distribution de valeurs observées sur la période mars à juin (inclus) une comparaison multiple (basée sur un test de Kruskal-Wallis) a été réalisée pour identifier les différences significatives pouvant exister entre chaque série	32
Figure 13 : Distribution des concentrations ( $\text{ng/L}$ ) en contaminants hydrophiles sur les 3 sites ateliers en 2015.	33
Figure 14 : « Cinétiques d'évolution » de dix contaminants hydrophiles dans les pertuis charentais durant la campagne Morbleu 2015 (concentration en $\text{ng.L}^{-1}$ )	34
Figure 15: Contribution* des fleuves aux apports sur les sites ateliers (Boyard, Eperon et Filière) pour chacune des 10 périodes de l'étude (campagne 2015) ; A : les six principaux fleuves ; B : regroupement des fleuves par secteur géographique (* quantité de traceurs calculée par le modèle).	36



- Figure 16 : Comparaison relative des apports selon les fleuves, sur les 3 sites ateliers, durant la campagne Morbleu 2015 (février-juillet). La somme des contributions est posée = 100% sur « Eperon », d'où sur « Boyard » : 53% et sur « Filière » : 47%. 37*
- Figure 17 : Représentation des variables de la campagne 2015 (contaminants, contribution des fleuves : LOIre, LAY, SEVre, CHArente, DORdogne et GIRonde) et des « sites-périodes » (FI-P3 = Filière durant la période 3) sur les axes 1 et 2 de l'ACP (76 % de variabilité). 38*
- Figure 18 : ACP représentant les données environnementales pour les 3 sites Morbleu en 2015 (CA : Contribution Apports fleuves, Oxygène, Température, Salinité, Turbidité, et les variables projetées (non constitutives de l'ACP) : le taux de mortalité (TM), les éléments métalliques traces (ETM) et la somme des contaminants hydrophiles ( $\Sigma$ , cont.hyd). Les surfaces en rose représentent les corrélations entre les variables projetées et certaines variables constitutives de l'ACP. 41*
- Figure 19 : Typologie des années sur la base des conditions environnementales rencontrées dans le nord des Pertuis Charentais (pertuis Breton) résultant d'une analyse triadique partielle (compromis) réalisée sur les variables environnementales (du premier semestre des années 2000 à 2016 représentées de 00 à 16 et identifiées en couleur pour les années à surmortalité) suivantes : 44*
- Figure 20 : Dynamique des indicateurs de diversités phytoplanctoniques, richesse générique et équitabilité, des mois de janvier à août en 2014 (en haut), 2015 (au milieu) et 2016 (en bas) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton (Ifremer/Quadrige). Les bandes verticales (polygones) de couleurs (bleu, vert et rouge pour respectivement 2014, 2015 et 2016) correspondant à chaque année présentée en figure 16, illustrent la période estimée de début de mortalité de moules s'appuyant sur la base des informations de terrain des professionnels et des suivis conchylicoles de l'Ifremer 46*
- Figure 21: Evolution hivernale et printanière de l'abondance relative des OTU (en haut) et de classes de bactéries (en bas) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton en 2015. Les classes le plus représentées et visualisables sur le graphique du bas figurent en gras. Les cadres verts sur chaque graphique illustrent la période estimée de début de mortalité. 47*
- Figure 22 : mortalités cumulées observées après la mise en contact d'animaux sentinelles avec des animaux infectés par injection intramusculaire, à raison de 3 animaux source pour 10 animaux sentinelles. Cette expérience a été réalisée à deux reprises avec 3 réplicats techniques à chaque expérience ainsi qu'un témoin. 50*
- Figure 23: Observation des images d'immunohistochimie : branchies d'un animal contaminé. Les marquages en rose correspondent aux marquages bactériens et les tissus sont contre-colorés en bleu pâle (x 40). 51*
- Figure 24 : Carte indiquant la distribution géographique connue des moules sur la façade Ouest de l'Europe. 52*
- Figure 25: Carte présentant les sites échantillonnés (▲) en 2015 ou 2016 le long de la façade Atlantique (cadran A) au niveau de la baie de Bourgneuf (cadran B) et des pertuis charentais (cadran C). 55*
- Figure 26 : Année 2015. Distribution du pourcentage des noyaux non diploïdes (%>2n) pour les échantillons d'hémolymphe des moules analysées appartenant aux sept sites échantillonnés en 2015. La valeur sous le nom du lot correspond au pourcentage moyen de noyaux non diploïdes de ce lot. Les analyses **avant la mortalité** sont indiquées **en noir** et les analyses **après la mortalité en rouge**. 56*
- Figure 27: Corrélation entre la « qualité cytogénétique » initiale d'un lot (GA%) et sa performance de survie face aux épisodes de mortalité mytilicole de l'année 2015 57*
- Figure 28 : Année 2016. Distribution du pourcentage des noyaux non diploïdes (%>2n) pour les échantillons d'hémolymphe des moules analysées appartenant aux cinq sites échantillonnés en 2016. Analyse avant (**rouge**) et après (**vert**) l'épisode de mortalité 2016. 58*
- Figure 29 : profil histologique d'aspect normal obtenu pour les moules ne présentant pas de cellules non diploïdes dans l'hémolymphe 59*
- Figure 30 : profil histologique d'aspect anormal obtenu pour les moules présentant des cellules non diploïdes dans l'hémolymphe montrant des granulocytomes et des infiltrations hémocytaires étendus. 60*
- Figure 31 : Suivis parallèles de l'évolution à Filière W en 2015 des stades mensuels de développement gonadiques des moules ; des niveaux de mortalité cumulée et instantanée ; des températures de l'eau en mesure haute fréquence (source S. Robert, Mytilobs) 63*
- Figure 32: Analyse en composante principale des lots séquencés. (A) Filière Mars 2015, (B) Filière Avril 2015, (C) Loix en Ré Avril 2015, (D) Yves Avril 2015, (E) Filière Mai 2015, (F) Filière Janvier 2015. 66*
- Figure 33 : Représentation des « Volcano plots » des différentes analyses de différentiel d'expression pour le lot A par rapport à B, C, E et D. 67*
- Figure 34: Site de testage des deux lots de moules sur le parc de La Floride (étoile rouge) dans le bassin de Marennes-Oléron 72*
- Figure 35 : Mortalités (moyennes et écart-types) des moules pour le lot Témoin et le lot Sélectionné de novembre 2015 à octobre 2016 sur le site de La Floride (la température de l'eau de mer est indiquée en vert). 72*

<i>Figure 36: Mortalités (moyennes des 6 bacs) des moules pour le lot Témoin et le lot Sélectionné de février à janvier 2017 en laboratoire (la température de l'eau de mer est indiquée en vert).</i>	74
<i>Figure 37 : Mortalités cumulées au 21 janvier 2017 des lots témoin et sélectionné pour les trois sources utilisées au laboratoire.</i>	74
<i>Figure 38 : Concentrations des molécules détectées sur membrane POCIS au cours des campagnes de l'année 2015 pour les trois sites ateliers Filière, Eperon et Boyard.</i>	855
<i>Figure 39 : Concentrations des molécules détectées sur membrane POCIS au cours des campagnes de l'année 2016 pour les trois sites ateliers Filière, Eperon et Boyard et pour le site Noirmoutier en Vendée</i>	87
<i>Figure 40 Empreinte moyenne de contamination sur l'ensemble des sites échantillons de février à juillet 2016</i>	88.
<i>Figure 41 : Contribution des fleuves internes et externes aux pertuis charentais lors de l'émergence des mortalités de moules dans le pertuis Breton au cours de l'hiver 2014 (représentation pour février 2014). Le trait bleu représente un secteur homogène de contributions des fleuves aux apports.</i>	90

# Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Données de mortalité cumulée pour les moules adultes suivies en 2016 par le Mytilobis et l'action MORBLEU</i>	21
<i>Tableau 2 : Mortalité cumulée finale sur lots adultes de moules suivis dans le cadre du Mytilobis pour les années 2014, 2015, 2016 au regard des sites étudiés dans l'action MORBLEU</i>	22
<i>Tableau 3 : test non paramétrique de comparaison de k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis. Les lettres en majuscules indiquent les groupes significativement différents (p-value&lt;0,0001 donc &lt; à alpha=0,05).</i>	57
<i>Tableau 4 : Profils microsatellites obtenus sur des moules de haute qualité cytogénétique (VL-1/5/9/17/24/27/34/39) en utilisant 8 microsatellites (Me15/16 et Med---) amplifiés à partir de l'ADN individuel extrait à partir de l'hémolymphe (H) et des branchies (B). Pour chaque moule, il n'y a aucune différence entre les deux tissus et tous les marqueurs sont à l'état diploïde (deux loci).</i>	59
<i>Tableau 5 : Profils microsatellites obtenus sur des moules de basse qualité cytogénétique (FL-L- 7/8/9/11 et FLM-8/10/11) en utilisant 8 microsatellites (Me15/16 et Med---) amplifiés à partir de l'ADN individuel extrait à partir de l'hémolymphe (H) et des branchies (B). Pour chaque moule, des différences variables de génotype existent entre les deux tissus avec pour certains marqueurs microsatellites des différences d'allèles en fonction du tissu et plusieurs marqueurs sont à l'état non diploïde, avec des formes triploïdes et tétraploïdes.</i>	60
<i>Tableau 6 : présentation de toutes les combinaisons analysées pour évaluer le différentiel d'expression entre les différents lots, en prenant comme référence soit A : Mars-Filière (juste avant les mortalités), soit B : Avril – Filière (début des mortalités).</i>	66
<i>Tableau 7: Sites de testages pour l'évaluation de la réponse à la sélection pour améliorer la survie des moules.</i>	75
<i>Tableau 8 : Coordonnées des stations de mesures à haute fréquence d'acquisition</i>	82
<i>Tableau 9 : Liste des 17 substances détectées systématiquement dans tous les échantillons en 2015 et 2016</i>	84
<i>Tableau 10 : Liste des dates de campagnes d'exposition des membranes POCIS en 2015 et 2016.</i>	89
<i>Tableau 11 : Liste des différents stades sexuels gonadiques chez la moules d'après Lubet, 1959.</i>	91
<i>Tableau 12 : Mortalités cumulées enregistrées sur les animaux déployés par MYTILOBS et utilisés ici pour l'étude transcriptomique, lettre correspond au codage du lot pour l'analyse bioinformatique.</i>	92

# 1. Introduction générale

## 1.1. Rappel et contexte

Depuis 2014, des épisodes de mortalité anormale affectent les cheptels mytilicoles tant adultes que juvéniles avec des pourcentages de mortalité pouvant atteindre 100% (Béchemin et al. 2015). Dès l'année 2015, une première étude cofinancée par la DPMA a été réalisée par l'Ifremer : **MORBLEU**. Elle a été menée dans les pertuis charentais et la baie de Bourgneuf et avait pour objectifs généraux d'explorer des **facteurs potentiellement aggravants, corrélés** avec les épisodes de mortalité de moules observées en 2014 et 2015 : **facteurs environnementaux** (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques), **facteurs intrinsèques aux animaux** (traits d'histoire de vie, fond génétique, caractéristiques cytogénétiques et physiologie) en lien avec des agents infectieux potentiels.

Dans ce même contexte, l'action MORBLEU a été reconduite en 2016 afin de : **poursuivre l'analyse des données** collectées en 2015, renouveler une campagne d'étude et d'observation *in situ* afin **d'acquérir de nouvelles données** (description du phénomène, caractérisation environnementale et hôtes) dans les pertuis charentais (pertuis Breton et pertuis d'Antioche) et en Vendée (Noirmoutier). Dans un deuxième temps, **des hypothèses ont été formulées** quant aux facteurs liés aux animaux ou à leur environnement susceptibles de favoriser la transmission et la sensibilité à l'infection par des agents infectieux présents sur le littoral (Charente-Maritime et Vendée). L'importance de certains de ces facteurs a été en partie évaluée par des analyses et des essais expérimentaux en lien avec les hypothèses ciblées.

Le présent travail est la **poursuite de l'étude MORBLEU initiée en 2015, le même intérêt et la même stratégie de mutualisation ont été conservés en 2016, qu'il s'agisse des données partagées, des échantillons, des moyens à la mer qui ont été produits ou opérés par le REPHY Observation/DCE ou le réseau Mytilobs par exemple.**

Le détail des dispositifs mis en place, les protocoles et les « matériels et méthodes » restant identiques à l'année précédente, ils ne seront pas re-décrits dans le présent rapport et le lecteur pourra les retrouver dans le rapport de l'année 2015 en ligne sous le lien ci-dessous (Travers et al., 2016. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais : description et facteurs liés – MORBLEU) <http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/>

En 2016, la coordination générale et opérationnelle du projet MORBLEU a été assurée par le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC : <http://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Etudes-et-Recherche/> )

Pour ce qui concerne le phénomène de surmortalité des cheptels de moules élevées **dans les Pertuis Charentais et en Vendée, pour la troisième année consécutive** malheureusement, **des épisodes de mortalité massive ont affecté la plupart des secteurs mytilicoles**. En 2016, l'ampleur du phénomène a pu dépasser les 85% de pertes selon les secteurs, aggravant ainsi la situation des producteurs alors que les mortalités enregistrées pour l'année 2015 avaient été moins fortes qu'en 2014.

## 1.2. Objectifs

Les objectifs généraux de ce projet restent en majorité identiques à ceux de l'année précédente. Ils sont : i) **d'identifier des facteurs potentiellement corrélés avec les épisodes de mortalité de moules** observées dans les Pertuis Charentais et en Vendée : facteurs environnementaux (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques), facteurs intrinsèques aux animaux (traits d'histoire de vie, caractéristiques cytogénétiques et physiologie) et agents infectieux potentiels (recherche réalisée dans le cadre des missions de LNR pour les maladies des mollusques marins) ; ii) de préciser quelles **hypothèses formuler pour explorer les facteurs identifiés** ; iii) de **caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité massive**.

Plus précisément, nous avons souhaité répondre aux questions suivantes :

- **Dans quelles conditions les épisodes de mortalité de moules sont-ils survenus en 2015 et 2016 ?** Décrire les épisodes de mortalité de moules observées et préciser leur contexte environnemental, (observation *in situ*) que ce soit concernant l'environnement abiotique ou biotique, ou l'hydrodynamique des masses d'eaux et des fleuves (modélisation).
- **Dynamique saisonnière des équilibres microbiens : y aurait-il un lien avec les épisodes de mortalité massive de moules ?**
- Quelle(s) a (ont) été **la (les) espèce(s) ou population(s) de moules affectée(s) ?**
- Quelles étaient les caractéristiques **cytogénétiques des animaux en 2015 et 2016**? Pourrait-il exister un lien avec les épisodes de mortalité observés ?
- Ces animaux étaient-ils dans des **conditions physiologiques particulières**? La réponse transcriptomique des animaux prélevés à différents temps (avant/pendant/après les épisodes de mortalité recensés) a été étudiée.
- Quel peut être le **potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité massive ?**

Après une présentation des éléments de bancarisation des données et de communication, ces différentes questions seront abordées dans des chapitres dédiés, puis l'ensemble des données sera discuté.

## 1.3. Stratégie de bancarisation et de mise à disposition des données

### Bancarisation des données

Le projet MORBLEU repose pour bonne part sur la mutualisation de moyens et des données de réseaux et d'actions Ifremer opérés dans d'autres projets/réseaux (ex : REPHY, Mytilobs).

De fait, la stratégie de bancarisation des données est largement adossée à ces réseaux. Ainsi, de nombreuses des données environnementales (mesures hydrologiques discrètes, lecture de flore du REPHY Observation-DCE) sont bancarisées dans la base QUADRIGE gérée et hébergée par l'Ifremer. De même, pour certains sites suivis dans le cadre du projet MORBLEU, des données hydrologiques collectées en haute fréquence sont également bancarisées sous QUADRIGE (données de température, salinité, pression du Mytilobs et du RESCO). Très prochainement, des données de biométrie du Mytilobs y seront rajoutées.

Concernant les données issues de séquençage haut débit (données NGS de métabarcoding et de transcriptomique) du projet MORBLEU, elles sont bancarisées sur des espaces disques dédiés et sécurisés du serveur de l'Ifremer de Brest.

### Mise à disposition des données

En termes de mise à disposition de données et de l'information, elle est faite au travers de rapports annuels accessibles à tous, après accord de la DPMA. A ce stade du projet, les données qualifiées et les résultats produits par l'action MORBLEU sont mis à disposition sous forme de communication lorsqu'ils ont pu faire l'objet d'une analyse et d'une valorisation. Les documents produits sont consultables sur le site public institutionnel d'archivage de l'Ifremer –ARCHIMER-. Une grande partie des données sous QUADRIGE sont disponibles sur demande. Ponctuellement, le projet a reçu des demandes pour fournir des séries de mesures de salinité dans la baie de l'Aiguillon en 2016 à des fins de validation de modèle (demande du service d'hydrologie de l'Institution Interdépartementale du Bassin de la Sèvre Niortaise –IIBSN-79028 Niort).

## 1.4. Eléments de communication du projet MORBLEU en 2016

### Présentations orales et poster

- Pépin *et al.*, (2016). Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais et Vendée 2014-2015 : de l'expertise aux actions de recherche. Description des conditions associées aux épisodes de mortalité. Point d'information sur l'étude en cours. **Présentation orale.** Journée de la Santé des mollusques marins et Journées de l'Observation conchylicole. 02 au **04 février 2016**, Ifremer, Nantes, France. <http://wwwz.ifremer.fr/sg2m/journees-de-la-sante-des-mollusques-marins-et-journees-de-l-observation-conchylicole>
- Robert Stéphane, Soletchnik Patrick, Pepin Jean-Francois, Le Moine Olivier, Guesdon Stéphane, Travers Marie-Agnès, Garcia Céline, Dégremont Lionel, Benabdelmouna Abdellah, Osta Amigo Axel, Bierne Nicolas (2016). Mortalités massives de moules bleues (*Mytilus edulis*) sur les côtes françaises (2014-2016) : éléments de connaissances (mai 2016). **Présentation orale.** Rencontre avec des professionnels de la mytiliculture à Ifremer la Rochelle, le **20 mai 2016**. Rencontre avec des professionnels de la mytiliculture. 20 mai 2016, Ifremer La Rochelle.
- Benabdelmouna Abdellah, Ledu Christophe (2016). Blue mussel mortality outbreak in France is associated with heavy genomic abnormalities detected by flow cytometric analysis of hemolymph. AMMR2016 -**Poster**- 1st International Symposium on Advances in Marine Mussel Research. 26-27 October 2016, University of Vigo, Spain. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00356/46720/>
- Guesdon Stéphane, Travers Marie-Agnès, Hervio Heath Dominique, Derrien Annick, Genauzeau Sylvie, Schmitt Anne, Leroy Laura, Pepin Jean-Francois (2016). Equilibre microbien et initiation des épisodes de mortalité de moules. Y aurait-il un lien? **Poster.** Journées département ODE. **8-9 novembre 2016**. Logonna Daoulas, France.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès (2016). Projet de recherche "MORBLEU". Environnement des écosystèmes mytilicoles et crises de mortalité récentes, quelles interactions? Etude des facteurs pouvant favoriser les surmortalités de moules bleues

(*Mytilus edulis*) dans les pertuis charentais et en Vendée (2014-2016). **Poster**. Journées département ODE. **8-9 novembre 2016**. Logonna Daoulas, France. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00361/47174/>

### Participation à des réunions

- Préfecture de la Vendée. Roche sur Yon : (4 mars 2016)
- Préfecture de Charente Maritime. La Rochelle : (28 avril 2016)
- Réunion avec le CNC, Paris : (2 mai 2016, avec une présentation intitulée « Etat des connaissances sur les épisodes de mortalité massive de moules - Avril 2016 »)
- Réunion avec le Département de Vendée (8 septembre 2016)
- Réunion avec le Département de Charente Maritime (20 septembre 2016)

### Rapport et publications

- Benabdelmouna Abdellah, Ledu Christophe (2016). The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 30-38. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>
- Travers Marie-Agnès, Pepin Jean-Francois, Soletchnik Patrick, Guesdon Stéphane, Le Moine Olivier (2016). Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés – MORBLEU. **Rapport de contrat**. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/>
- Un Rapport technique « Mortalités moules » expertise pour DPMA, mai 2016.
- Soletchnik Patrick, Robert Stéphane (2016). Eléments de connaissance sur la mortalité et la reproduction de la moule bleue (*Mytilus edulis*) sur la façade atlantique. **Rapport d'étude**. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00345/45634/>

### Interviews/communications sur le thème « Mortalité de moules » avec la Presse :

- 10 interviews presse
- 2 interviews télé

## OBJECTIF 1 : DECRIRE LE PHENOMENE ?

DECRIRE LES EPISODES DE MORTALITE OBSERVES ET LEUR CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL



## 2. Objectif 1 : Description du phénomène dans les Pertuis et en Vendée

**Décrire les épisodes de mortalité de moules observées en 2016 et préciser leur contexte environnemental, observation *in situ***

### 2.1. Dispositif et stratégie d'échantillonnage

Comme précisé en introduction de ce rapport, l'action MORBLEU 2016 s'inscrit dans la poursuite de l'étude MORBLEU initiée en 2015. Dans ce contexte, la même stratégie de suivi et d'échantillonnage qu'en 2015 a été mise en œuvre et sera présentée sommairement. Le détail des dispositifs mis en place, les protocoles et les « matériels et méthodes » qui sont identiques à l'année précédente ne seront pas détaillés dans le présent rapport et le lecteur pourra les retrouver dans le rapport de l'année 2015 disponible en ligne sous le lien ci-après : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/>

Brièvement, la mise en place opérationnelle du suivi 2016 *in situ* a été basée sur l'hypothèse que de nouvelles mortalités pouvaient survenir à nouveau comme en 2014 et 2015 entre mars et juin. Le calendrier des prélèvements et des campagnes à la mer a été calé sur celui des sorties du REPHY, avec des **sorties bimensuelles. Si des mortalités étaient constatées sur les sites suivis, alors un sur-échantillonnage à pas de temps serré serait réalisé pour encadrer l'évènement au plus près.** Au total, 14 campagnes à la mer planifiées ont été réalisées entre le 01/02/16 et 26/07/16, auxquelles s'ajoutent trois campagnes supplémentaires lors du 1<sup>er</sup> pic de mortalité de printemps.

Compte tenu de la spatialisation des niveaux de mortalités contrastés dans les pertuis en 2014 et 2015, l'essentiel de la **stratégie d'analyse** de l'ensemble des jeux de données (paramètres biotiques et abiotiques) était **basée sur la comparaison relative des conditions pour les différents sites en fonction du temps.**

**Choix des sites** : en 2016, cinq sites ont été suivis : trois dans le Pertuis Breton : un site 'océanique' à filières « **Filière W** », un site estuarien à bouchots « **Eperon-Aiguillon** », unité non mytilicole avec tables « **Loix en Ré** » ; un dans le pertuis d'Antioche : le site à bouchots de « **Boyard** », et un cinquième nouveau site mytilicole situé en Vendée (Baie de Bourgneuf). Il s'agit du site à bouchots de « **Maison Blanche** » au N-E de l'île de Noirmoutier (voir carte,

*Figure 2* et Tableau 8 ; Annexe 1). Ce nouveau point a été introduit dans l'étude à la suite des épisodes de fortes mortalités qu'il a connues au printemps et à l'automne 2014 et 2015.

**Animaux suivis** : suivi d'un **lot sentinelle de moules *Mytilus edulis*** comparable à celui mis en place en 2015 dans les pertuis (identique au lot MYTILOBS). Il s'agit d'un lot de juvéniles captés sur corde en 2015 en Baie d'Yves (pertuis d'Antioche). En janvier 2016, ce lot était déployé sur les cinq sites ateliers.

**Listes des principaux paramètres suivis durant les campagnes de février à juillet** : suivi des **paramètres physico chimiques de l'eau** (température, salinité, oxygène dissous et turbidité) en haute fréquence (sonde automatique multiparamètres, 1 mesure/15 min). Mesures discrètes et échantillonnage pour turbidité, sels nutritifs, carbone organique dissous, métaux dissous, contaminants chimiques dans la colonne d'eau sur échantillonneurs intégratifs (composés hydrophyles sur POCIS), modélisation de la dispersion des masses d'eau (hydrodynamique, connectivité, apports des fleuves).

**Suivi de l'environnement biotique et des animaux :** prélèvements régulier d'eau de mer pour lecture directe ou après filtration séquentielle (étude microbiologique et phytoplanctonique, cytométrie en flux, métabarcoding). Prélèvements de moules à différentes étapes pour recherche sur la flore bactérienne (biote), contaminants chimiques, caractéristiques cytogénétiques, données de transcriptomique, caractérisation de populations (ex. SNP).

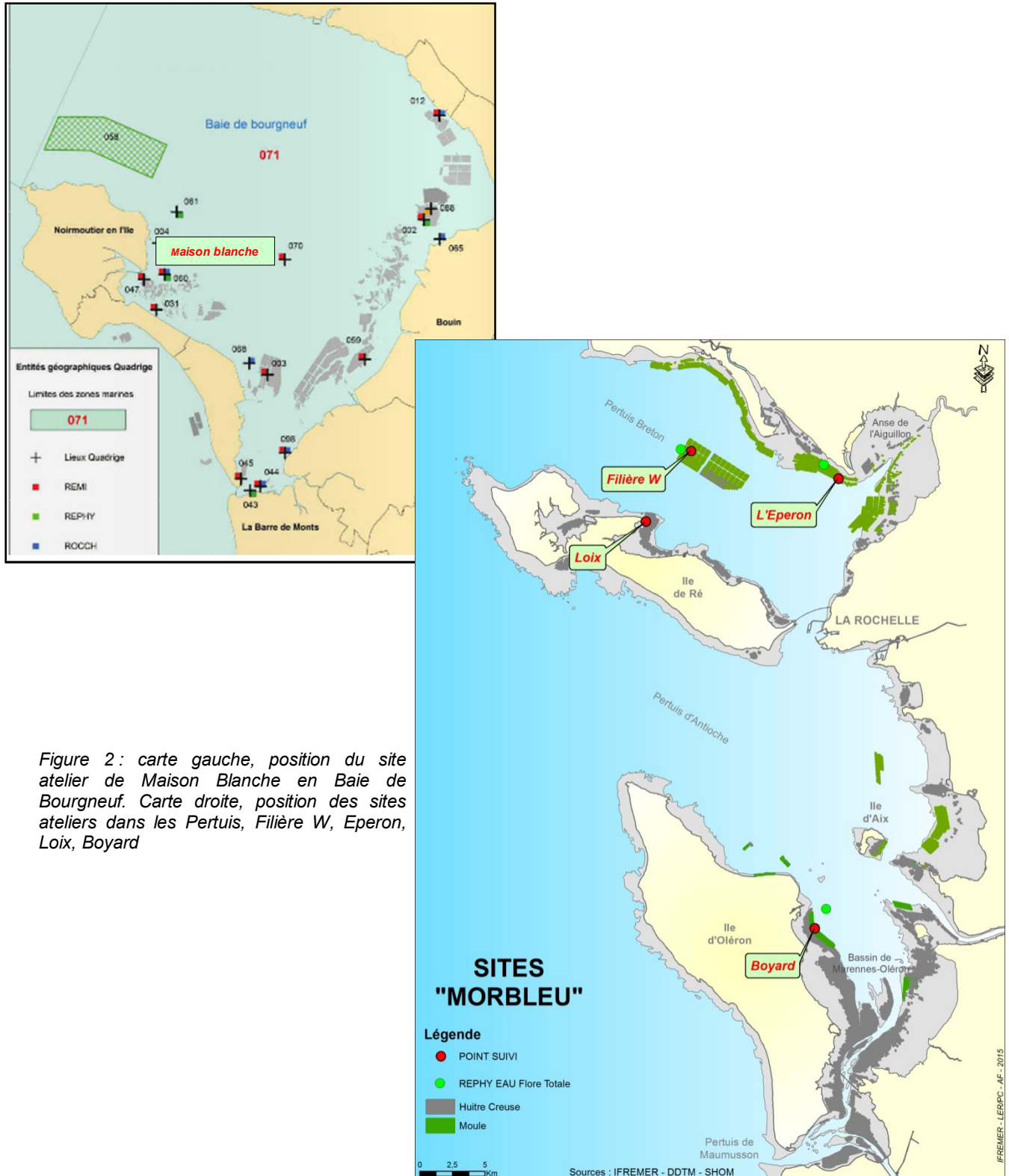


Figure 2 : carte gauche, position du site atelier de Maison Blanche en Baie de Bourgneuf. Carte droite, position des sites ateliers dans les Pertuis, Filière W, Eperon, Loix, Boyard

## 2.2. Résultats des observations et des suivis 2015-2016 – Objectif1 : Décrire les épisodes de mortalité et leur contexte environnemental

### 2.2.1. Episodes de mortalités observés dans les Pertuis Charentais et en Vendée

#### Suivi des épisodes de mortalité de moules dans le cadre du Mytilobs et du projet Morbleu-2016

Le suivi de la mortalité est un critère déterminant dans le cours de l'action MORBLEU puisqu'au delà du phénomène exceptionnel ou saisonnier, le point de départ et l'ampleur des mortalités conditionnent la stratégie d'échantillonnage et la réalisation de prélèvements et d'analyses spécifiques. Les suivis mis en place dès janvier 2016 sur les quatre sites des pertuis, Filière W, Eperon terre, Loix en Ré et Boyard devaient pouvoir précéder et encadrer la survenue d'épisodes de mortalité, pour les lots déployés spécifiquement ou pour ceux du réseau Mytilobs. Le calendrier de visite sur site de MORBLEU est basé sur un passage tous les 15 jours, le calendrier du Mytilobs à un rythme mensuel, à basse mer, en décalage avec MORBLEU. Complété avec les passages sur Loix tous les 15 jours à basse mer pour le suivi RESCO-II, cet ensemble de moyens d'observation de la santé des lots, éventuellement enrichi des informations partagées par le REPAMO et les DDTM17 et 85, a permis d'avoir une surveillance renforcée pour la deuxième année qui suit le phénomène de mortalité massive observé dans les pertuis et en Vendée depuis 2014.

Le **réseau Mytilobs** participe largement à l'action MORBLEU avec ses moyens. Il dispose de neuf sites répartis le long de la façade Atlantique (Figure 4). Les secteurs ciblés s'étendent des pertuis charentais d'Antioche (Yves et Boyard), du pertuis breton (Roulières, Aiguillon, Filière), à la baie de Bourgneuf (Maison Blanche), et la baie de Vilaine (Pont Mahé). Les moules déployées sont issues d'un lot de moule commun avec l'action Morbleu, provenant d'un captage dans les pertuis charentais. Lors des épisodes de mortalité une recherche d'organismes pathogènes ciblés est pratiquée avec recherche d'agents infectieux réglementés (dont *Marteilia sp.*), d'OsHV-1, de *Vibrio aestuarianus* et de vibrions du groupe *Splendidus*.

**En 2016 à nouveau, des épisodes de mortalité sévère ont affecté largement les secteurs mytilicoles de la Vendée et des pertuis charentais, occasionnant des pertes substantielles dans les cheptels des professionnels.** Des mortalités ont été signalées en Baie de Bourgneuf et dans le pertuis Breton dès janvier (pieux ou filières), justifiant des constats des DDTM 85 et 17 auxquels l'Ifremer a participé notamment en mars et en mai. Dans ces départements, globalement aucun secteur mytilicole n'a été épargné cette année qu'il s'agisse de juvéniles (à l'automne) ou d'adultes.

Le lot sentinelle de moules déployé dans le cadre de **l'action MORBLEU** n'a pas été épargné par ce phénomène. Tout comme les paniers du suivi Mytilobs, il a subi très tôt des mortalités chroniques en Baie de Bourgneuf (stabulation de septembre->décembre 2015, -20%), puis pour l'ensemble des sites, une cinétique plus rapide caractérisée par des pics de mortalité printaniers fin mars-début avril, puis fin mai (Tableau 1). Les premières mortalités printanières observées dans le Pertuis Breton mi-mars (Loix) ont déclenché un sur-échantillonnage pour trois dates, les 25 et 30 mars et le 4 avril 2016. A la mi-juin, les mortalités semblaient stabilisées et les données du Mytilobs permettent de faire le même constat : un plateau apparaît dans la cinétique des mortalités durant l'été, illustrant l'arrêt du phénomène. Cette observation semble plus nette les années de fortes mortalités (2014, 2016) et pour ce l'ensemble des sites, exception faite d'Yves

(Figure 3). Cet « arrêt » pourrait-il être lié à un stade physiologique particulier (ex : fin des premières pontes, stades 3C- 3D cf. § 3.2.4), une température critique ou bien les deux facteurs combinés ? Ces hypothèses physiologique et environnementale pourraient justifier un plan d'expérience spécifique pour tester ces facteurs.

**Fin juillet, début août, les taux de mortalité cumulée constatés (>60%) dans les paniers de moules MORBLEU ou Mytilobts atteignent des niveaux « exceptionnels »** au regard des références du réseau REMOULA antérieures au phénomène apparu en 2014 dans les pertuis ( Tableau 2). L'année 2016 est caractérisée par des niveaux de mortalité bien supérieurs à ceux de l'année de 2015 et proches de ceux de l'année 2014, voire supérieur pour le secteur de Boyard (53% > 19% > 10%) situé dans le pertuis d'Antioche. A la mise en place de MORBLEU en 2015, ce site avait été sélectionné comme « site témoin » représentatif d'un faible niveau de mortalité (2014 ~10%). **L'emprise du « phénomène » semble aujourd'hui s'élargir à tous ces secteurs et paraît se renforcer en 2016.**

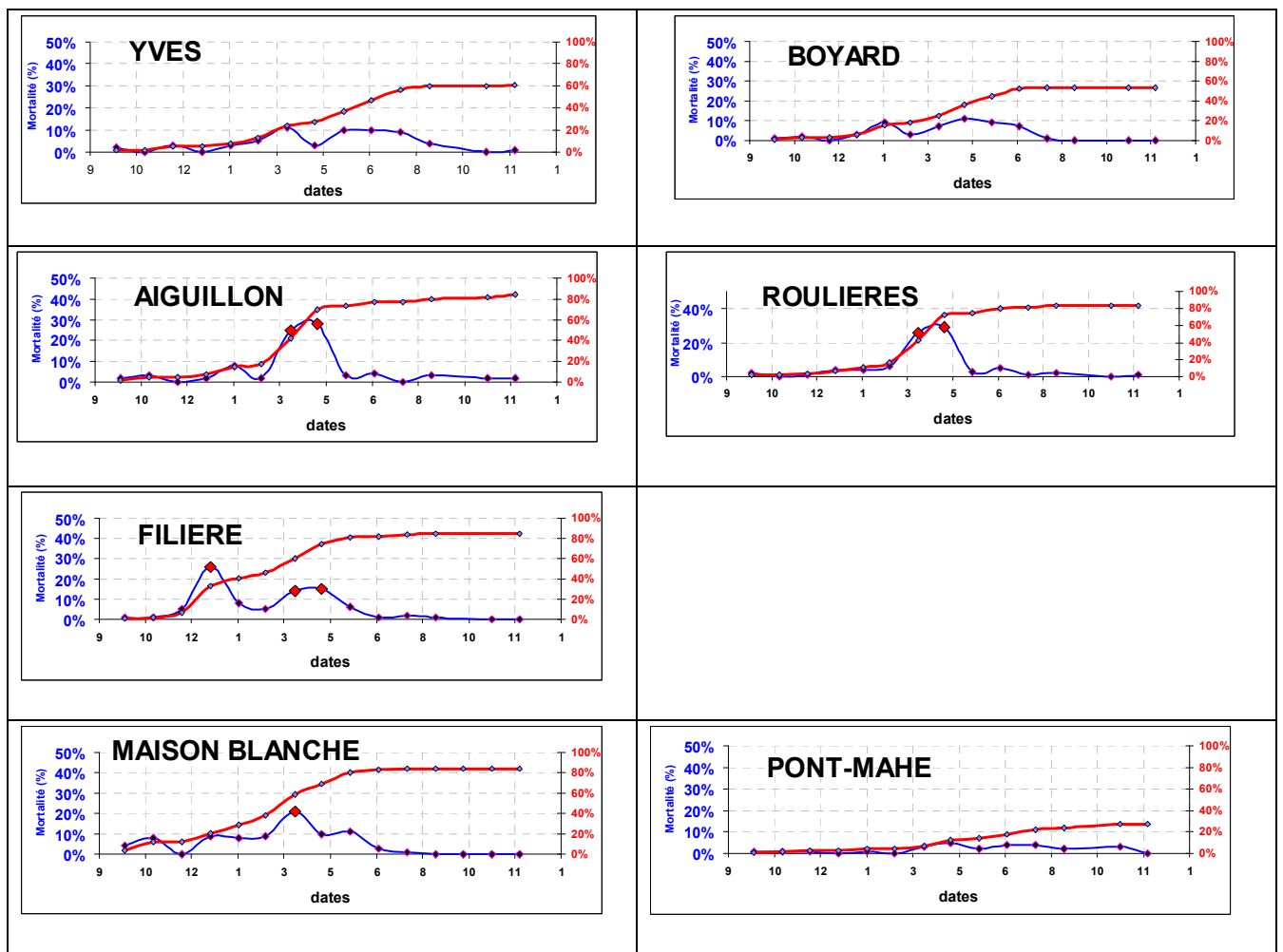


Figure 3 : réseau national Mytilobts campagne 2016. Evolution de la mortalité mensuelle instantanée (bleu) et de la mortalité cumulée (rouge). Les pics de mortalité sont représentés par un losange rouge

Des **augmentations brusques de mortalité** ont été enregistrées spécifiquement sur les sites du pertuis Breton et de la baie de Bourgneuf. Le premier pic de mortalité (+23%) est enregistré en janvier sur Filière. Sur l'estran, c'est en avril que le pic de mortalité est observé sur les Roulières (+26%), l'Aiguillon (+25%) et Maison Blanche (+21%). Il faut souligner **l'évolution chronique**

**des mortalités** sur le site de Maison Blanche en baie de Bourgneuf dès le mois de novembre 2015. Sur ce site, en dehors du pic du mois d'avril, les **mortalités** ont été **récurrentes** : voisines de 8% tous les mois, entre novembre 2015 et juin 2016. Les graphiques (Figure 3) représentent l'expression de la mortalité instantanée et l'évolution la mortalité cumulée de la mise à l'eau (septembre 2015) au relevage décembre 2016 du réseau Mytilobs lors de la campagne 2016.

Au cours de l'année 2016 l'impact des mortalités se concentre sur le pertuis Breton (Filière, Roulières, Aiguillon) et la baie de Bourgneuf (Maison Blanche) avec des niveaux cumulés supérieurs à 84%. Après le mois de juin sur ces quatre sites, aucune nouvelle mortalité n'est rapportée. Deux sites sont indemnes de mortalité, Pont Mahé en baie de vilaine (27% de mortalité cumulée) et le Vivier en baie du Mont Saint Michel (21% de mortalité cumulée). Le site de Pont Mahé (baie de Vilaine) est un **site de captage et d'élevage** qui ne présente pas de transfert de cheptel d'autres zones de captage (*a priori*). Le site du Vivier producteur de l'AOP moules de bouchots de la baie du Mont Saint Michel est une **zone de production** qui **importe obligatoirement son naissain** d'élevage de zones de captage diverses dont celles présentant des épisodes de mortalités (pertuis charentais et baie de Bourgneuf). Ces données interrogent sur le poids de « l'effet site » qui pourrait agir ?

Le protocole de Mytilobs a permis de réaliser des prélèvements pour chercher à caractériser précocement l'origine des mortalités. Ces actions ont été réalisées sur Filière le 26 janvier, sur Roulières le 22 février, sur Aiguillon et Maison Blanche le 9 mars. Toutes les analyses identifient la présence de vibrions du groupe *Splendidus* dans les échantillons (source Repamo-LNR 2016 : 19 lots de moules testés dont 4 hors mortalité). Les données de la surveillance chez la moule pour l'année 2015 avaient présenté les mêmes résultats, montrant la détection systématique de bactéries du genre *Vibrio* appartenant au **groupe Splendidus** dans les lots testés (Lupo *et al.*, 2016).

Dans le contexte du suivi Mytilobs, depuis l'apparition des épisodes de mortalité massive (>80%) dans le pertuis Breton en 2014, ils ont été rapportés en baie de Bourgneuf en 2015 et perdure en 2016 dans ces deux secteurs. Si le pertuis d'Antioche se trouve impacté moins fortement, certaines zones semblent « protégées » de ce phénomène. Il s'agit de la baie de Vilaine et de la baie du Mont Saint Michel.

De fait, ces deux derniers sites ont été validés comme « sites témoins » de faible niveau de mortalité et ils feront partie du suivi qui sera mis en œuvre dans l'action MORBLEU-2017.

Enfin, on pourra observer que, pour les trois années 2014, 2015, 2016 qui ont connu les épisodes de mortalité chez les adultes (et les juvéniles d'automne) dans les pertuis et en Vendée, le recrutement de la cohorte suivante ne paraît pas affecté, le naissain reste très abondant au captage (source Bulletin d'information année 2016, sept. CREEA-CRC PDL).

Tableau 1 : données de mortalité cumulée pour les moules adultes suivies en 2016 par le Mytilobs et l'action MORBLEU

Sites	Support	1eres mortalités observées	Source Mytilobs (aout)	Source Morbleu (fin juillet)
<b>Boyard</b>	Pieux	Février	53%	61%
<b>Eperon Aig.</b>	Pieux	Février	75%	57%
<b>Filière W</b>	Filières	Janvier	84%	85%
<b>Loix en Ré</b>	Table	Janvier		80%
<b>Maison Blanche</b>	Pieux	Janvier	84%	>80%

Tableau 2 : mortalité cumulée finale sur lots adultes de moules suivis dans le cadre du Mytilobs pour les années 2014, 2015, 2016 au regard des sites étudiés dans l'action MORBLEU

Mortalité cumulée finale en %	2014	2015	2016
Filière W	100	51	85
Eperon Aig.	100	22	84
Yves	67	31	61
Boyard	<10	19	53
M. Blanche	ND	ND	84

**En résumé :** En 2016 à nouveau, des épisodes de mortalité sévère ont affecté largement les secteurs mytilicoles de la Vendée et des pertuis charentais, occasionnant des pertes substantielles dans les cheptels des professionnels. Le « phénomène » semble récurrent (3<sup>ème</sup> année consécutive). Il paraît s'étendre spatialement et présente des cinétiques de mortalité variables selon les sites.

- Les premières mortalités printanières observées dans le pertuis Breton mi-mars (Loix) ont déclenché un sur-échantillonnage pour trois dates, les 25 et 30 mars et le 4 avril 2016.

- A la mi-juin les mortalités semblaient stabilisées et les données du Mytilobs permettent de faire le même constat : il apparaît un arrêt, un plateau dans la cinétique des mortalités durant l'été.

- Fin juillet, début août, les taux de mortalité constatés (>60%) dans les paniers de moules MORBLEU ou Mytilobs atteignent des niveaux « exceptionnels » proches de ceux observés en 2014.

- Les analyses en pathologie réalisées par l'Ifremer (LNR maladies des mollusques marins) sur des lots de moules affectées n'ont révélé que la présence de bactéries du groupe *Vibrio Splendidus* et des bactéries encore indéterminées.

-Le recrutement des cohortes nouvelles de naissain ne semble pas affecté par les épisodes de mortalité successifs.

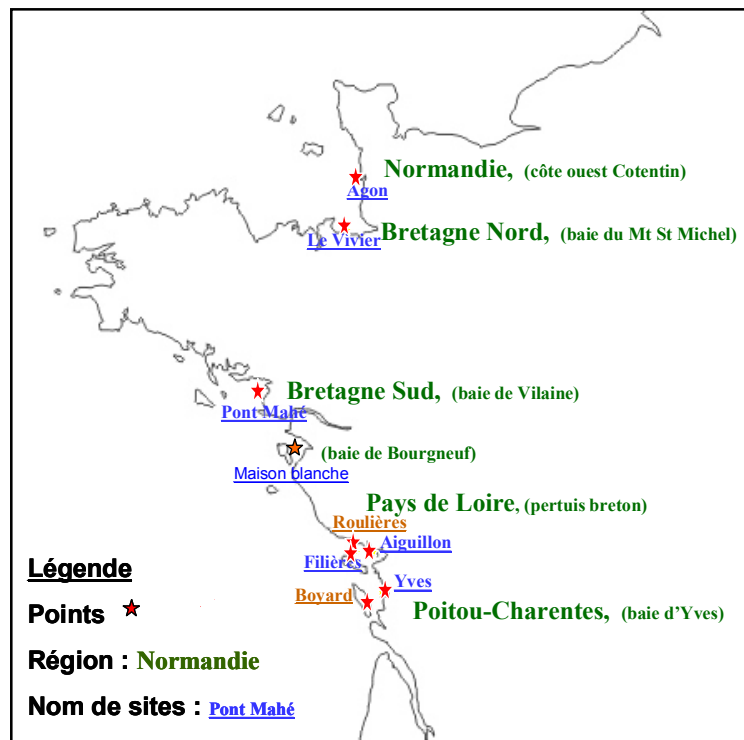


Figure 4 : carte indiquant les sites suivis par le réseau Mytilobs en 2016

## 2.2.2. Contextualisation environnementale des épisodes de mortalité, l'environnement abiotique

### Caractérisation physique des masses d'eaux étudiées dans le cadre du projet Morbleu depuis l'apparition des épisodes de mortalité massive de moules de 2014 et comparaison intersites de 2016

Au regard de l'historique récent (depuis 2009) issu de mesures *in situ* à haute fréquence d'acquisition sur le site des filières à moules du pertuis Breton, les températures hivernales des trois dernières années apparaissent plus élevées, notamment lors des mois de janvier et de février 2014 et 2016 (Figure 5, graphique du haut à gauche).

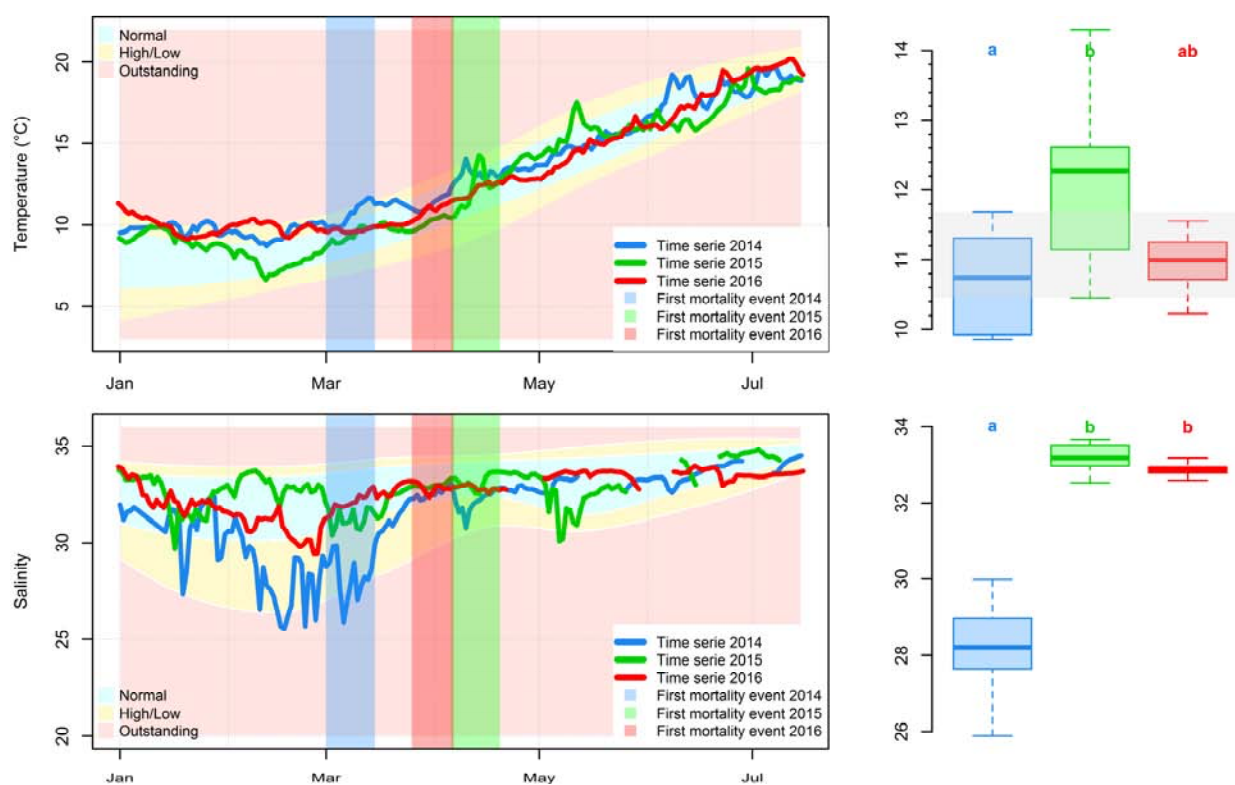


Figure 5 : évolution des températures et des salinités journalières à la station Filère (agrégées à partir des mesures *in situ* à haute fréquence d'acquisition) aux premiers semestres de 2014, de 2015 et de 2016 représentées par les lignes bleues, vertes et rouges respectivement. Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" au regard de l'historique de 2009 à 2016. Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles. Enfin, les polygones verticaux bleus, verts et rouges (transparents) symbolisent les périodes estimées de début d'épisodes de mortalités sur la zone des Filères du pertuis Breton en 2014, 2015 et 2016.

Les boîtes à moustache (boxplot) situées à droite (en haut pour la température et en bas pour la salinité) représentent la distribution des valeurs observées lors de la période d'initiation du phénomène de mortalité par année. Les différences significatives (comparaison multiple sur la base de tests de Kruskal-Wallis avec  $p < 0.01$ ) entre les années, sont signalées au dessus de chaque boxplot par des lettres (permettant d'identifier les similitudes ou les différences entre les séries).

Bien que des différences inter annuelles significatives apparaissent, les températures relevées lors de l'initiation des phénomènes saisonniers de mortalité de moules dans les Pertuis se situent dans une gamme proche de 11°C [10.5-11.6] (matérialisée par la bande grisée du graphique du haut à droite de la Figure 5).

Les salinités, qui révèlent l'influence des apports quantitatifs d'eau douce, sont très variables au premier trimestre des trois dernières années (Figure 5) graphique du bas à gauche). Elles sont particulièrement basses début mars 2014 sur la fenêtre d'initiation des épisodes de mortalité (Polsenaère *et al.*, 2017). En 2015 comme en 2016, les premières mortalités surviennent dans des conditions de salinité voisines de celles habituellement rencontrées (Figure 4 graphique du bas à droite).

En 2016, le suivi physique (*in situ* à haute fréquence d'acquisition) des masses d'eau a concerné quatre sites : le site de Maison Blanche largement touché en 2015 par des épisodes de mortalité a également été équipé et a donné lieu à un suivi environnemental.

Les températures enregistrées sur les différents sites présentent globalement de grandes similitudes, notamment sur la fenêtre d'initiation des mortalités<sup>1</sup> (graphique du haut de la Figure 6) : les températures observées se situent alors dans une gamme de valeurs proche de 11°C (visualisable par la bande grisée de la Figure 6 / graphique du haut). Néanmoins, des singularités apparaissent en période plus estivale voire hivernale sur les sites de Maison Blanche et de l'Éperon.

Les salinités présentent quant à elles de grandes disparités d'un site à l'autre ; On observe différents niveaux de variabilité (en fréquence et en amplitude) suivant le site (graphique du bas de la Figure 6) : ainsi, le site de l'Éperon présente une variabilité inter journalière importante et des amplitudes plus fortes que sur les autres sites (caractéristique de sa situation très estuarienne). Par opposition, la salinité du site de Filière est plus stable et ses amplitudes, même à l'échelle « saisonnière », sont modérées. Les sites de Maison Blanche et de Boyard se positionnent en intermédiaire, mais présentent ponctuellement d'intenses dessalures.

---

1 Établie sur la base des résultats d'observation du réseau Mytilobs et du projet MORBLEU : elle est définie à compter d'une augmentation significative du pourcentage de mortalité printanière. Compte tenu, de la fréquence d'observation (15 jours voire 1 mois), cette période est relativement homogène d'un site à l'autre.



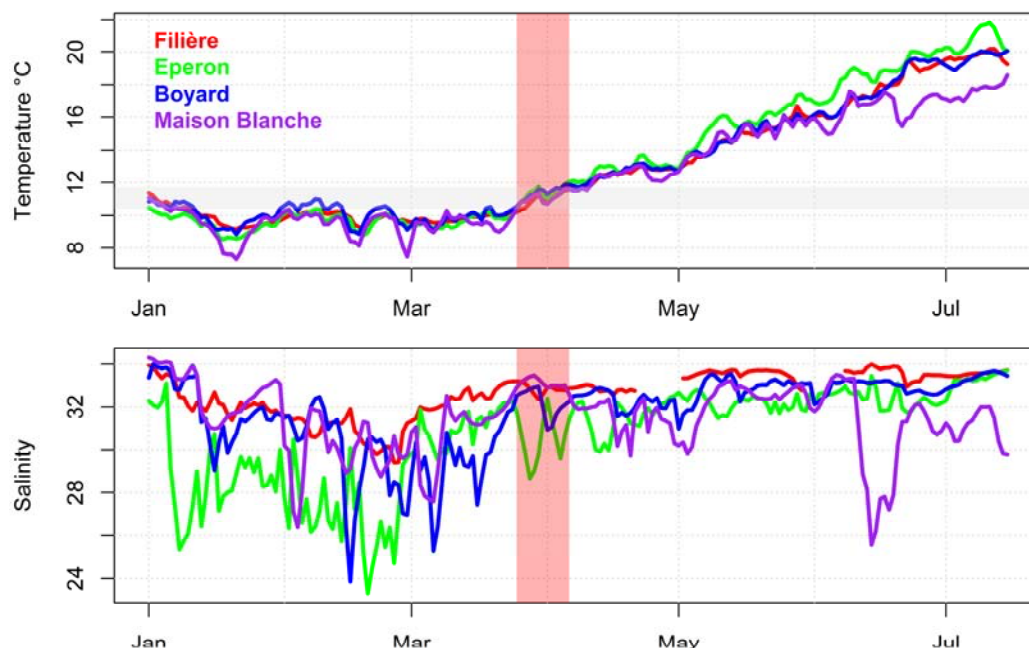


Figure 6 : chronique des températures et salinités (respectivement en haut et en bas) observées sur 4 stations suivies dans le cadre du projet Morbleu en 2016 : valeurs issues de mesures in situ enregistrées à haute fréquence d'acquisition et agrégées à la journée.

#### **En résumé :**

En 2016, les températures des masses d'eau des quatre sites instrumentés présentent une grande homogénéité particulièrement au moment de l'initiation du phénomène de mortalité, contrairement aux salinités (très variables d'un site à l'autre).

Comme en 2014 et 2015, cette phase d'initiation des mortalités printanières de 2016 est caractérisée par des températures situées dans un intervalle restreint de températures autour de 11°C : niveau de température correspondant au début des pontes (Marteil, 1976).

### **Caractérisation hydrologique et chimique de trois stations de l'étude : substances dissoutes (nutriments, éléments trace métalliques, contaminants). Premiers éléments descriptifs**

#### **Introduction à l'étude environnementale sur trois sites des pertuis charentais**

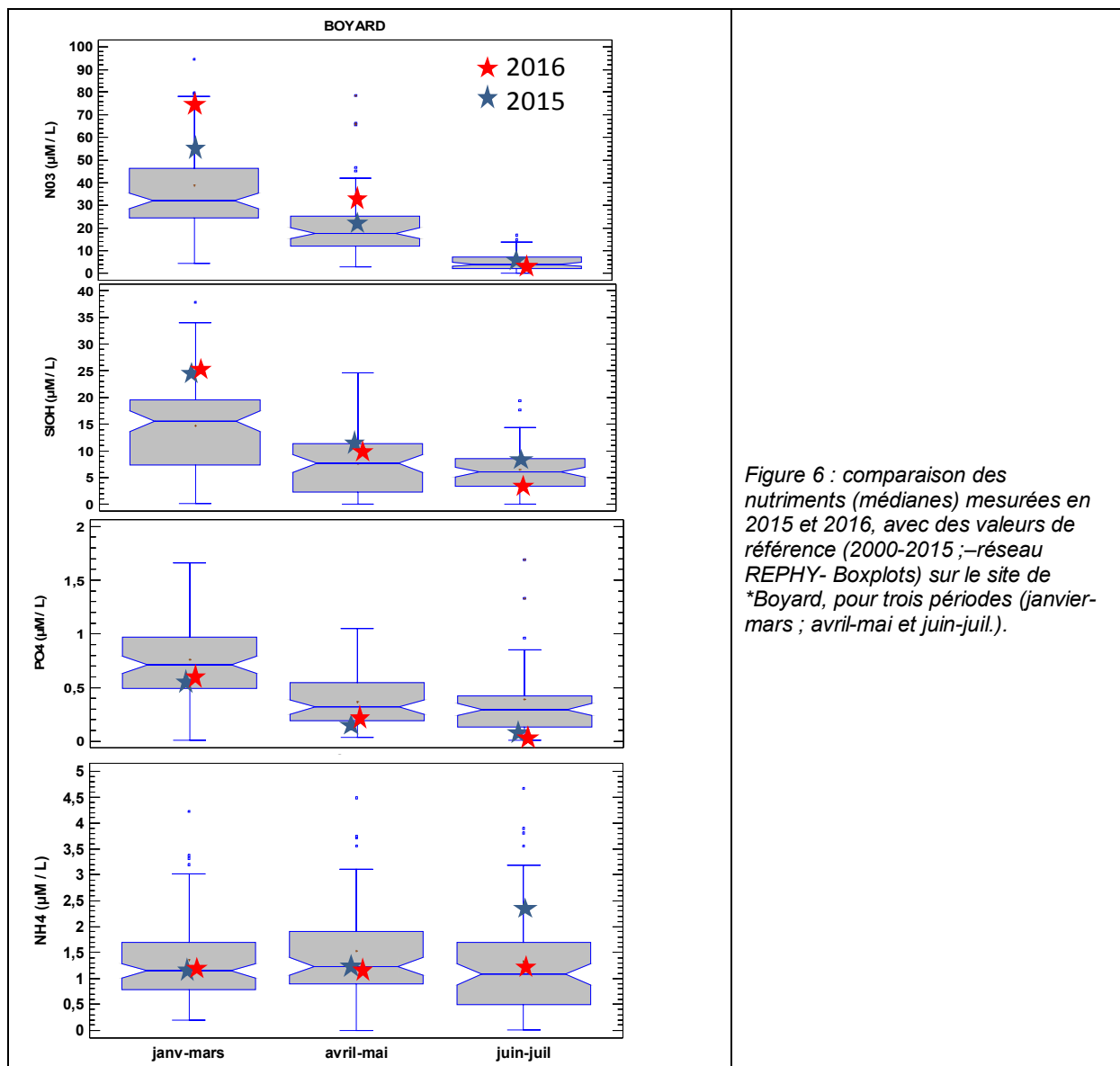
Depuis 2015, des substances chimiques dissoutes ont fait l'objet de suivis sur les sites opérationnels des pertuis de l'action MORBLEU en complément des mesures physico-chimiques (de température, de salinité, et d'oxygène dissous).

Ainsi, des échantillons d'eau ont été prélevés toutes les deux semaines environ, de février à juillet 2015 et 2016 et analysés en vue de déterminer les concentrations de nutriments (de type nitrates, nitrites, silicates, phosphates et azote ammoniacal) et d'éléments traces métalliques (ETM). Par ailleurs, des échantillonneurs passifs qui accumulent certains contaminants hydrophiles ont été déployés pour estimer les niveaux de contamination en pesticides (ciblés). Pour les périodes citées, les apports en eau douce des fleuves internes aux pertuis charentais (Charente, Sèvre et Lay) et externes (Loire, Garonne et Dordogne) ont été simulés via le modèle hydrodynamique Mars3D.

## Les substances dissoutes mesurées dans la colonne d'eau, sur les sites ateliers. Etude descriptive

### 1-Nutriments

L'analyse réalisée sur les données 2015 et 2016 mesurées aux trois sites, Filière, Eperon et Boyard pour les sels nutritifs montre que les nutriments : nitrates (+nitrites), les silicates et les phosphates sont respectivement corrélés à 90%, 60% et 40% aux apports des fleuves. En 2015 et 2016, les nitrates et silicates sont présents à des concentrations « plutôt fortes<sup>2</sup> », sur le site de Boyard (Figure 7, à titre d'exemple). Cette élévation de concentration de nutriments pourrait être associée à la diminution des débits des fleuves due à une pluviométrie hivernale moindre en 2015 et 2016. Par voie de conséquence, les apports (lors du lessivage des bassins versants) seraient plus concentrés.



<sup>2</sup> Situées au delà des deux premiers quartiles de la distribution de la variable au regard de la série du REPHY (2000-2015) établie au site de Nord Saumonards proche de \*Boyard

Au delà du profil saisonnier, l'évolution des concentrations en nutriment en 2015 et en 2016 (entre février et août) montre des différences de niveaux de variabilité entre les stations suivies : la station Filière W apparaît plus stable, notamment pour les nitrates et les silicates (Figures 7a et 9a), contrairement à la station Eperon qui présente de nombreux pics ponctuels indépendants du "pattern" saisonnier, quel que soit le nutriment (Figures 7b, 8b et 9b). Cette observation illustre le caractère moins tamponné de la station Eperon qui, compte tenu de sa proximité estuarienne, est plus soumis aux aléas du Lay et de la Sèvre Niortaise.

Outre la dynamique d'évolution des concentrations en nutriments entre février et août, on note, en période hivernale ("période d'apport" à concentrations les plus fortes), que les valeurs s'inscrivent globalement dans les gammes de valeurs plutôt élevées au regard d'autres masses d'eau côtière suivies dans le cadre de la DCE (secteur de l'Agence de l'Eau Adour Garonne / données de 2010-2016 (Auby et al., 2016)), notamment pour les phosphates (Figures 7b, 7c, 8a, 8c, 9c). Il convient toutefois de souligner que les valeurs observées à la station Eperon (forte influence estuarienne) mériteraient certainement d'être comparées aux masses d'eau de transition identifiées par la DCE. Les deux autres stations révèlent le caractère plutôt riche des masses d'eau étudiées : les nitrates de la station Boyard se situent parmi les concentrations les plus fortes des eaux côtières d'Aquitaine depuis 2010 (Figure 8c / zone jaunâtre supérieure) ; Pour les phosphates, les concentrations hivernales de Filière W et de Boyard évoluent en limite supérieure de l'intervalle de valeurs les plus souvent rencontrées voire même au sein de celui illustrant des valeurs plutôt fortes (cas de 2016) (Figures 8a et 8c).

Les silicates présentent quant à eux des valeurs plus modérées, s'inscrivant généralement parmi les valeurs le plus souvent observées (zones bleutées), même à la station Eperon (Figures 9a, 9b et 9c).

Si l'on focalise sur la période identifiée de mortalité (de mars à juin), la distribution des valeurs observées pour chaque station et pour chaque année ne semble globalement pas montrer de différence claire, tant spatialement que temporellement (Figure 7d, 8d et 9d). Cependant, la comparaison des médianes (de chaque station par année / trait noir épais dans chaque boxplot) par rapport à celle de l'ensemble des valeurs des masses d'eau côtière de la DCE (ligne verticale grisée) montre que les nitrates et les phosphates rencontrés sur les stations de la zone d'étude sont supérieures. Pour les silicates, ce type de comparaison donne lieu à un constat variable suivant la station et/ou l'année (parfois au dessus, parfois en dessous). La station Filière W semble néanmoins se détacher des deux autres : la majorité de la concentration relevée en 2015 et particulièrement en 2016 se situant en dessous de la médiane des masses d'eau côtière d'Aquitaine.

Au niveau de l'évolution inter-annuelle depuis 2008 (contexte DCE : uniquement les mois d'hiver - novembre à février), les concentrations hivernales moyennes ne sont pas significativement différentes entre la station Nord Saumonards (voisine de Boyard) et la station Filière W, bien que les concentrations en nutriments soient légèrement plus fortes sur cette dernière (données non montrées).

**Les concentrations en nutriments** relevées en 2015 et 2016 sur trois stations **ne présentent pas de différences suffisantes permettant de les discriminer et ainsi de rapprocher leur évolution à des variations spatiales et temporelles des mortalités.**

## Nitrates

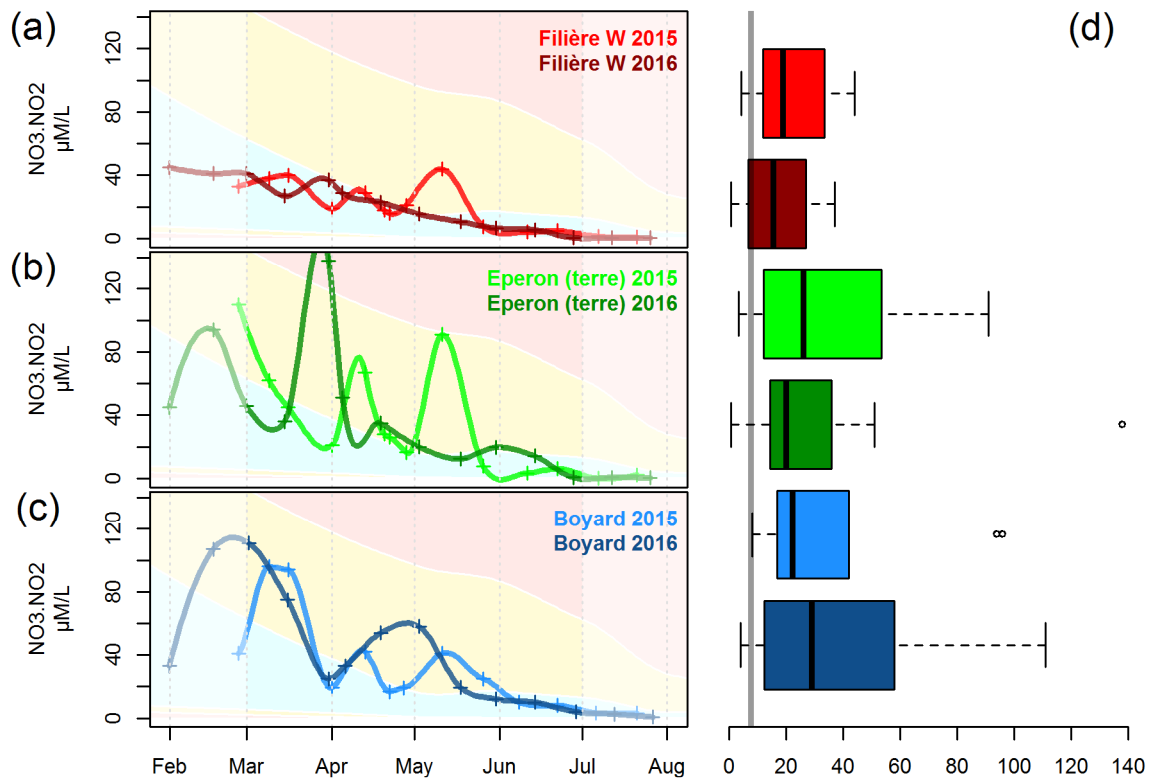


Figure 7 : évolution des concentrations en nitrates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles.

Le graphique (d) représente la distribution des valeurs observées pour chaque station et pour chaque année sur la période de mortalité (mars à juin (inclus)); la médiane de chaque série est signalée dans le boxplot (boite à moustache) permettant ainsi une comparaison avec la médiane de l'ensemble de la masse d'eau côtière de la DCE sur la même période, signalée par la ligne verticale grisée.

## Phosphates

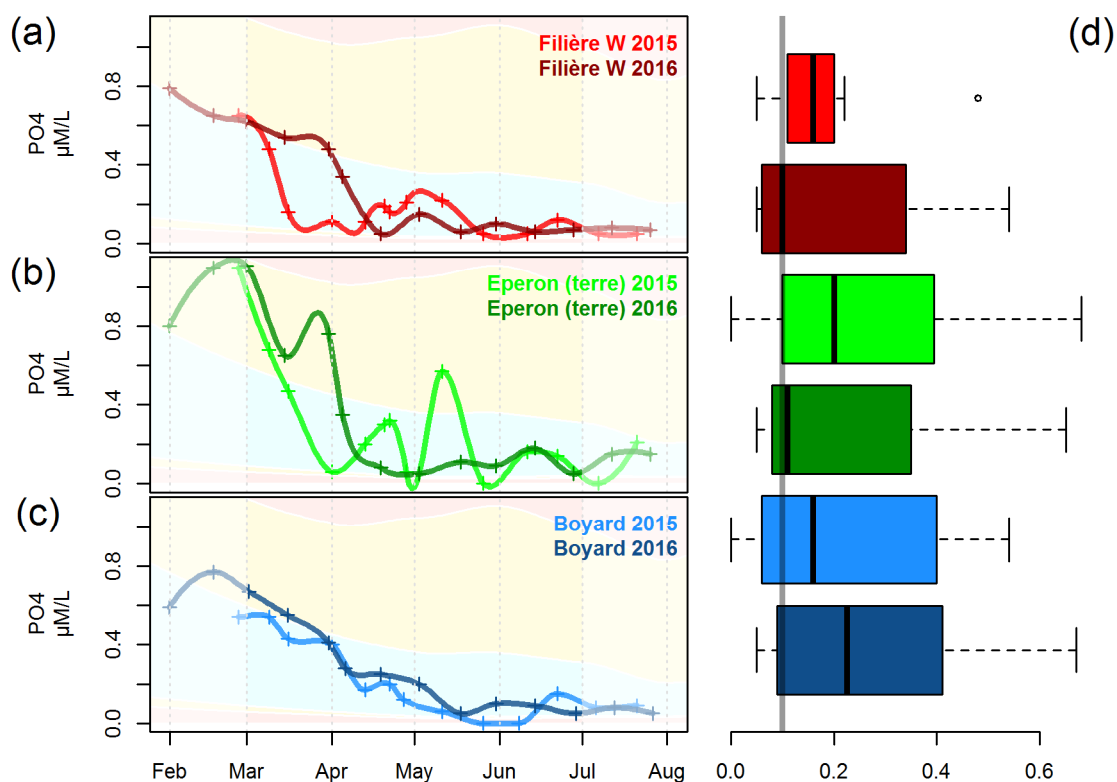


Figure 8 : évolution des concentrations en phosphates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles.

Le graphique (d) représente la distribution des valeurs observées pour chaque station et pour chaque année sur la période de mortalité (mars à juin (inclus)); la médiane de chaque série est signalée dans le boxplot (boite à moustache) permettant ainsi une comparaison avec la médiane de l'ensemble de la masse d'eau côtière de la DCE sur la même période, signalée par la ligne verticale grisée.

## Silicates

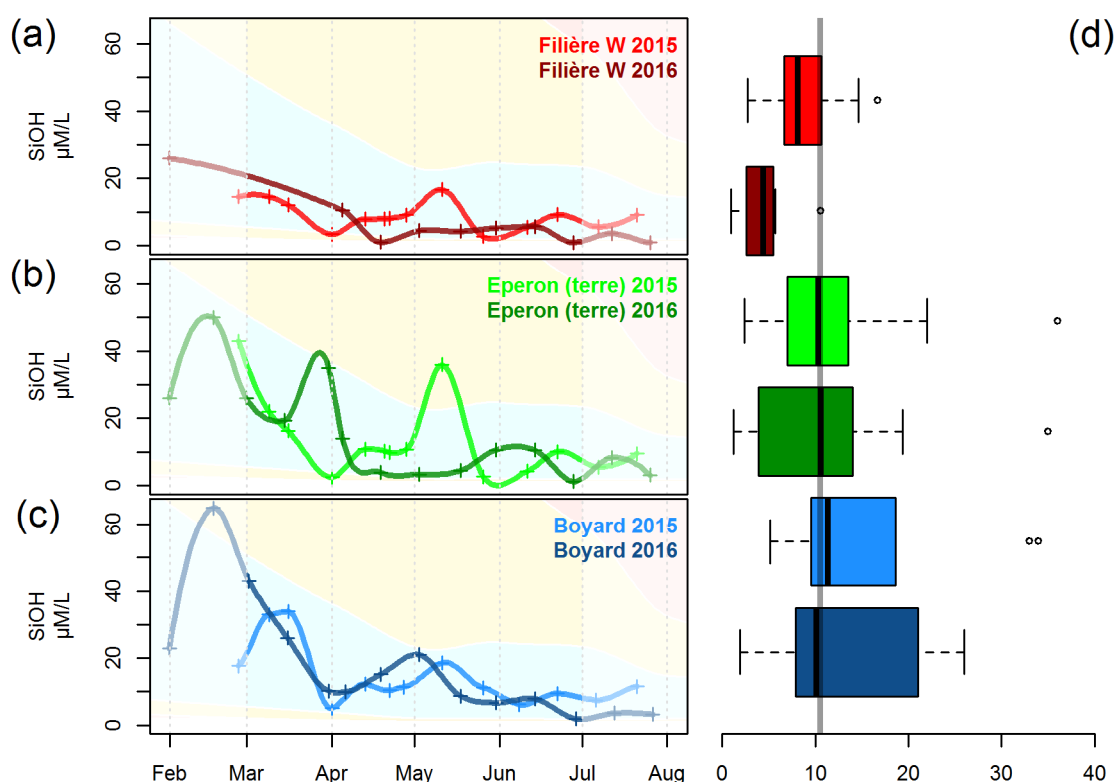
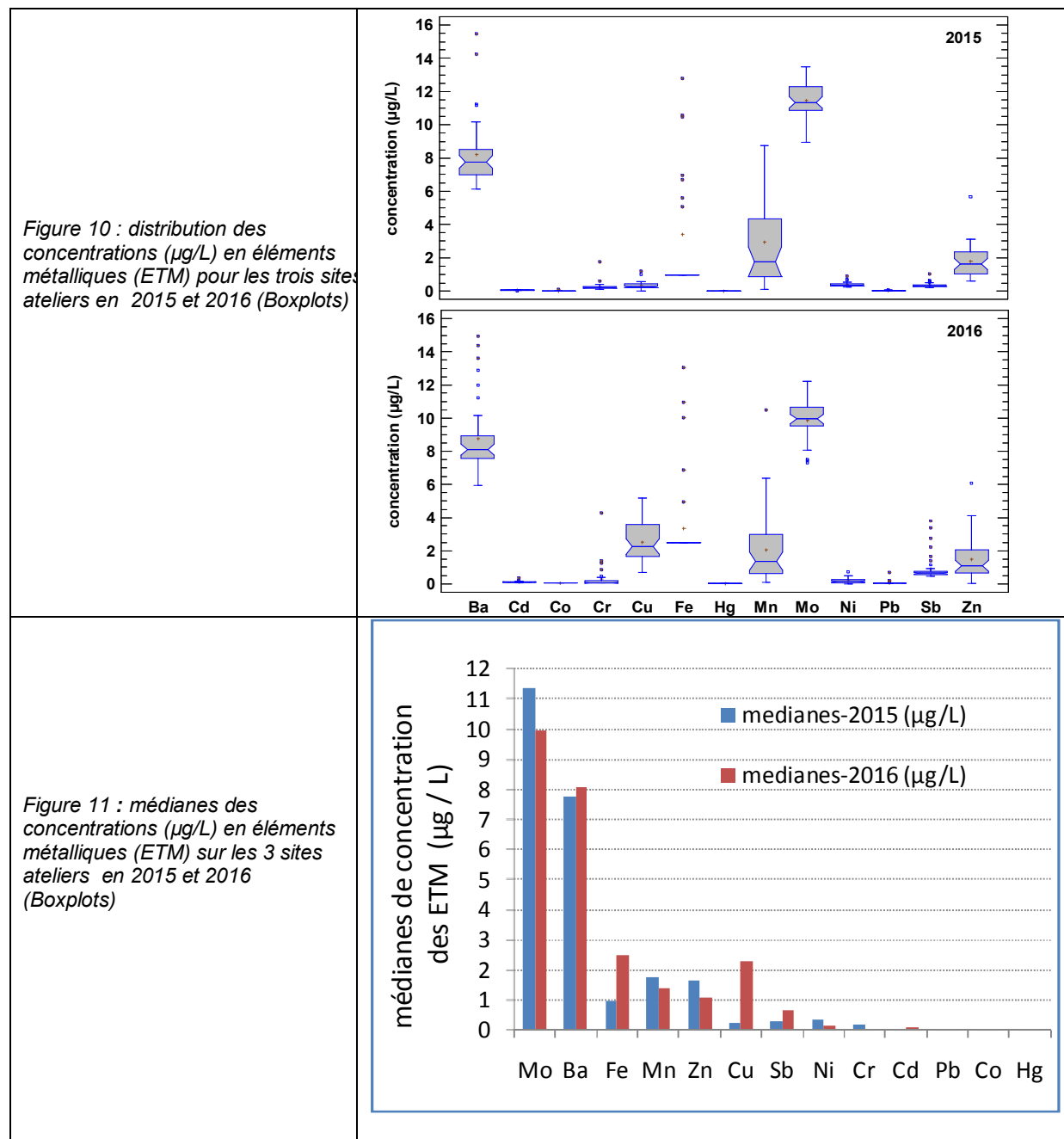


Figure 9 : évolution des concentrations en silicates aux stations Filière W (a) , Eperon (b) et Boyard (c) en 2015 et 2016 sur la période février à juillet (inclus). Ces séries sont qualifiées au regard des concentrations observées sur les masses d'eau côtière d'aquitaine suivi dans le cadre de la DCE entre 2010-2016 (Auby et al., 2016) : Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" (valeurs les plus souvent rencontrées). Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, ou les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles.

Le graphique (d) représente la distribution des valeurs observées pour chaque station et pour chaque année sur la période de mortalité (mars à juin (inclus)); la médiane de chaque série est signalée dans le boxplot (boite à moustache) permettant ainsi une comparaison avec la médiane de l'ensemble de la masse d'eau côtière de la DCE sur la même période, signalée par la ligne verticale grise.

## 2-Eléments traces métalliques

Sur treize éléments trace métalliques (ETM) mesurés : seuls le baryum (Ba) et le molybdène (Mo), puis dans une moindre mesure, le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) se rencontrent à concentration de quelques µg/L dans les pertuis charentais (Figure 10, Figure 11). La comparaison entre les trois sites, pour chaque ETM, et pour les deux années de mesures (26 comparaisons) ne montre pas de différence significative entre les sites, hormis pour le manganèse (Mn) en 2015 dont la concentration est plus forte sur Eperon que sur les deux autres sites. Par contre, entre 2015 et 2016, presque tous les ETM (sauf le baryum et le manganèse), présentent une différence de concentrations. A priori, les concentrations en ETM mesurées dans cette étude, sont cohérentes avec celles fournies par la littérature (Gaillardet et al., 2003 ; Dabrin et al., 2009).



Parmi les ETM pris en compte dans le cadre du projet, bon nombre d'entre eux présentent peu de variabilité spatiale et une grande stabilité inter-annuelle sur la période de mortalité (mars à juin), comme à l'image du baryum (Ba) (Figure 12a), le chrome (Cr), le manganèse (Mn), le fer (Fe), le zinc (Zn) et le mercure (Hg). Généralement pour ces ETM, les séries temporelles de 2015 et 2016 sont caractérisées par plus variabilité à la station la plus estuarienne de l'Eperon (pics ponctuels plus intenses), marquant ainsi son influence aux aléas du Lay et de la Sèvre Niortaise.

Pour le cadmium (Cd), le plomb (Pb), l'antimoine (Sb) et le cuivre (Cu), les concentrations apparaissent significativement supérieures en 2016 quelle que soit la station (Figures 12b et 12c) ; Bien que ces trois premiers ETM (Cd, Pb et Sb) présentent une grande stabilité sur la période de mortalité (de mars à juin inclus) en 2015 et 2016, une nette tendance à la hausse est observée pour Cu en 2016 (Figure 12c). L'empreinte du Cd sur les masses d'eau des pertuis

charentais marque une origine particulière de ces apports dont la source est généralement associée au fleuve Garonne.

Enfin, les concentrations en nickel (Ni) et en molybdène (Mo) apparaissent globalement plus fortes en 2015.

Pour certains de ces ETM, des Normes de Qualité Environnementale (NQE) existent ; Ces dernières ont pour objectif de définir des seuils à ne pas dépasser pour assurer une protection suffisante de la santé humaine et de l'environnement. Ainsi pour le Hg, le Pb et le Ni, les concentrations relevées sont nettement en dessous des NQE respectives (Directive 2013/39/UE). Néanmoins pour le cadmium, bien que les valeurs rencontrées soient quasi-exclusivement inférieures à la NQE Cd, leur fluctuation est très voisine du seuil, voire le dépasse exceptionnellement en février 2016 à la station Filière W.

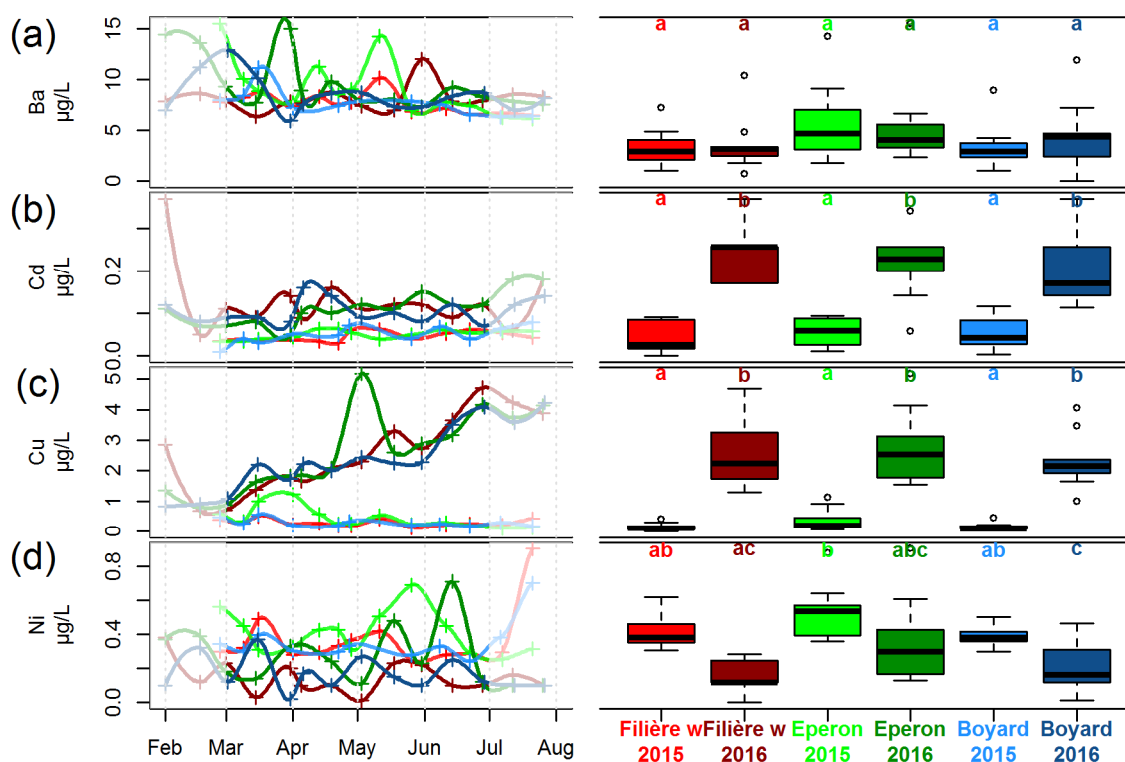


Figure 82 : évolution et distribution des concentrations en baryum (Ba) (a), en cadmium (Cd) (b), en cuivre (Cu) (c) et en nickel (Ni) (d) par station et par année : Filière w 2015 en rouge, Filière w 2016 en rouge foncé, Eperon 2015 en vert, Eperon 2016 en vert foncé, Boyard 2015 en bleu et Boyard 2016 en bleu foncé. Pour chaque distribution de valeurs observées sur la période mars à juin (inclus) une comparaison multiple (basée sur un test de Kruskal-Wallis) a été réalisée pour identifier les différences significatives pouvant exister entre chaque série : ces différences sont visualisables au travers des lettres présentées au-dessus de chaque boxplot des graphiques de droite de chaque ETM pris en exemple.

### 3- Contaminants hydrophiles

Une présentation détaillée des données 2015 et 2016 est proposée en Annexe 2.

Globalement, on peut observer pour l'ensemble des valeurs de concentrations en contaminants dans l'eau mesurées en 2015 et 2016 que, par rapport aux normes établies dans la Directive 2013/39/UE (normes qualitatives environnementales -NQE- relatives aux substances prioritaires dans les eaux) ; seules six substances répertoriées dans la norme sont présentes sur les 68 recherchées en 2015 et 2016 dans MORBLEU. **Les mesures montrent des**



**concentrations à l'état de traces avec des teneurs plus de 100 fois inférieures aux valeurs admissibles (NQE-CMA).** On pourra noter qu'un projet initié par le CRC Pays de Loire et réalisé par le SMIDAP (CAPMOULES 2015-2016, anonyme, 2016) dont un volet vise également à caractériser la qualité du milieu sur des sites mytilicoles par des mesures discrètes relève des concentrations en pesticides proches des valeurs observées dans l'action MORBLEU en 2015 et 2016 (Anonyme, Capmoules 2016). Cependant, au delà des comparaisons intersites de ces études on se gardera d'évaluer l'effet potentiel de ces concentrations en contaminants chimiques en mélange, hors des objectifs du projet, et pour lequel peu d'études sont disponibles sur « l'effet cocktail » des substances détectées en milieu marin (Vethaak *et al.*, 2017 ; Moreau *et al.*, 2015 ; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2014 ; Geret *et al.*, 2013).

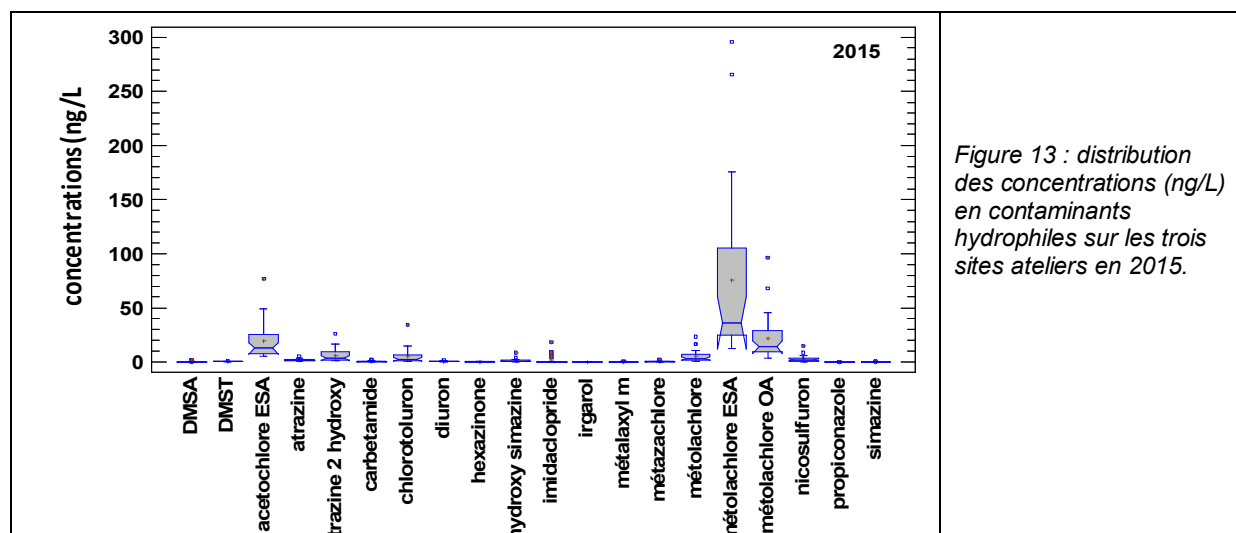


Figure 13 : distribution des concentrations (ng/L) en contaminants hydrophiles sur les trois sites ateliers en 2015.

### Données de la campagne d'évaluation de la contamination chimique de l'eau 2015 :

A partir des membranes POCIS exposées entre fin avril et mi-juillet 2015, 68 substances ou résidus ont été recherchés. Quantitativement, et parmi vingt contaminants détectés et analysés, trois d'entre eux : le métolachlore ESA, le métolachlore OA et l'acetochlore ESA représentent 81% des contaminants retenus sur les membranes POCIS (Figure 13) ; sept d'entre eux représentent 17,1% et dix autres, moins de 2%. Les concentrations de neuf contaminants sur dix suivent une cinétique décroissante de mars à mi avril bien corrélée aux apports des fleuves. Durant les premières périodes (mars-avril), les concentrations en contaminants sont deux à trois fois supérieures sur Boyard que sur Eperon ou Filière (Figure 14).

Pour trois campagnes d'exposition à dates communes (mi février-début avril) et pour lesquelles la série d'échantillons est complète, la somme totale des concentrations massiques de pesticides et de leurs résidus (cumul) a pu être calculée. Elle s'établit à **1306 ng** pour le site **du Boyard**, proche de l'estuaire de la Charente alors quelle est de **679 ng** pour le site **Filière** au nord du Pertuis Breton. La perte de matériel en mer au cours de l'étude pour le site d'Eperon n'a pas permis d'établir ce calcul. On pourra noter pour cette même période que la mortalité cumulée du lot sentinelle de moules était de 25% à Boyard et de 40% au site de Filière.

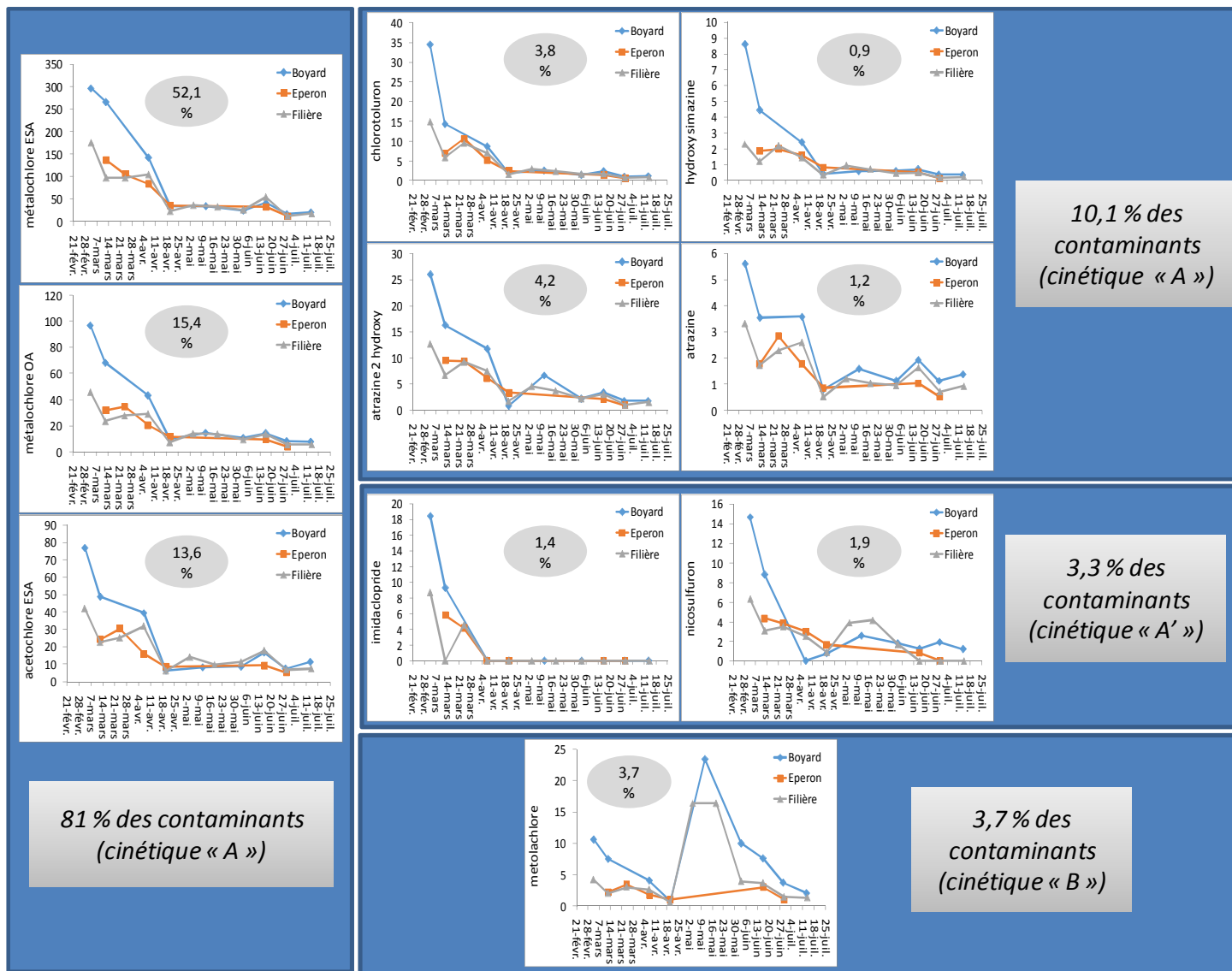


Figure 14 : « cinétiques d'évolution » de dix contaminants hydrophiles dans les pertuis charentais durant la campagne Morbleu 2015 (concentration en ng.L<sup>-1</sup>)

## **Données de la campagne d'évaluation de la contamination chimique de l'eau 2016 :**

Sur l'ensemble du suivi pesticide réalisé grâce au POCIS entre les mois de février et juillet 2016, 68 molécules ont été suivies sur les quatre sites de l'étude. Six lots de POCIS se sont succédé avec une durée d'immersion moyenne de 24 jours permettant d'obtenir les concentrations moyennes d'exposition des organismes sur cette période. Sur l'ensemble des 68 pesticides analysés, 37 ont été détectés au moins une fois sur l'un des sites.

Pour quatre campagnes d'exposition à dates communes (mi avril –début juillet) et pour lesquelles la série d'échantillons est complète, la somme totale des concentrations massiques de pesticides et de leurs résidus (cumul) a pu être calculée. Elle s'établit à **256 ng** pour le **site de Boyard**, **214 ng** pour le **site Filière** et **239 ng** pour le **site Eperon**. On pourra noter pour cette période que la mortalité cumulée du lot sentinelle de moules était de 28% à Boyard, 40% au site d'Eperon et de 45% sur le site de Filière.

Les données présentées ici correspondent à des périodes et des durées de campagnes différentes entre 2015 et 2016 et elles ne peuvent être comparées globalement compte tenu des forts effets saisonniers et de la différence d'échantillonnage (pertes de matériel pour certaines campagnes).

Si l'on s'intéresse à l'empreinte de contamination observée sur les différents sites, elle est assez constante sur l'ensemble des sites et largement dominée par les herbicides comme le métolachlore et ses métabolites, le métolachlore ESA et OA dont la somme des concentrations représente plus de 50% de pesticides totaux. Ces herbicides sont majoritairement utilisés sur la culture du maïs et compte parmi les pesticides les plus détectés dans les eaux de surfaces de la France métropolitaine (agences et offices de l'eau. Traitements : SOeS, 2015). L'acétochlore et ses métabolites également utilisés en maïsiculture sont aussi détectés. Le reste de l'empreinte est encore marquée par l'atrazine et ses métabolites (DEA, atrazine 2 hydroxy) et dans une moindre mesure par la simazine malgré leur interdiction d'usage en France qui date de 2005. Les autres herbicides détectés à des niveaux contribution variant entre 1 et 5% sont l'isoproturon, le chlorotoluron utilisé sur la culture du blé et de l'orge et le nicosulfuron plutôt utilisé sur le maïs. Il faut également noter la présence d'imidaclopride, insecticide ayant un usage agricole et vétérinaire.

**En résumé :** L'étude descriptive du contexte environnemental des pertuis charentais au travers de trois paramètres que sont les **nutriments**, les **éléments trace métalliques** dissous et les **contaminants chimiques dissous** montre que :

i) les apports en nutriments (NO<sub>3</sub>, SiOH, PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>) mesurés en 2015 et 2016 présentent des niveaux de concentration proches, non significativement différents et supérieurs aux valeurs fournies par la chronique sur 15 ans établie par le REPHY ou la série sur huit ans établie dans le cadre de la DCE ;

ii) globalement, l'étude comparée des teneurs éléments trace métalliques (13 éléments) ne montre pas de différence significative entre les trois sites ateliers (Boyard, Eperon, Filière) ni entre les deux années, hormis pour le cadmium plus concentré en 2016 pour les trois sites ;

iii) les contaminants chimiques hydrophiles sont détectés sur POCIS à l'état de traces (<< NQE-CMA) en 2015 comme en 2016 sans présenter de grandes différences entre les trois sites.

## Contribution des fleuves aux apports dans les pertuis charentais

Aujourd'hui, le développement de la modélisation hydrodynamique à une fine échelle spatiale (500 m) permet l'investigation de l'impact des fleuves à l'intérieur des pertuis charentais (modèle Mars3D « Pertuis-Charentais »). Dans le volet environnemental de l'étude sur les mortalités de moules, le modèle hydrodynamique simule les apports en eau douce de tous les fleuves dont l'influence est significative sur les trois sites ateliers du projet. Il permet donc, d'une part de comprendre l'origine quantitative de l'eau douce dans les pertuis, mais également de mettre en relation les apports de matériel dissous (ETM, nutriments et contaminants) des trois sites ateliers, avec une source potentielle (fleuves et bassins versants).

### Etude de la période hiver-été 2015. Caractérisation des sites ateliers

Les apports d'eau douce diminuent entre février et juillet, avec une « rupture » autour de la troisième semaine de mai (Figure 15). La contribution des fleuves aux apports en eau douce représente, sur Filière et Boyard, respectivement 47% et 53% de celle sur Eperon (soit environ 2 fois moins d'apports en eau douce). Sur Eperon, la Sèvre et le Lay constituent les 2/3 des apports. Les fleuves externes aux pertuis (Loire, Garonne et Dordogne) contribuent de la même manière sur les trois sites ateliers (Figure 16). Leurs apports sont quantitativement du même ordre pour chacun des trois sites (valeurs relatives de 20 et 10, respectivement pour la Gironde et la Loire ; Figure 18). La Charente impacte 3-4 fois plus Boyard que les deux autres sites ateliers. L'apport en eau douce des fleuves 'Charente + Gironde', est plus élevé sur Boyard. Il est du même ordre de grandeur sur Filière et Eperon (Figure 16). Les apports des fleuves externes aux pertuis charentais sont surtout hivernaux et printaniers pour la Gironde (sud des pertuis) et plutôt estivaux pour la Loire (située au nord).

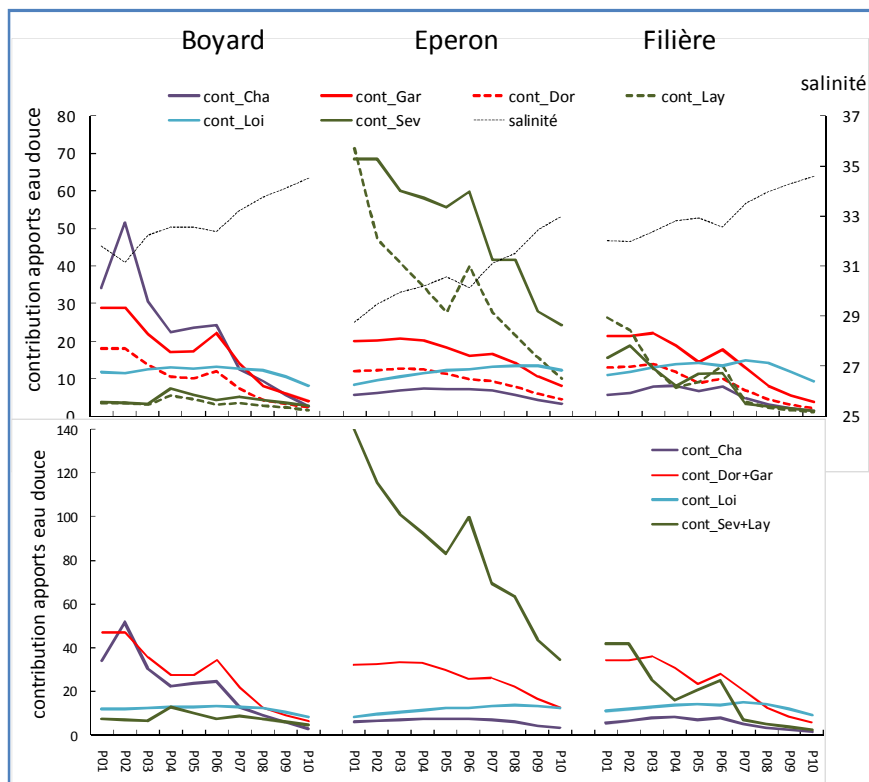
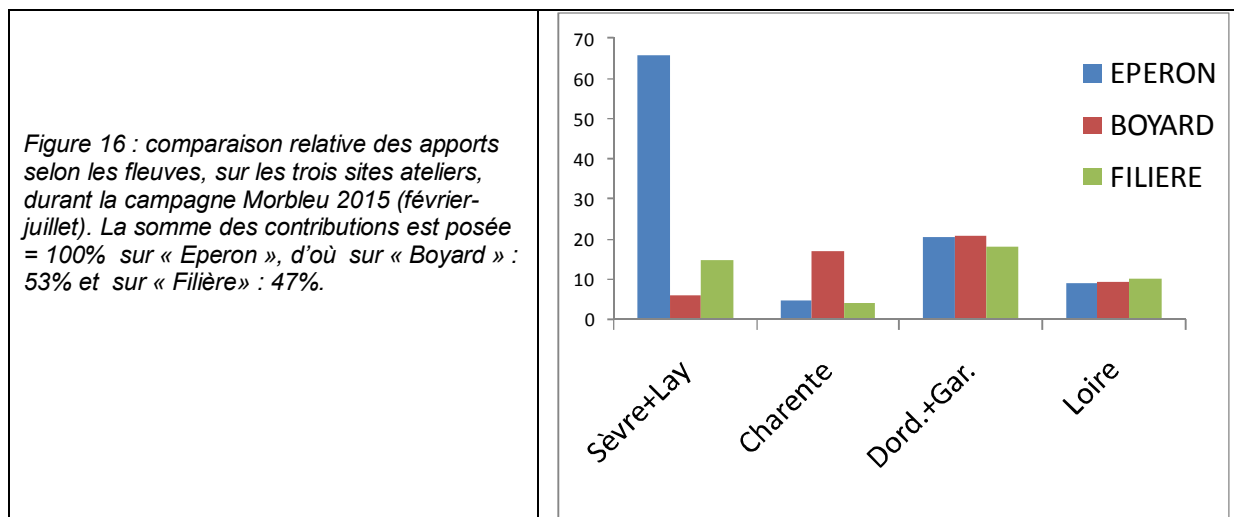


Figure 15 : contribution\* des fleuves aux apports sur les sites ateliers (Boyard, Eperon et Filière) pour chacune des 10 périodes de l'étude (campagne 2015) ; A : les six principaux fleuves ; B : regroupement des fleuves par secteur géographique (\* quantité de traceurs calculée par le modèle).



La caractérisation hydrologique fait bien apparaître des analogies entre les sites de Boyard et Filière situés respectivement au N-O des pertuis d'Antioche et Breton. Une ACP combinant les variables sels nutritifs, contaminants dissous et contribution des fleuves aux trois sites (Figure 17) confirme l'influence terrigène du Lay et de la Sèvre pour le site d'Aiguillon-Eperon. Les caractéristiques hydrologiques des trois mois d'hiver sont homogènes pour chacun des sites respectivement. Alors que les conditions hydrologiques des mois printaniers (mai en particulier) sont fortement contrastées, les conditions estivales apparaissent très homogènes sur les trois sites comparés entre eux.

### **Relation entre les apports des fleuves et les contaminants**

Les contaminants hydrophiles (9/10) sont positivement corrélés aux apports de Charente, de Dordogne et de Garonne (Figure 17). La corrélation avec les contaminants est significativement supérieure avec les apports de Dordogne et de Garonne, qu'avec ceux de Charente. La Loire, la Sèvre et le Lay ne paraissent pas liés aux apports de contaminants hydrophiles dans les pertuis charentais au cours de la campagne 2015. Le site de Boyard, soumis tout à la fois aux apports de la Charente, de la Dordogne et Garonne, présente les plus fortes concentrations de contaminants en 2015 (Figure 14).

### **Etude sur la période de septembre 2014 à août 2015 (20 stations de référence)**

Dans les Pertuis Charentais, les apports sont sous influences de trois « ensembles hydrauliques » d'importance sensiblement égale : (i) au sud des Pertuis Charentais, le panache de la Gironde (Garonne et Dordogne) (34% des apports) ; (ii) dans le pertuis Breton, la Sèvre et le Lay (28 % des apports) ; (iii) dans le pertuis d'Antioche-Bassin de Marennes-Oléron, la Charente (29% des apports). La contribution de la Loire est plus modeste (8 %). Les fleuves internes représentent durant cette période environ 55 % des apports. Les apports relatifs pour les quatre saisons (hiver, printemps, automne et été) sont d'environ 40 %, 30 %, 20 % et 10 %.

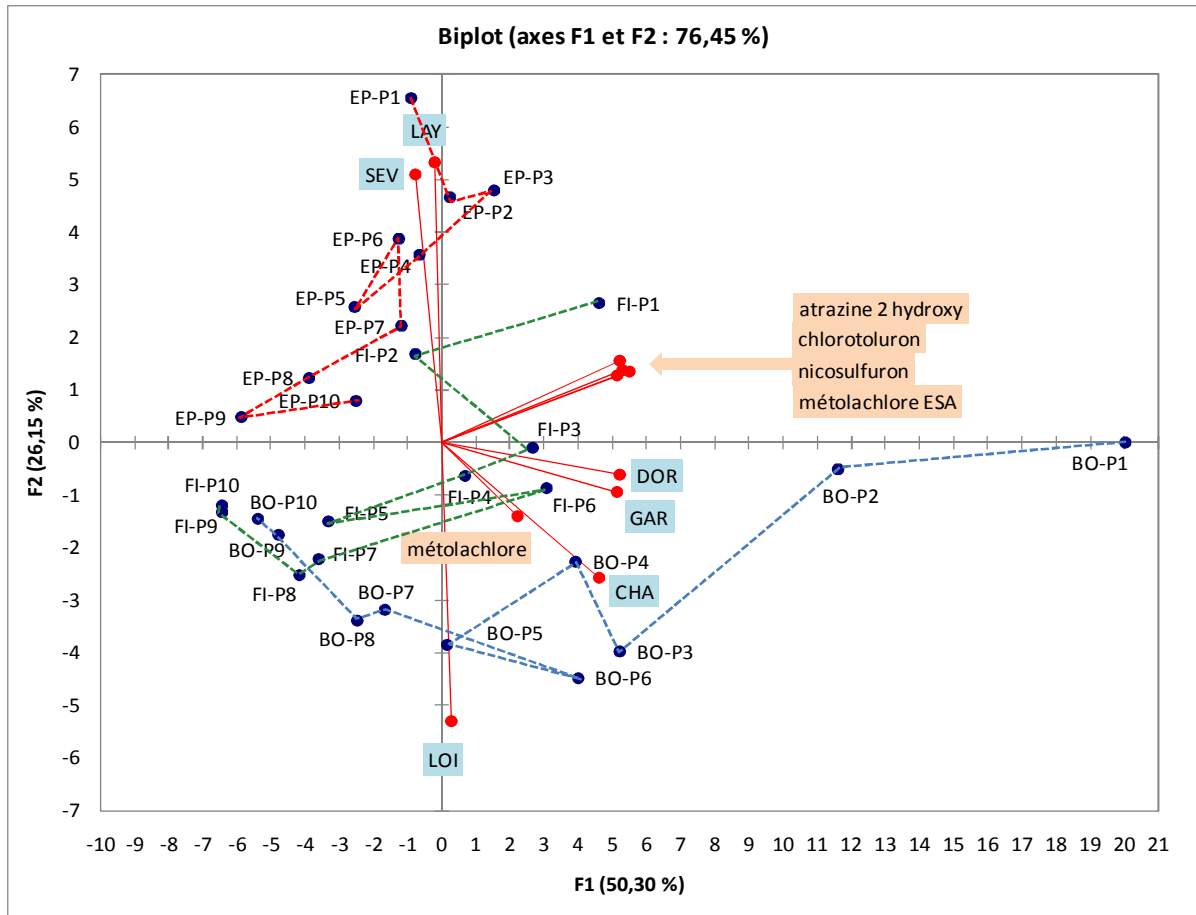


Figure 17 : représentation des variables de la campagne 2015 (contaminants, contribution des fleuves : LOire, LAY, SEVre, CHArente, DORdogne et GIRonde) et des « sites-périodes » (FI-P3 = Filière durant la période 3) sur les axes 1 et 2 de l'ACP (76 % de variabilité).

**OBJECTIF 2 : QUELLES HYPOTHESES EXPLORER POUR  
EVALUER LES FACTEURS FAVORISANT LES EPISODES DE  
MORTALITE DE MOULES ?**





### 3. Objectif 2 : Quelles hypothèses explorer pour évaluer les facteurs favorisant les épisodes de mortalité de moules ?

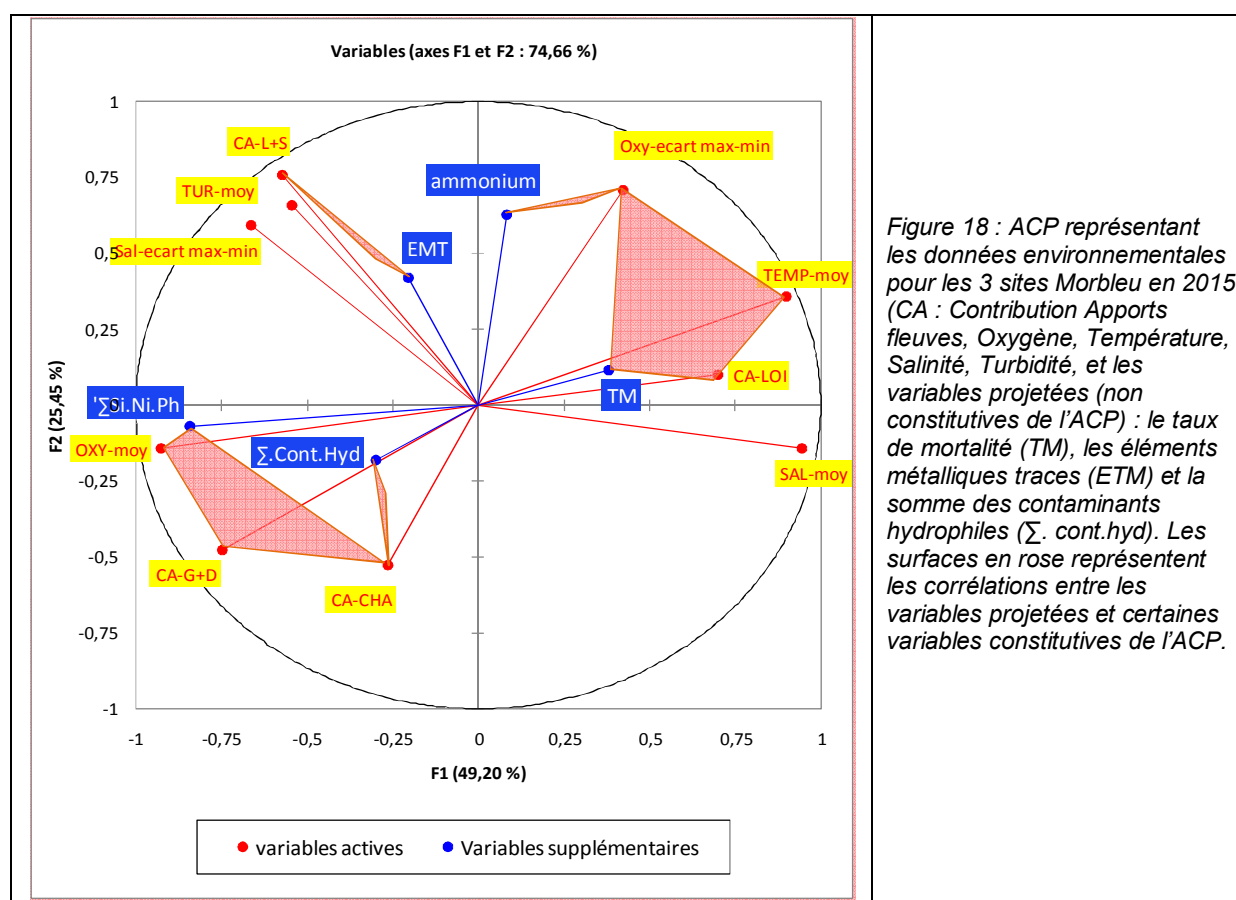
#### 3.1. Hypothèses concernant l'environnement

##### 3.1.1. Etude de la relation entre les épisodes de mortalité de moules 2014, 2015 et 2016 et certains paramètres environnementaux abiotiques : une fragilisation des moules selon les sites en lien avec des substances dissoutes ?

L'objectif de cette analyse est de comparer l'environnement hydrologique et physico-chimique des trois sites ateliers de l'action Morbleu (Boyard, Filière et Eperon) et d'étudier les relations possibles de certaines caractéristiques de ces sites avec les épisodes de mortalité des moules bleues, *Mytilus edulis*, dans les pertuis charentais.

En 2016, les analyses de tous les paramètres environnementaux n'étant pas encore achevées, ils feront l'objet d'une étude comparée ultérieurement.

Dans le cadre de cette étude conduite à partir des résultats de l'année 2015, des ACP réalisées sur les données environnementales des sites ateliers ne permettent pas de qualifier une relation ou un lien entre les épisodes de mortalité de moules, et le matériel dissous, qu'il s'agisse des éléments trace métalliques (ETM), des contaminants hydrophiles ou des sels nutritifs. Une relation entre l'augmentation du taux de mortalités (TM) et les variations de teneur en oxygène dissous est observée (Oxy-écart), de même qu'avec la température (Figure 18).



## Discussion

Les résultats de cette étude montrent pour l'année 2015 que **les conditions physico-chimiques** opposent d'abord des sites à « caractère océanique » que sont Boyard ( $31 \leq \text{sal} \leq 33$ ) ou Filières ( $32 \leq \text{sal} \leq 34,5$ ), avec le site estuarien d'Eperon ( $28 \leq \text{sal} \leq 33$ ), pour lequel les fluctuations environnementales (écarts de turbidité, d'oxygène dissous, de salinité, ...) sont plus marquées en hiver, mais surtout au printemps. En été, en période d'étiage, les conditions environnementales sont bien plus homogènes sur les trois sites. Aujourd'hui, l'utilisation de la **modélisation hydrodynamique** permet l'investigation à l'intérieur des pertuis charentais et contribue significativement à leur étude (Polsenaère *et al.*, 2017). Le modèle permet de quantifier les apports des différents fleuves (internes et externes au Pertuis) en tous points des pertuis. Ainsi, durant la **campagne Morbleu 2015** (février 2015 à juillet 2015), les simulations hydrodynamiques **sur les trois sites ateliers** (Boyard, Eperon et Filière) montrent que les **fleuves externes aux pertuis charentais représentent près de 50% des apports**.

Durant la période **d'octobre 2014 à aout 2015**, à partir d'une évaluation sur 20 stations, les fleuves externes représentent 45% des apports. Ces résultats permettent d'appréhender la qualité environnementale des pertuis charentais en montrant que **les apports quantitatifs d'eau douce, avec leur cortège de molécules dissoutes, terrigènes et anthropiques, peuvent provenir tout autant des fleuves externes aux pertuis, que des fleuves internes**.

Quantitativement, les apports en eau sont deux fois supérieurs sur Eperon que sur Boyard (53% des apports d'Eperon) et Filière (43% des apports d'Eperon). Sur Eperon, près de 70% des apports proviennent de la Sèvre et du Lay. Les valeurs de contribution des fleuves sont indicatives et correspondent à des simulations sur une période précise associée à une météo qui lui est rattachée. Sur les sites océaniques que sont Boyard et Filière, près de 60% des apports proviennent des fleuves externes aux Pertuis, dont 40% de la Garonne et Dordogne. Par contre, sur le site Filière, 30% des apports proviennent de la Sèvre et du Lay. Sur Boyard, 30% proviennent de la Charente.

L'analyse environnementale montre que les contaminants hydrophiles mesurés sur les sites viendraient potentiellement surtout de la Gironde et de la Charente (et moins du Lay et de la Sèvre). Ainsi, la contribution conjointe de la Gironde et de la Charente, sur Boyard pourrait expliquer les plus fortes concentrations de contaminants retrouvées sur ce site en 2015 (1<sup>ère</sup> hypothèse). Deuxième hypothèse possible, au regard des valeurs de concentrations de pesticides dans l'estuaire de la Charente d'une part (ex :  $\sum \sim [50-200\text{ng.L}^{-1}]$ , 2011-2013 ; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2014) et compte tenu du temps de transport des masses d'eau provenant de la Gironde d'autre part (évaluée à environ quatre semaines, Le Moine, 2017 *pers. com.*), on peut supposer que **les apports de la Charente en pesticides sont dominants dans le secteur de Boyard**.

Ceci d'autant que l'action du temps de dispersion et l'interaction des matières organiques avec les pesticides et leurs métabolites concourent à les dégrader et à en baisser la concentration (Cruz, 2015). La contribution équivalente des fleuves : Charente + Gironde, sur les deux autres sites : Filière et Eperon, pourrait également expliquer les mesures de contaminants hydrophiles équivalentes sur ces deux sites.

**Les mortalités de moules**, en 2015, sont de l'ordre de 51% sur filièrè, 24% sur Boyard et 22% sur Aiguillon (d'après Robert *et al.*; 2016). Même si indéniablement, des conditions exceptionnelles d'apports d'eau douce, en février 2014 sont concomitantes avec l'émergence

d'une mortalité massive de moules à la même période dans le N-O du pertuis Breton, rien ne permet d'établir un lien entre les apports d'eau douce (en tant que telle) et les mortalités observées.

**En résumé : en 2015, au cours de la deuxième année de mortalités dans les pertuis charentais, les conditions climatiques d'un hiver plus froid et moins pluvieux qu'en 2014 semblent moins favorables à l'expression de ces mortalités.**

Les contaminants chimiques dissous, plus présents en concentration sur Boyard que sur les autres sites, ne semblent pas présenter de lien avec le taux de mortalité qui reste plus faible sur Boyard que sur Filière (juillet 2015 : BO= 24% vs FI= 39%). **Ainsi, dans le cadre de cette étude relative à 2015, les analyses présentées ici ne permettent pas d'établir une relation entre les épisodes de mortalité de moules et le matériel dissous, qu'il s'agisse des éléments traces métalliques (ETM), des contaminants hydrophiles ou des sels nutritifs. Toutefois, on note en 2015 et 2016 une richesse accrue des eaux des Pertuis en N et P par rapport aux masses d'eau d'Aquitaine, ce qui peut induire un milieu plus favorable aux bactéries car la photosynthèse est limitée par la turbidité. De même, une variabilité inter-annuelle pour certains ETMs est observée et ils pourraient participer à orienter la structure de communautés microbiennes (Fe, Cu). L'apparition du pic printanier de mortalité semble corrélée (directement ou indirectement) aux variations de la teneur en oxygène de l'eau de mer ; variations qui traduisent vraisemblablement un développement intense phytoplanctonique et/ou microbiologique (cyanobactéries). Par ailleurs, un lien entre l'augmentation du taux de mortalité au printemps et la température est établi.**

**Compte tenu du caractère saisonnier des premières mortalités (mars-avril) associé aux premières pontes et aux premières efflorescences phytoplanctoniques, les liens et corrélations énoncés ci-dessus pourraient relever plus de concomitances que de causalité. Il conviendra de préciser dans le futur la nature et la qualité de ces relations.**

### 3.1.2. Evolution à moyen terme et dynamique saisonnière des équilibres microbiens : y aurait-il un lien avec les mortalités de moules ?

Très rapidement après l'émergence des intenses mortalités de moules survenues en 2014 dans les pertuis charentais, l'hypothèse d'une origine infectieuse associée (dans des conditions environnementales singulières) avait été formulée (Béchemin *et al.*, 2014) : une forte concentration de bactéries potentiellement pathogènes, du genre *Vibrio*, pour les moules (François, 2015) avait alors été détectée. Des expérimentations de laboratoire ont ensuite étayé l'hypothèse : des mortalités de moules saines infectées à partir de souches bactériennes isolées depuis les individus moribonds ayant été reproduites (Béchemin *et al.*, 2015).

Dans les environnements aquatiques naturels, les bactéries font partie intégrante du compartiment microbien au sein duquel des interactions, notamment biotiques, interviennent (Bertrand *et al.*, 2011).

En milieu marin, les interactions bactérie-phytoplancton sont largement décrites (Bratbak et Thingstad, 1985 ; Rooney-Varga *et al.*, 2005 ; Droop, 2007 ; Goecke *et al.*, 2010 ; Tada *et al.*, 2011 ; Amin *et al.*, 2012 ; Buchan *et al.*, 2014). En particulier, les *Vibrio spp* montrent des affinités

générales avec le phytoplancton (Hsieh *et al.*, 2007), et plus spécifiquement avec certaines espèces, voire des antagonismes avec d'autres (Olofsson *et al.*, 2013).

En outre, les communautés microbiennes évoluent dans le temps et dans l'espace au grès des fluctuations de l'environnement : qu'elles soient naturelles ou anthropiques, régionales ou globales, les conditions environnementales vont guider, orienter la structure des communautés de bactéries et de phytoplanctons ainsi que leurs interactions. Les changements globaux y contribuent largement, notamment ceux associés au réchauffement (Moran *et al.*, 2010 ; Vezzuli *et al.*, 2013). L'effet de l'augmentation des températures est également perçu au niveau trophique supérieur : l'étude d'Asplund *et al.* (2014), soulevant la question de l'interaction hôte-organisme pathogène entre la moule bleue (*Mytilus edulis*) avec la bactérie *Vibrio tubiashii* vis-à-vis de la température, montre qu'il est fort probable que les conditions environnementales à venir (au regard des projections climatiques) déstabiliseraient l'interaction en faveur du microbien.

Dans le contexte climatique actuel (impactant notamment les températures des eaux de surface de la façade atlantique (Costoya *et al.*, 2015)), n'y a-t-il pas lieu de penser que l'évolution de ces interactions biologiques s'exprime dans les pertuis charentais et se traduit par l'émergence d'épisodes de mortalité chez les moules bleues en association à une/des infections bactériennes?

L'étude des fluctuations environnementales des pertuis charentais sur le moyen terme montre de récentes évolutions (Travers *et al.*, 2016) ; en effet, la typologie des 16 dernières années, sur une base climatique (température et pluviométrie) et hydrobiologique (flore phytoplanctonique comme indicateur de « l'ambiance microbienne »), fait apparaître des groupes d'années bien distincts. Ainsi au regard de ces 16 dernières années, on relève en 2011, 2014, 2015 et 2016 des conditions climatiques hivernales et printanières singulières, plutôt chaudes et pluvieuses, associées à des baisses de diversités phytoplanctoniques (Figure 19).

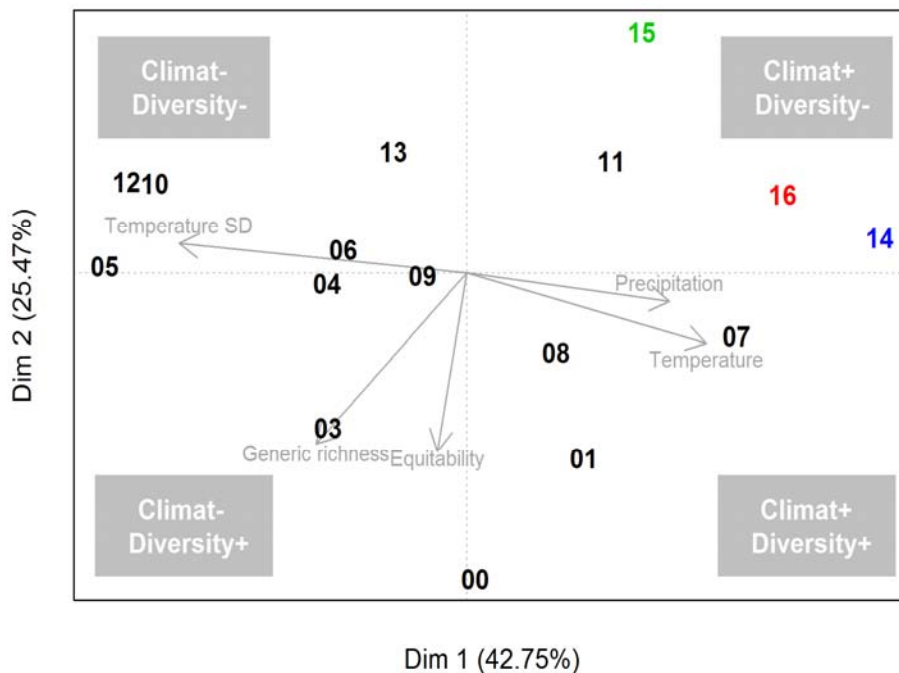


Figure 19 : typologie des années sur la base des conditions environnementales rencontrées dans le nord des pertuis charentais (pertuis Breton) résultant d'une analyse triadique partielle (compromis) réalisée sur les variables environnementales (du premier semestre des années 2000 à 2016 représentées de 00 à 16 et identifiées en couleur pour les années à surmortalité) suivantes :

- climatiques (Météo France / station "Chassiron") : moyennes et écarts-types mensuels des températures atmosphériques (Température et Température SD), cumuls mensuels des précipitations (Précipitation),
- hydrobiologiques (Ifremer/Quadrige/ station Rephy "L'Eperon terre") : richesse générique (Generic richness) et équitabilité (Equitability).

Les flèches correspondant à chacune des variables environnementales permettent de distinguer des conditions particulières pour chacun des 4 sous-ensembles de la représentation : ex. climat + et diversity - en haut à droite pour l'expression d'un climat plutôt chaud et pluvieux associé à des diversités phytoplanctoniques plutôt faibles.

On observe cependant dans les pertuis charentais que l'année 2015, qui a présenté globalement des niveaux de mortalités bien plus faibles que 2014 et 2016 (cf. § 2.2.1), est caractérisée par un hiver plus froid et moins pluvieux que ces deux années là.

Ces observations montrent que les conditions environnementales des organismes aquatiques se développant dans le nord des pertuis charentais ont globalement évolué ces dernières années. Parallèlement depuis 2014, des épisodes de mortalité de moules sont observés chaque fin d'hiver ou début du printemps et touchent différents secteurs de productions mytilicoles des pertuis charentais et de vendéens (Travers *et al.* 2016).

Pour les trois dernières années (2014-2016) et grâce à l'analyse des données de lecture des flores totales phytoplanctoniques bancarisées et réalisées par le REPHY, l'initiation du phénomène saisonnier de mortalité survient de manière relativement concomitante avec des efflorescences printanières de phytoplanctons qui entraînent par nature des baisses de leur diversité (Figure 20) : en nombre d'"espèces" ou taxons, au niveau du genre (richesse générique), et particulièrement de leur équilibre relatif (équitabilité).

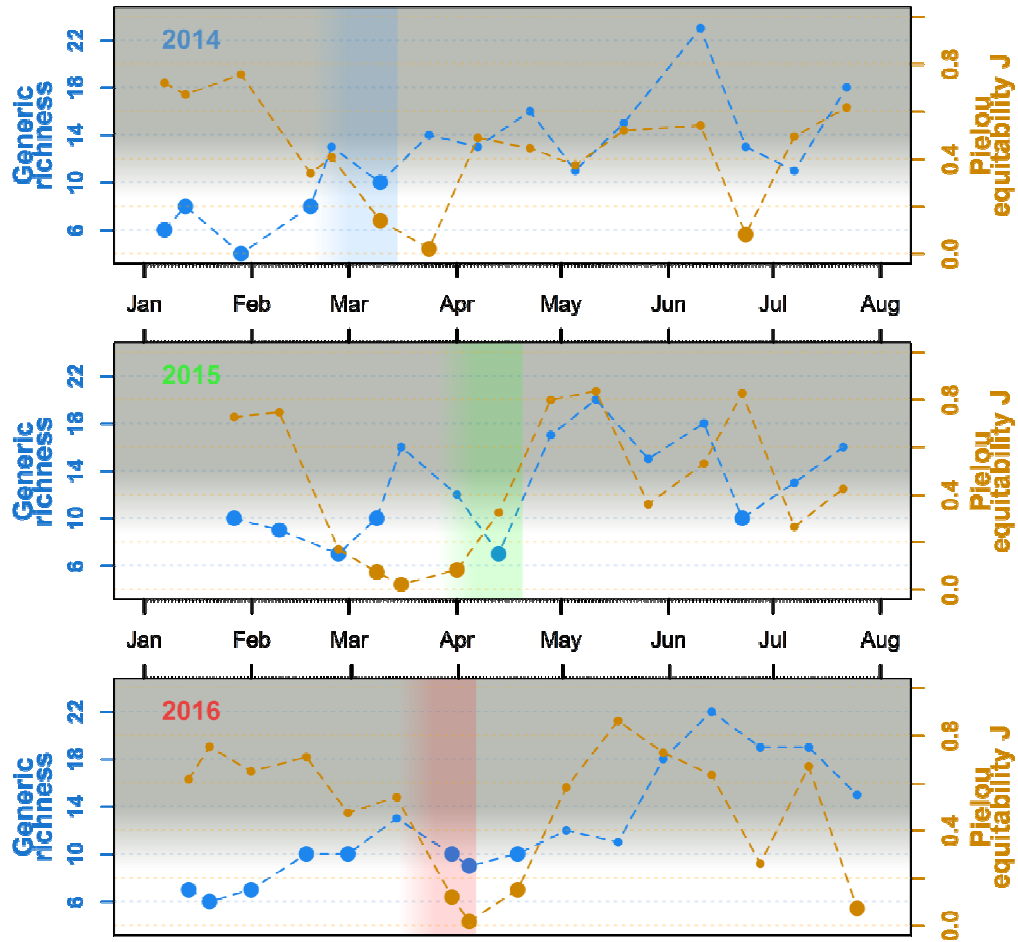


Figure 20 : dynamique des indicateurs de diversités phytoplanctoniques, richesse générique et équitabilité, des mois de janvier à août en 2014 (en haut), 2015 (au milieu) et 2016 (en bas) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton (Ifremer/Quadriga). Les bandes verticales (polygones) de couleurs (bleu, vert et rouge pour respectivement 2014, 2015 et 2016) correspondant à chaque année présentée en figure 16, illustrent la période estimée de début de mortalité de moules s'appuyant sur la base des informations de terrain des professionnels et des suivis conchylicoles de Ifremer

Les investigations menées en 2015 dans le cadre de l'action Morbleu par des approches NGS<sup>3</sup> en métabarcoding (Taberlet *et al.*, 2012) montrent que la période d'initiation du phénomène de mortalité de moules est également marquée par des modifications des équilibres bactériens (Figure 21).

En effet, parallèlement à la baisse de la richesse taxonomique, on observe d'une part que les abondances relatives des taxons bactériens (OTU) les plus dominants baissent au profit de taxons plus confidentiels (Figure, graphique du haut) et, une baisse des abondances relatives de la classe des Alphaproteobacteria au profit de celle des Flavobacteria, d'autre part (Figure 21, graphique du bas).

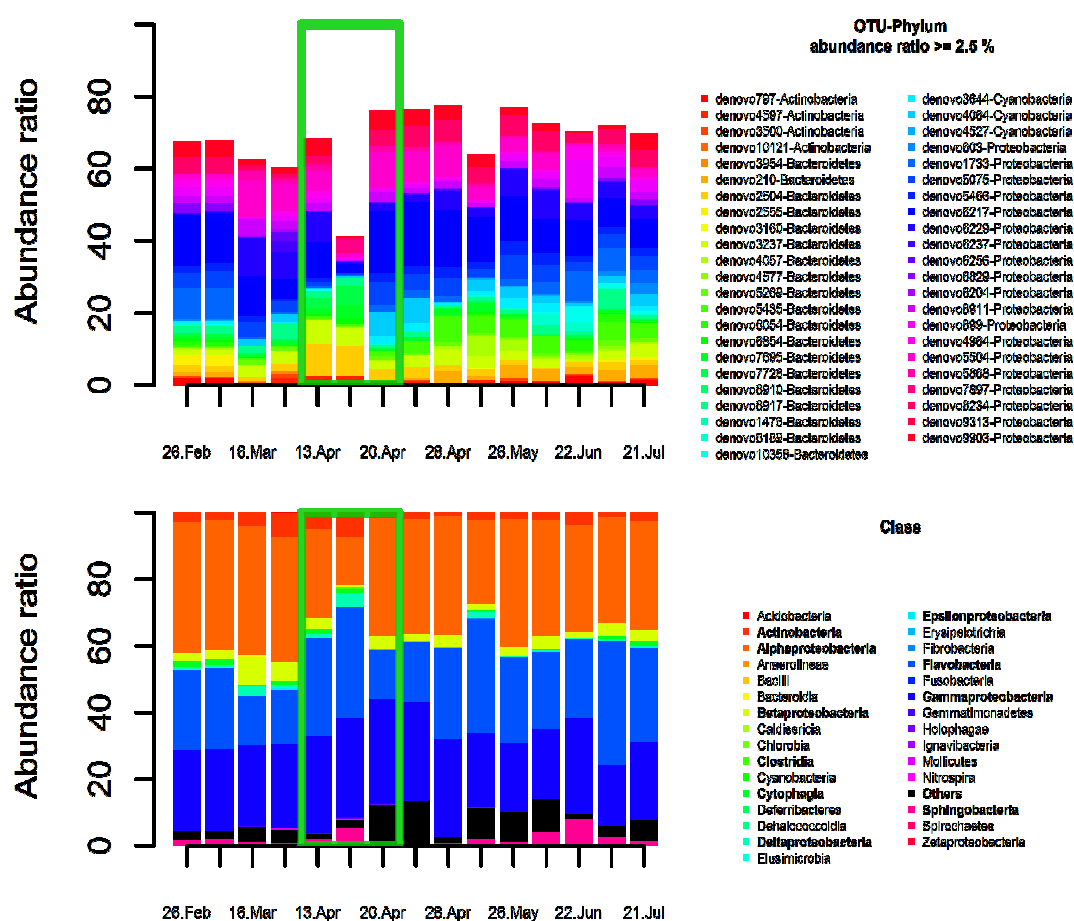


Figure 21 : évolution hivernale et printanière de l'abondance relative des OTU (en haut) et de classes de bactéries (en bas) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton en 2015. Les classes le plus représentées et visualisables sur le graphique du bas figurent en gras. Les cadres verts sur chaque graphique illustrent la période estimée de début de mortalité.

En 2015 dans les pertuis charentais, les épisodes de mortalité des moules ont été caractérisés par des intensités spatialement variables : seul le secteur le plus maritime des filières du pertuis Breton, a été touché significativement par le phénomène.

<sup>3</sup> NGS (Next-Generation Sequencing) : "Nouvelles technologies de séquençage qui permettent la production à moindre coût de milliers de paires de bases (pb) par seconde. Ces millions de séquences sont autant de nouveaux indices qui viennent éclairer notre connaissance du vivant" (Cruaud et Rasplus, 2012).

La comparaison détaillée des flores bactériennes aux trois points échantillonnés en 2015 permet de distinguer des singularités sur le site situé au sein des filières du pertuis Breton.

Parmi les bactéries spécifiques de ce site (identifiées en période de début de mortalité), on compte de nombreux taxons appartenant à la classe des *Flavobacteria*. Cette classe présente des espèces pathogènes pour les poissons (Nicolas *et al.*, 2008 ; Loch et Faisal, 2015), mais elle est aussi incriminée pour des lésions cutanées spécifiques à certains crustacés (Chistoserdov *et al.*, 2005).

En outre, la classe des *Flavobacteria* est également reconnue pour se développer lors de bloom de phytoplancton, notamment dans la phase de dégénérescence de l'efflorescence algale (Pinhassi *et al.*, 2004 ; Buchan *et al.*, 2014). Dans ce sens, les travaux de Scheibner *et al.* (2014) montrent une émergence de taxons bactériens supplémentaires dans des conditions thermiques plus élevées (simulant le réchauffement global), particulièrement de *Bacteroidetes* (phylum de la classe de *Flavobacteria*). Les conclusions de cette étude précisent également qu'au cours du réchauffement, la communauté bactérienne serait en mesure de bénéficier de l'efflorescence phytoplanctonique de telle manière que leur production compense les pertes liées à la prédation.

Bien qu'aucun travail ne décrive actuellement de caractère pathogène aux bactéries de la classe de *Flavobacteria* sur les mollusques marins (notamment les moules), Martins *et al.* (2013) montrent que leur présence, en complément de bactéries pathogènes du genre *Vibrio*, induit des réponses immunitaires plus fortes chez la moule d'eau profonde (*Bathymodiolus azoricus*) qu'en leur absence. Ces observations sont autant de pistes qui ouvrent la voie à des expérimentations de laboratoire pour tester l'hypothèse d'une action conjointe de bactéries pouvant être liée aux phénomènes conjoncturels de mortalité de moules. Ces expérimentations pourraient être développées dans le cours des années 2017, 2018.

Les nombreuses investigations complémentaires menées en 2016 dans le cadre de l'action MORBLEU (en cours d'analyse) devraient permettre d'étayer le lien entre les équilibres microbiens et les mortalités de moules. Les analyses de métabarcoding sont attendues notamment pour soutenir l'idée de la concomitance d'évènements entre le déséquilibre microbien de fin d'hiver et de début de printemps (en tout ou partie lié à l'efflorescence phytoplanctonique) et l'initiation du phénomène de mortalité : l'objectif étant de souligner un ou des cortège(s) singulier(s) de bactéries et de phytoplancton. Egalement afin d'étayer l'hypothèse d'une association bactérienne liée aux épisodes de mortalité, les résultats d'analyse d'individus (biote moule) moribonds et morts devraient permettre d'identifier la présence d'éventuelles bactéries de la classe de *Flavobacteria* entre autres qui pourraient accompagner les souches pathogènes incriminées et pour lesquelles de nouveaux outils de diagnostic biomoléculaires sont en cours de validation au Laboratoire Ifremer Santé Environnement & Microbiologie (LSEM) de Brest.

Dans tous les cas de figures, un lien entre l'évolution des équilibres microbiens et les mortalités printanières de moules semble se dégager dans les pertuis charentais.

Si des liens de causalité apparaissaient, outre le fait qu'un organisme ou un groupe d'organismes puisse être identifié comme responsable des mortalités, il conviendrait de réaliser des études spécifiques en éco-pathologie et en épidémiologie pour préciser le poids des facteurs



climatiques comme facteurs de risque dans l'émergence de ce phénomène.

## Discussion

Les hypothèses relatives aux facteurs environnementaux, biotiques ou abiotiques qui favoriseraient l'apparition ou la transmission d'un processus infectieux et des mortalités associées, paraissent essentielles dans la compréhension du phénomène étudié.

L'hypothèse « **effet site** » par exemple, interroge et doit être encore documentée. Ainsi, il est établi que le naissain qui a pu provenir de secteurs à mortalités depuis 2014 (Pertuis Breton, Pertuis d'Antioche, Baie de Bourgneuf) a servi par transfert à garnir d'autres secteurs mytilicoles où les mortalités ne se sont pas exprimées ensuite (ex. Baie St Brieux, Baie du Mont St Michel ; Soletchnik et Robert, 2016 ; Allain et Bernard, 2016 – Contrat d'étude CRC Bretagne nord : les mortalités de moules en 2014 et en 2016 vues par les professionnels). Ceci, alors qu'une partie de la même cohorte restée sur son bassin de captage d'origine (17, 85) pouvait neuf mois plus tard présenter plus de 80% de mortalité.

Ce même constat, lié à l'effet site et son environnement, est observé au travers des suivis annuels du lot **Mytilobs** qui clairement chaque année depuis 2014 montre des niveaux de mortalité très variables d'un site à l'autre (ex. Vivier –Ille-et-Vilaine <10% vs Aiguillon –Sud Vendée- >80%), que le lot initial provienne de cordes des Pertuis (Yves, 2014 et 2015) ou de la baie de Vilaine (Pont Mahé, 2016).

Comment interpréter ces différences d'expression d'un site à l'autre à partir d'un lot unique transféré dans les mêmes conditions et à la même période ? Cet aspect nécessitera des plans d'expérience spécifiques à mettre en œuvre comme cela est initié dans l'étude du potentiel adaptatif des moules face aux épisodes de mortalité (cf. Chap. 4), de même que des essais en mésocosme à venir.

## 3.2. Hypothèses concernant l'animal (hôte) et les agents pathogènes

### 3.2.1. Une virulence particulière des vibrions isolés lors des mortalités de moules ? Bilan sur les essais de caractérisation des souches bactériennes : virulence et mode de contamination

#### **Bilan sur les essais de caractérisation des souches bactériennes : virulence et mode de contamination**

Les analyses en pathologie réalisées sur les lots de moules échantillonnés lors des épisodes de mortalités 2014, 2015, 2016 n'ont **pas permis de mettre en évidence de présence d'agents infectieux exotiques ni de formes émergentes d'agents pathogènes** déjà connus en France.

Cependant, la présence de bactéries appartenant au groupe bactérien *Splendidus*, et en particulier à l'espèce *V. splendidus* a été détectée dans l'ensemble des échantillons analysés. Des premiers résultats obtenus pour certains de ces isolats montrent qu'ils sont capables d'induire des mortalités de moules en conditions expérimentales.

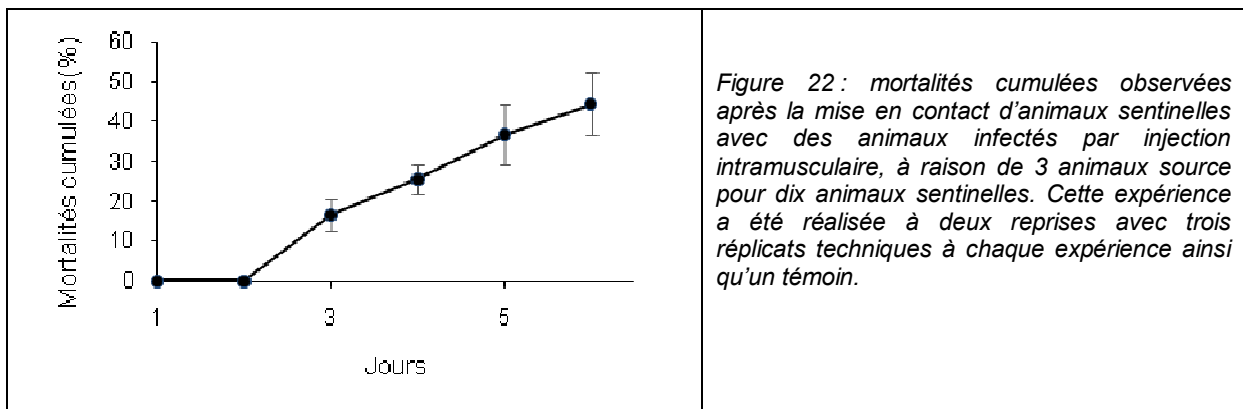
Des souches bactériennes majoritaires ont été isolées de différents lots à mortalité (LNR maladies des mollusques marins). Elles ont été caractérisées par le biais de qPCR et de séquençages ciblés (gènes 16s, gyrB et hsp60) comme décrit par Ben Cheikh *et al.*, (2016). Sur l'ensemble des souches isolées dans les pertuis en 2014, plus de 85% des isolats cultivables appartiennent au groupe polyphylétique *Splendidus*. De façon notable, **73% de ces souches majoritaire ont pu être affiliées à la seule espèce *V. splendidus*** (158 isolats).

En parallèle, des essais d'injection intramusculaire (suspensions ajustées à  $DO_{600} = 0.3$ ) ont permis d'évaluer la virulence de différents isolats. Des isolats virulents ont ainsi pu être identifiés (31 isolats induisant > 20% de mortalités sur les 88 testés). Ils appartiennent à l'espèce *V. splendidus* pour 71% d'entre eux et aux espèces *V. atlanticus* et *V. kanaloae*.

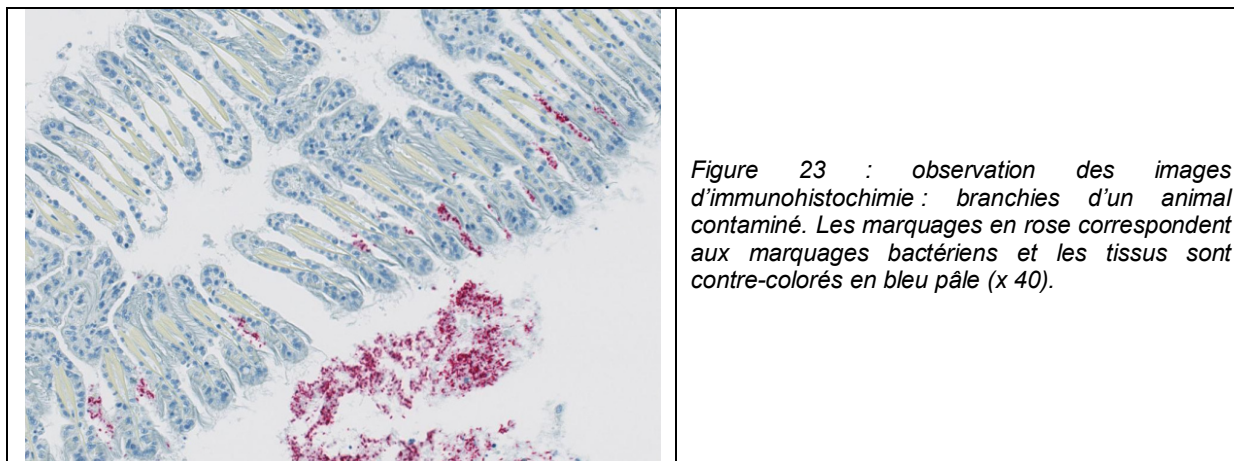
**Ainsi, il existe des souches virulentes de *V. splendidus* capables d'induire en injection intramusculaire des mortalités notables chez les moules.** Afin de comparer les maladies induites par ces souches bactériennes avec celle(s) observées depuis 2014 en France, des essais de cohabitation ont été développés permettant des études histopathologiques comparables à celles menées dans le cadre de la surveillance (Mytilobs-2, Repamo-2).

Avec ce protocole et une première souche isolée en 2010 (10/068), il a été possible d'induire des mortalités, par cohabitation, atteignant 50% en six jours (

Figure. 22)



La localisation bactérienne ainsi que les lésions observées sur des animaux prélevés au cours de l'infection ont été étudiées. Des marquages sont observés dès le premier jour au niveau des branchies par immunohistochimie avec un anticorps ciblant la bactérie initialement mise en contact. Des marquages variables sont notés selon les individus, et certaines bactéries apparaissent sous forme d'agrégats (Figure 23).



De façon conjointe, il a pu être noté différentes lésions par des colorations à l'hématoxyline-éosine : des foyers bactériens en particulier au niveau des branchies (20 individus/40), des granulomes inflammatoires dans le manteau (17 individus /40), des infiltrations hémocytaires (26 individus/40) et une nécrose des épithéliums (branchies principalement, manteau et glande digestive).

Parallèlement à ces données expérimentales, des résultats d'histopathologie obtenus sur des lots suivis en 2015 par le réseau Mytilobs sur différents sites ont permis d'observer des granulomes chez des animaux infectés (> 20%) et très peu sur les moules hors mortalité (Robert et Soletchnik, 2016 ; Travers *et al.*, 2016).

L'hypothèse peut être émise que la **souche virulente** utilisée ici (**10/068, isolée en 2010**) induit des mortalités et surtout une **maladie différente** de celles rapportées en France depuis 2014.

De nouveaux essais avec d'autres souches bactériennes isolées à partir de 2014 seront réalisés pour voir si certaines souches peuvent induire une maladie comparable à celle observée sur le terrain et ainsi être suspectées. A ce stade de l'étude, aucun isolat collecté lors d'épisodes de mortalité en 2016 n'a été caractérisé par cette approche expérimentale et on ne peut donc encore évaluer leur virulence.

Au delà de la caractérisation de la virulence de souches isolées lors des épisodes récents de mortalités de moules, il s'agit aussi de disposer de bactéries virulentes capables de reproduire la maladie observée depuis 2014. Ce modèle obtenu, il devrait permettre de tester des hypothèses relatives à l'infection et de déterminer les conditions permettant de transmettre la maladie (ex : température, alimentation, stade sexuel, âge,...).

### 3.2.2. Une part génétique ? Les animaux affectés en 2015 et 2016 : une espèce, une population particulière touchée ?

Deux espèces de moules appartenant au genre *Mytilus*, ***M. edulis*** et ***M. galloprovincialis*** sont présentes sur le littoral français, et réparties selon une structure originale en mosaïque, avec des zones abritant l'une ou l'autre des espèces, mais également des zones d'hybridation entre ces deux espèces (Figure 24). De plus, cette structure délimite des lignées différenciées et notamment la lignée *M. edulis* du Golfe de Gascogne qui est celle principalement élevée dans les pertuis charentais et en Vendée et qui alimente aussi en naissain la Bretagne Nord (transferts). Cette lignée diverge des autres populations *M. edulis*, dont la répartition débute au nord du

Cotentin. Certains mytiliculteurs s'approvisionnent en naissain de ces autres régions. Il paraît donc indispensable de **préciser la ou les lignées génétiques qui ont été impactés en 2015 et 2016.**

Par ailleurs, parmi les résultats obtenus en 2015, il avait été mis en évidence chez quelques individus une ascendance génétique de type *M. trossulus* (**hybride *edulis/trossulus* ?**), autre espèce de moule non indigène des côtes françaises. Hors, en 2016 des publications scientifiques ont rapporté d'une part, l'existence d'anomalies cytogénétiques hémocytaires sur les moules *edulis* suivies dans de le cadre de l'action MORBLEU (Benabdelmouna et Ledu, 2016, voir § 3.2.3) avec des variations de niveaux de ploïdie rappelant celles décrites au niveau de néoplasies observées chez *M. trossulus* (Vassilenko and Baldwin, 2014); et d'autre part, l'existence de néoplasies contagieuses chez *M. trossulus* (Metzger *et al.*, 2016). Ces données interrogent sur de possibles liens et ont justifié une approche spécifique.

Dans ce contexte, l'objectif était **de définir l'espèce, voir la lignée, de *Mytilus*** qui a été impactée ces deux dernières années et par ailleurs de rechercher s'il existait un chimérisme génétique *edulis/trossulus* (collaboration avec N. Bierne, Université de Montpellier).

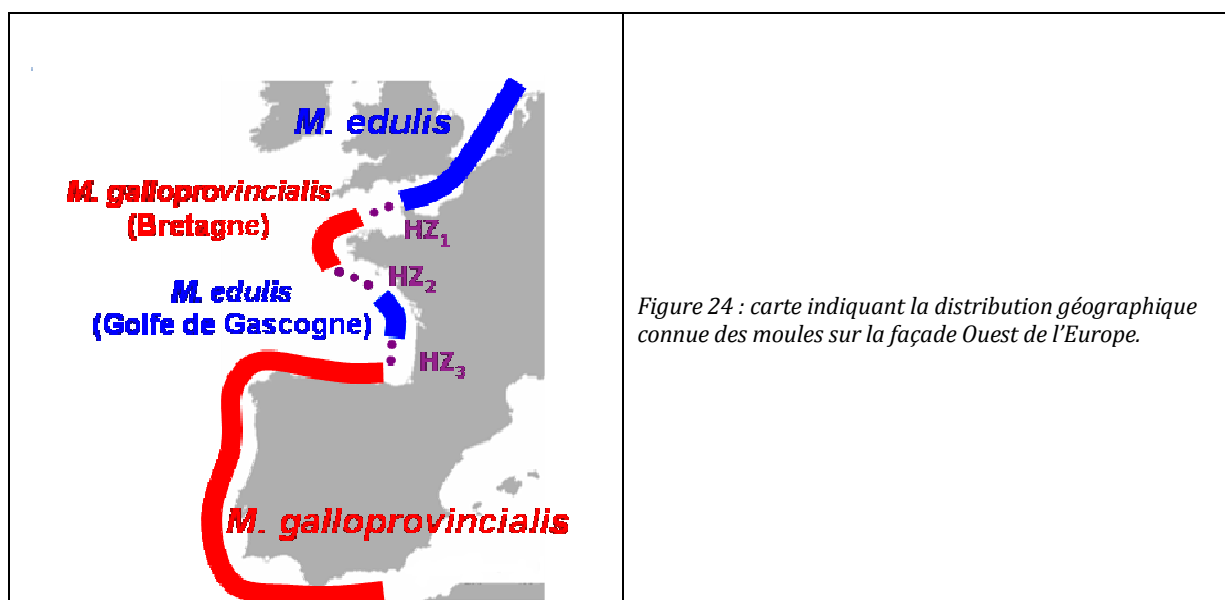


Figure 24 : carte indiquant la distribution géographique connue des moules sur la façade Ouest de l'Europe.

Dans le rapport scientifique de l'action MORBLEU-2015, les résultats obtenus avec 43 marqueurs génétiques analysés sur 843 moules échantillonnées en 2015 (**échantillon MORBLEU-2015**, 336 survivantes et 478 moribondes) avaient été rapportés. Ces analyses avaient permis de montrer que **la majorité des moules étaient des *Mytilus edulis* du Golfe de Gascogne (population)** avec la **présence de quelques hybrides *edulis/galloprovincialis*** de génération avancée (backcross de 3-5<sup>ème</sup> génération) à proximité de la zone de contact entre les deux espèces en Bretagne sud, comme attendu (Bierne *et al.* 2003 ; Fraïsse *et al.* 2016).

La présence très rare et inattendue d'hybrides *edulis/trossulus* dans d'autres échantillons analysés par l'équipe de N. Bierne (ISEM, CNRS-UM), à Pornichet et Arcachon notamment. Les hybrides ne peuvent normalement être produits que par l'hybridation entre une *M. trossulus* et une *M. edulis*. Or, les populations les plus proches de *M. trossulus* sont au nord des îles Britanniques en Ecosse et Irlande, en Mer Baltique et dans certains fjords de Norvège, de Mer de Barents et de Mer Blanche. L'hypothèse d'une introduction de *M. trossulus* par des activités humaines dans des sites qui ne sont pas habituellement échantillonnées avait été proposée.

La publication en 2016 de l'existence de néoplasies contagieuses chez trois bivalves dont les moules de Colombie Britannique, *M. trossulus* (Metzger *et al.* 2016), a amené à réévaluer les résultats. En effet, dans ce contexte, il apparaissait d'intérêt d'explorer la présence d'un processus néoplasique associé à la présence de cellules originaires de l'espèce *M. trossulus* « installées » chez des moules de l'espèce *M. edulis*.

Pour explorer cette hypothèse, l'ADN mitochondrial de ces échantillons a été séquencé et les niveaux de fluorescences des deux allèles des locus hétérozygotes finement analysés (Riquet *et al.* 2017). Les résultats se sont révélés être en accord avec cette hypothèse. Des cellules originaires de l'espèce *M. trossulus*, sous forme de cellules néoplasiques, pourraient être présentes chez les moules bleues. .

Cependant, aucune signature de l'espèce *M. trossulus* **n'avait été détectée par cette approche dans les échantillons MORBLEU-2015**. La même démarche a donc été utilisée pour essayer de **détecter la possible présence d'un chimérisme au sein de la même espèce, *M. edulis***. **Les résultats ont permis de détecter des chimères génétiques *edulis/edulis***, mais seulement chez sept moules sur les 840 analysées. Il s'agissait de cinq moribondes et deux vivantes.

En 2016, à l'aide de 96 marqueurs génétiques, 321 moules échantillonnées en 2016 (**échantillon MORBLEU-2016**) **ont été analysées**. En plus de vérifier la composition génétique de moules provenant des sites ateliers de MORBLEU, quelques échantillons sauvages d'estuaires et de ports ont aussi été analysés. 13 moules étaient des hybrides *edulis/galloprovincialis* de génération avancée (backcross de 3-5<sup>ème</sup> génération) et toutes les autres (308) étaient des ***M. edulis* du Golfe de Gascogne**. **Aucun signe de la présence de gène de *M. trossulus* n'a été identifié sur cet échantillon de 321 moules**. Des travaux sont en cours pour analyser la possible présence de moules présentant un chimérisme génétique intraspécifique mais les résultats préliminaires ne semblent pas signaler de telles chimères. D'autres analyses par ailleurs, ont cependant permis de retrouver quelques chimères *edulis/trossulus* à Arcachon, en Bretagne et dans le Pas-de-Calais, ainsi qu'une chimère *galloprovincialis/trossulus* en Croatie.

L'analyse génétique se révèle un outil intéressant et complémentaire aux analyses d'histologie et de cytologie pour l'étude des néoplasies. C'est le seul moyen de démontrer l'existence d'un processus de transmission de celles-ci (METZGER *et al.* 2016). Jusqu'à maintenant, cependant, les analyses génétiques n'étaient pas dédiées à la recherche de néoplasies et seul l'ADN de branchies était analysé. Pour les prochaines analyses il est suggéré d'analyser systématiquement l'ADN d'hémolymphe et d'autres tissus afin d'améliorer la capacité à détecter un éventuel chimérisme génétique lié à un processus néoplasique.

**Cette approche sera mise en œuvre dans le cours de l'action MORBLEU-2017.**

**En résumé :** les analyses génétiques ont permis de définir de façon précise la composition génétique des stocks d'élevage dans les régions impactées par les épisodes de mortalité.

**La composition génétique de moules provenant des sites ateliers de MORBLEU/Mytilobis en 2015 et 2016 montre que ces animaux étaient des *M. edulis* du Golfe de Gascogne**, avec la détection de rares hybrides *edulis/galloprovincialis* de génération avancée.

Par ailleurs, sur ces échantillons 2015 et 2016, la recherche de gènes spécifique à l'espèce *M.trossulus* a été menée pour rechercher un chimérisme interspécifique pouvant être la trace d'un processus néoplasique : **aucun signe de détection de gène de *M. trossulus* n'a été mis en évidence sur les animaux testés**. En revanche il a été **détecté la présence d'un possible chimérisme intraspécifique au sein de l'espèce *M. edulis*** qui pourrait traduire un phénomène de transmission de cellules néoplasiques. Ces résultats restent à confirmer.

### 3.2.3. Des caractéristiques cytogénétiques variables dans les cheptels mytilicoles en relation avec la mortalité 2015 et 2016?

#### **Caractéristiques cytogénétiques des cheptels mytilicoles en relation avec les épisodes de mortalité de 2016**

Dans ce cadre des mortalités anormales touchant les stocks mytilicoles en France, l'hypothèse a été proposée que ces mortalités pourraient être liées à une fragilisation des moules en relation avec une possible modification de caractéristiques cytogénétiques. En effet, dans le cadre plus large des phénomènes de mortalité massive récurrentes affectant les cheptels conchylicoles depuis 2008, des études précédentes d'analyse de ploïdie par cytométrie en flux d'huîtres creuses ont montré que la « qualité cytogénétique », estimée via l'occurrence d'anomalies génomiques (cassures de l'ADN et variation de la taille du génome), est corrélée à l'état de santé d'un animal et sa réponse vis-à-vis des divers stress biotiques et abiotiques. Ainsi, la « qualité cytogénétique » des géniteurs, celle de leurs descendants directs ainsi que les performances de survie de ces derniers apparaissent comme liées.

En effet, la « qualité cytogénétique » des adultes géniteurs est primordiale non seulement pour leurs performances biologiques propres, mais cette « qualité cytogénétique » est aussi directement transmise à leurs descendants conditionnant ainsi leurs performances biologiques (Benabdelmouna & Hemissi 2011 ; Benabdelmouna *et al.* 2011). Tout comme les huîtres, les moules sont aussi des mollusques bivalves sessiles et filtreurs en interaction directe avec un environnement changeant aussi bien du point de vue sanitaire, avec la présence de nombreux agents pathogènes, que du point de vue physico-chimique, notamment en relation avec la présence de contaminants d'origine anthropique. Dans ce cadre, plusieurs travaux ont montré que l'exposition de ces mollusques bivalves aux diverses contaminations environnementales provoque une réduction de leur « qualité cytogénétique » se traduisant par divers dégâts à l'ADN et incluant des anomalies du cycle cellulaire et des modifications de la taille du génome avec diverses aneuploïdies et polyploïdies (Bihari *et al.* 2003; Barranger *et al.* 2014).

Afin d'explorer cette hypothèse de baisse de la « qualité cytogénétique » des stocks mytilicoles touchés par les épisodes de mortalité en France, la cytométrie en flux a été utilisée afin d'étudier ce paramètre chez des moules adultes d'élevage ou issues de stocks sauvages. En effet, les anomalies génomiques des moules ont été souvent étudiées par cytométrie en flux (Vassilenko & Baldwin, 2014). Ainsi, dans le cadre actuel des mortalités qui touchent les cheptels mytilicoles depuis 2014 en France, la détermination et l'actualisation de **l'occurrence des anomalies génomiques dans les différents stocks de géniteurs ainsi que la spatialisation de cette « qualité cytogénétique » paraissent d'intérêt pour éclairer les facteurs qui peuvent favoriser ces mortalités.**

Pour ce faire, en se basant sur les événements de mortalité de 2014 et 2015 permettant d'identifier au niveau des pertuis charentais et de la baie de Bourgneuf des sites subissant de façon récurrente les plus hauts taux de mortalité, des échantillons ont été collectés avant et après les épisodes de mortalité de l'année 2015 et 2016 dans plusieurs sites mytilicoles répartis dans ces deux zones (Figure 25).

- En 2015, sept sites ont été prélevés, trois sites en Vendée, La Plaine, le Fiol et Maison Blanche, et quatre sites dans les pertuis charentais, Filière, Aiguillon, le Lay et Boyard ;
- En 2016, cinq sites prélevés, deux sites en Vendée, La Plaine et Maison Blanche, et deux sites dans le pertuis Breton, Filière et Ecluseaux (Figure 25). Par contraste, un site se trouvant en dehors de ces deux zones de mortalité mytilicole a été fait l'objet de collecte d'échantillons : le

site de la Vilaine en Bretagne sud où aucune mortalité significative n'a été déclarée jusqu'à présent.

Au total, ces neuf sites ont été échantillonnés respectivement soit en 2015, soit en 2016, en début d'année (**avant mortalité**) et durant l'été/automne (**après mortalité**). Après leur collecte, les différents lots de moules ont été stockés dans les structures sécurisées de l'écloserie expérimentale du LGPMM de la Tremblade à raison d'un lot par bac alimenté en eau de mer traitée aux UV. Ensuite, les analyses de la qualité cytogénétique de chaque lot ont été entreprises par cytométrie en flux utilisant le marquage à l'iodure de propidium en prélevant individuellement et de façon non destructive un échantillon d'hémolymphe sur chaque moule analysée. Le détail des protocoles et des résultats de l'année 2015 sont présentés dans une publication liée à ces travaux (Benabdelmouna et Ledu, 2016a).

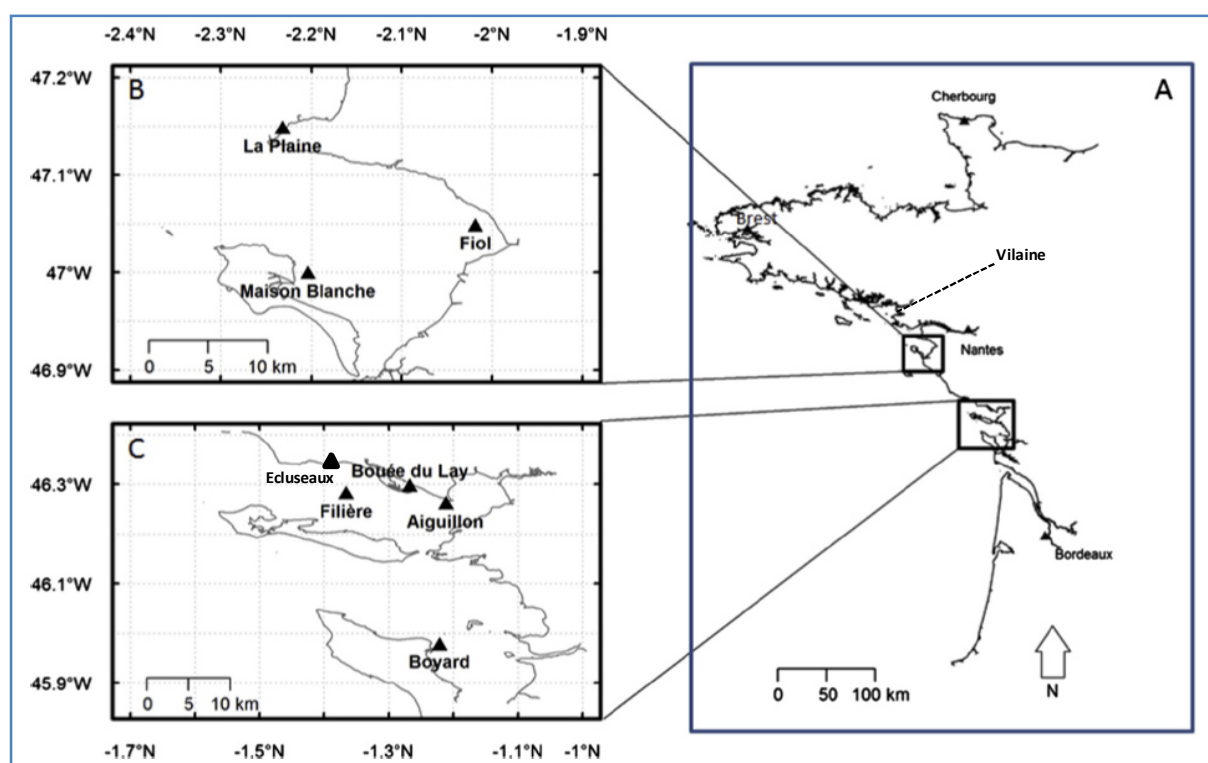


Figure 25 : carte présentant les sites échantillonnés (▲) en 2015 ou 2016 le long de la façade Atlantique (cadran A) au niveau de la baie de Bourgneuf (cadran B) et des pertuis charentais (cadran C).

## Résultats

### Analyses cytométriques

En se basant sur le pourcentage de noyaux non diploïdes dans l'hémolymphe, des valeurs seuils fixant la « qualité cytogénétique » à l'échelle d'une moule individuelle ou à l'échelle d'une population ont pu être définies. Ainsi, une moule est considérée comme « normale » quand elle présente moins de 10% de noyaux non diploïdes dans son hémolymphe et « anormale » au-delà de cette valeur. A l'échelle d'une population, le pourcentage moyen des noyaux non diploïdes de tous les individus de ce lot indique la « qualité cytogénétique » du lot.

En 2015 comme en 2016, ces analyses ont permis **d'identifier deux groupes de moules** en ce qui concerne leur « qualité cytogénétique » : des **moules « normales »** présentant un profil cytométrique totalement ou exclusivement constitué de noyaux diploïdes et des **moules « anormales »** dont l'hémolymphe contient des pourcentages variables de cellules non diploïdes qui sont aneuploïdes, dans une gamme allant de l'hypodiploïdie à l'hypotétraploïdie.

Durant l'année 2015, plus de 1300 moules ont été analysées par cytométrie en flux et cela avant et après les épisodes de mortalité.

**Avant la mortalité**, les données cytométriques montrent des résultats contrastés pour les différents sites analysés (Figure 26). Il apparaît clairement que tous les sites de la baie de Bourgneuf (Fiol, maison blanche et Plaine) ainsi que le site « Filière » du pertuis Breton présentent la plus basse « qualité cytogénétique » avec une moyenne de noyaux non diploïdes élevée allant de 18% à 23%. Le site « Aiguillon » du pertuis Breton présente quant à lui une « qualité cytogénétique » intermédiaire (12%) alors que les autres sites analysés du pertuis Breton « Lay » et « Boyard » présentent la plus haute « qualité cytogénétique » avec au plus 6% de noyaux non diploïdes.

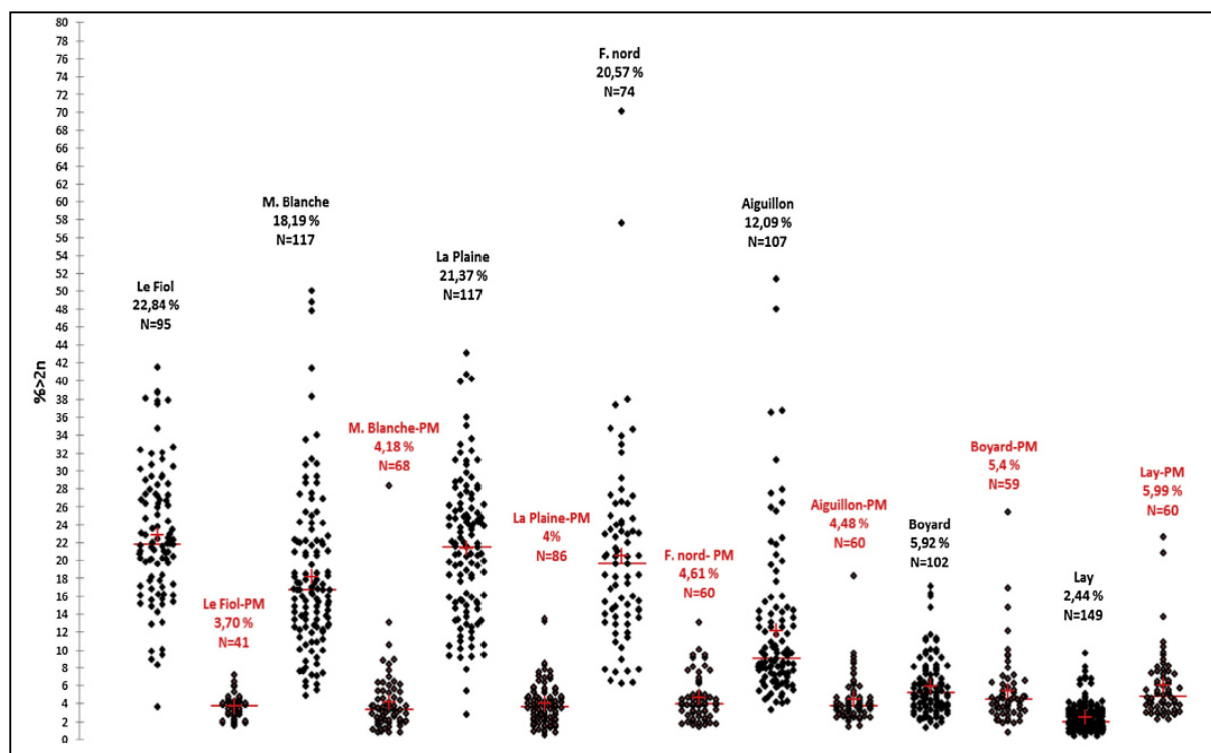
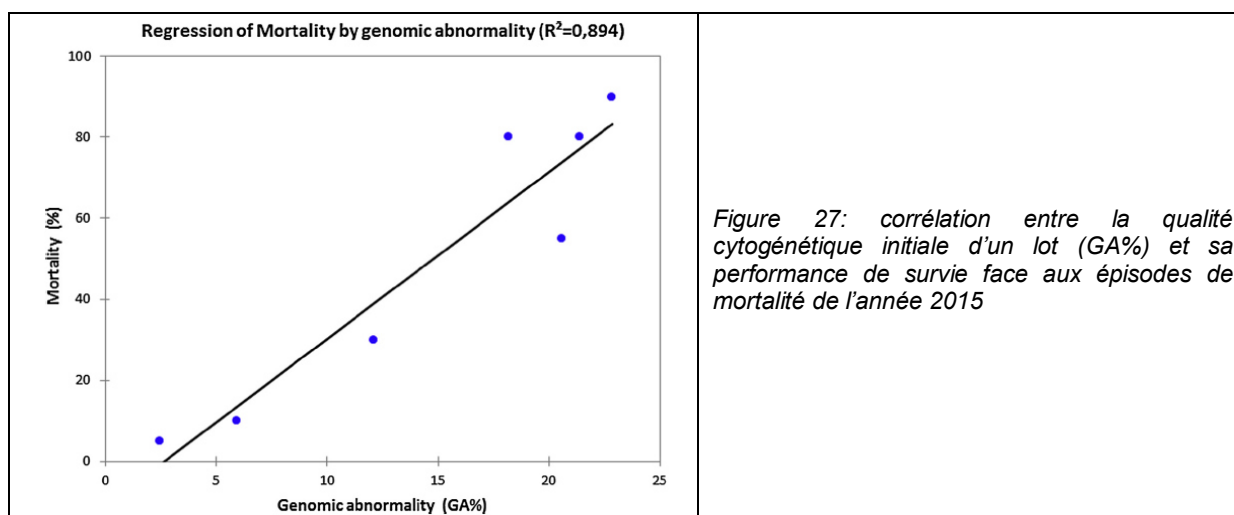


Figure 26 : année 2015. Distribution du pourcentage des noyaux non diploïdes (%>2n) pour les échantillons d'hémolymphe des moules analysés appartenant aux sept sites échantillonnés en 2015. La valeur sous le nom du lot correspond au pourcentage moyen de noyaux non diploïdes de ce lot. Les analyses **avant la mortalité** sont indiquées **en noir** et les analyses **après la mortalité** **en rouge**.

Après ces analyses pré-mortalité, les divers lots analysés ont subi des épisodes de mortalité 2015 et ont montré des niveaux tout aussi contrastés en ce qui concerne leur performance de survie. Ainsi, les lots qui présentaient la meilleure « qualité cytogénétique » initiale ont aussi présenté les meilleurs taux de survie alors que les lots qui avaient une basse « qualité cytogénétique » initiale ont présenté une survie réduite. Il apparaît donc que, à l'échelle d'une moule individuelle ainsi qu'à l'échelle d'un stock, le pourcentage final de mortalité est significativement ( $r = 0.945$ ,  $p = 0.001$ ) corrélé à la « qualité cytogénétique » initiale (Figure 27).





**De manière comparable, les analyses réalisées en 2016 (autres lots et deux sites nouveaux en plus des trois communs à 2015) permettent de faire des observations similaires par rapport à 2015 (voir Figure 28).**

Ainsi, durant **l'année 2016**, plus de 800 moules ont été analysées par cytométrie en flux et cela avant et après les épisodes de mortalité. Comme en 2015, ces analyses ont permis d'identifier deux groupes de moules en ce qui concerne leur « qualité cytogénétique ».

**Avant la mortalité**, les données cytométriques montrent des résultats contrastés pour les différents sites analysés avec des différences significatives entre les sites (Tableau 3). Seul le site de la Vilaine en Bretagne sud apparaît comme ayant une haute « qualité cytogénétique » avec une moyenne de noyaux non diploïdes de moins de 5%. Les sites vendéens « la Plaine » et « Maison Blanche » présentent des moules ayant une « qualité cytogénétique » intermédiaire, avec une moyenne de noyaux non diploïdes de 8%. Le site « les écluseaux » du pertuis Breton présente une un nombre moyen de noyaux non diploïdes de 12% alors que le site « Filière » au niveau du pertuis Breton présente la plus basse « qualité cytogénétique » avec une moyenne de noyaux non diploïdes de 17%.

*Tableau 3 : test non paramétrique de comparaison de k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis. Les lettres en majuscules indiquent les groupes significativement différents ( $p$ -value < 0,0001 donc < à  $\alpha=0,05$ ).*

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :						
Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
%>2n   Vilaine 2016	157	28056,000	178,701	A		
%>2n   Maison Blanche 2016	66	16240,000	246,061		B	
%>2n   Plaine 2016	112	28937,000	258,366		B	
%>2n   Ecluseaux 2016	63	19556,000	310,413		B	C
%>2n   Filières 2016	140	52202,000	372,871			C

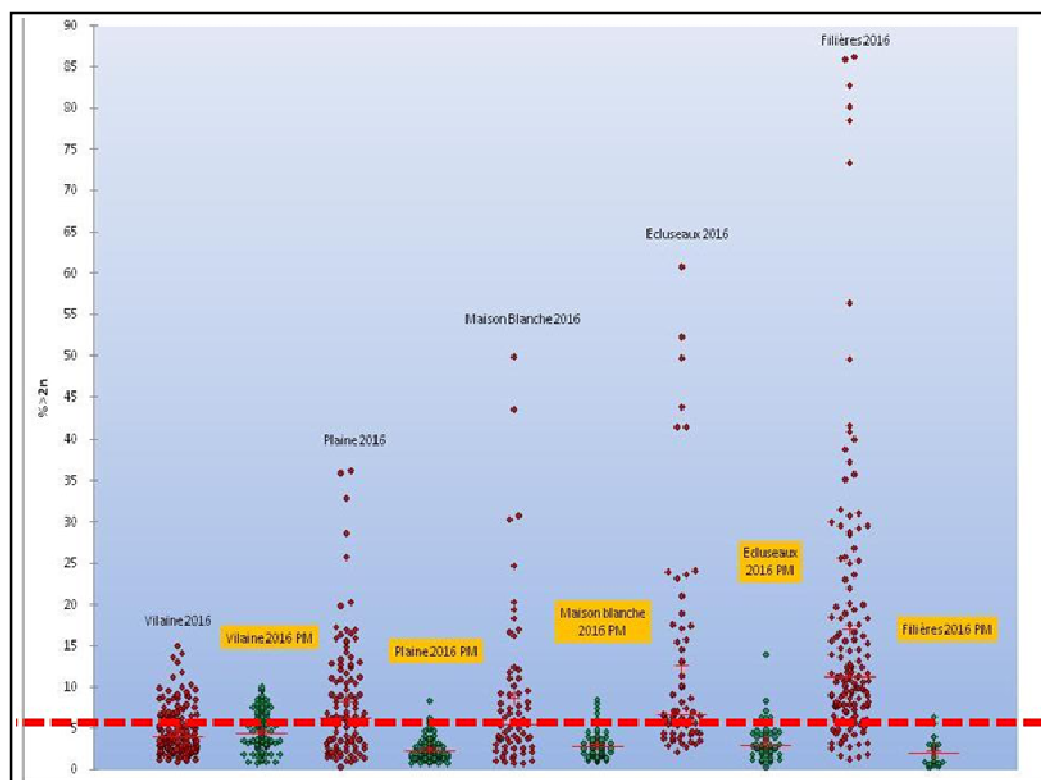


Figure 28 : **année 2016**. Distribution du pourcentage des noyaux non diploïdes ( $\%>2n$ ) pour les échantillons d'hémolymphe des moules analysés appartenant aux cinq sites échantillonnés en 2016. Analyse avant (rouge) et après (vert) les épisodes de mortalité 2016.

Après ces analyses 2016 sur les lots de moules avant mortalité, les divers lots analysés ont subi des épisodes de mortalité 2016 et ont montré des niveaux tout aussi contrastés en ce qui concerne leur performance de survie. Ainsi, le lot de la Vilaine qui présentait la meilleure « qualité cytogénétique » initiale a aussi présenté le meilleur taux de survie. Par contre, le lot issu des filières et qui présentait la plus basse « qualité cytogénétique » initiale a aussi présenté la mortalité finale la plus élevée ceci alors que les lots ayant eu une « qualité cytogénétique » intermédiaire (Maison blanche, la plaine et écluseaux) présentaient aussi un taux de mortalité intermédiaire. Il apparaît donc que, comme en 2015, le pourcentage final de mortalité est significativement corrélé à la qualité cytogénétique initiale et cela à l'échelle d'une moule individuelle ainsi qu'à l'échelle d'un stock.

Après la fin des épisodes de mortalité subis soit en 2015 soit en 2016, des **analyses de cytométrie en flux post-mortalité** ont été réalisées sur les **moules survivantes issues des mêmes lots** décrits plus haut. A la différence des analyses pré-mortalité, les analyses post-mortalité ne mettent en évidence **aucune différence significative entre les différents sites et tous les lots analysés présentent une haute « qualité cytogénétique »**. Par ailleurs, pour chaque lot, la comparaison entre les analyses pré/post-mortalité montre que la mortalité semble toucher les individus qui présentent une basse « qualité cytogénétique » initiale, c'est à dire les moules ayant plus de 10% de noyaux non diploïdes dans leur hémolymphe, puisque ces individus sont retrouvés en moins grand nombre après les épisodes mortalité (2015, Figure 26 et 2016, Figure 28). Des suivis individuels restent à réaliser pour confirmer ce point.

### Analyses moléculaires et histologiques

**En 2016**, une première caractérisation histologique et moléculaire a aussi été initiée, **avant la mortalité**, sur les deux types de moules identifiés par les analyses cytométriques. Des moules présentant des profils cytométriques contrastés, et donc une « qualité cytogénétique »

contrastée, ont été triées pour des analyses moléculaires et histologiques. Ainsi, pour chaque moule triée, l'ADN a été extrait à partir de deux tissus différents (l'hémolymphe et les branchies) et a été ensuite utilisé pour un génotypage moléculaire en utilisant huit couples d'amorces microsatellites. Cela dans le but de vérifier s'il y avait ou non une différence de génotype entre ces deux tissus.

Parallèlement, après les extractions d'ADN, les mêmes moules ont été fixées et préparées pour des analyses histologiques afin d'examiner leurs structure tissulaire et les types cellulaires présents.

Les **résultats obtenus sur les moules avant mortalité** montrent des profils très différents pour les deux types de moules triées. Ainsi, **les moules de haute « qualité cytogénétique » ne présentent aucune différence de génotype entre hémolymphe et branchies**, avec pour chaque marqueur microsatellite utilisé, les mêmes allèles (Tableau 4). De même, les analyses histologiques montrent un aspect normal pour ces moules avec de tissus qui ne présentent pas d'anomalie (

Figure 29).

Tableau 4 : profils microsatellites obtenus sur des moules de haute « qualité cytogénétique » (VL-1/5/9/17/24/27/34/39) en utilisant 8 microsatellites (Me15/16 et Med---) amplifiés à partir de l'ADN individuel extrait à partir de l'hémolymphe (H) et des branchies (B). Pour chaque moule, il n'y a aucune différence entre les deux tissus et tous les marqueurs sont à l'état diploïde (deux loci).

code	Me15-Me16	Med740	Med737	Med379	Med362	Med733	Med367	Med722
VL-01B	120176	190190	152152	160170	102102	168172	212212	172172
VL-H-01	120176	190190	152152	160170	102102	168172	212212	172172
VL-05B	176176	206206	154154	174194	96096	172172	214258	174196
VL-H-05	176176	206206	154154	174194	96096	172172	214258	174196
VL-09B	120176	184184	154154	160176	104106	154154	198198	176196
VL-H-09	120176	184184	154154	160176	104106	154154	198198	176196
VL-17B	176176	202202	150154	156156	102102	168168	216250	188220
VL-H-17	176176	202202	150154	156156	102102	168168	216250	188220
VL-24B	176176	228228	154160	160160	102122	176176	240240	172184
VL-H-24	176176	228228	156160	160160	102122	176176	240240	170184
VL-27B	176176	184196	154154	156156	104104	158158	204204	184184
VL-H-27	176176	184196	154196	156156	104104	158158	204204	184184
VL-34B	176176	234234	164164	146150	102102	180180	216230	172180
VL-H-34	176176	234234	164196	146150	102102	180180	216230	172180
VL-39B	176176	188192	154156	152152	102102	168168	216222	174174
VL-H-39	176176	188192	154156	152152	102102	168168	216222	174174

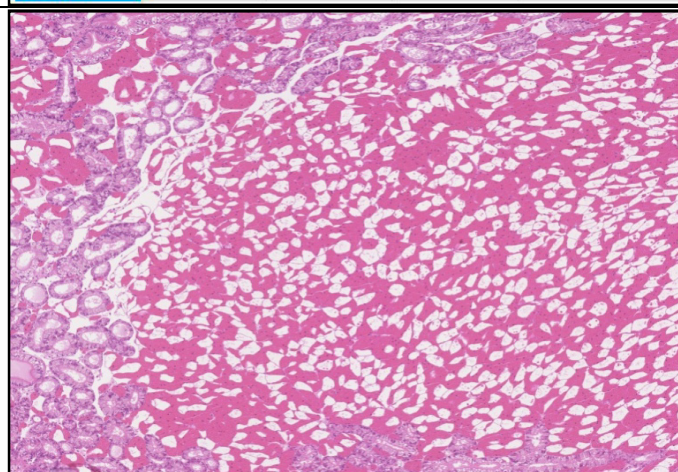


Figure 29 : profil histologique d'aspect normal obtenu pour les moules ayant une haute qualité cytogénétique

De façon intéressante, les moules de basse « qualité cytogénétique » montrent des profils moléculaires et histologiques très différents. Ainsi, les moules de basse « qualité cytogénétique » présentent toutes des différences de génotype entre hémolymphe et branchies, avec pour plusieurs marqueurs microsatellites, des allèles différents à la fois en taille mais aussi parfois en nombre entre ces deux tissus (Tableau 5). Cette approche comparée entre tissus sera poursuivie en 2017, avec plusieurs types de marqueurs, pour permettre une interprétation des données observées.

*Tableau 5 : profils microsatellites obtenus sur des moules de basse « qualité cytogénétique » (FL-L- 7/8/9/11 et FLM-8/10/11) en utilisant 8 microsatellites (Me15/16 et Med--) amplifiés à partir de l'ADN individuel extrait à partir de l'hémolymphe (H) et des branchies (B). Pour chaque moule, des différences variables de génotype existent entre les deux tissus avec pour certains marqueurs microsatellites des différences d'allèles en fonction du tissu et plusieurs marqueurs sont à l'état non diploïde, avec des formes triploïdes et tétraploïdes.*

code	Me15-Me16	Med740	Med737	Med379	Med362	Med733	Med367	Med722
FL-L-07B	176176	180218	146150	160170	104104	170174	218218	174184
FL-L-07H	176176	208208	150156	156/164/166	102102	168172	206270	184192
FL-L-08B	176176	198216	144154	158158	100100	174174	200200	178178
FL-L-08H	176176	198216	144154	158158	104104	168174	200206	178178
FL-L-09B	176176	180180	158164	154154	98106	142162	210236	182/184/218
FL-L-09H	176176	180180	158164	154154	98106	164164	210236	182/184/218
FL-L-11B	176176	192226	158176	150/170/178	100102	166170	252252	178252
FL-L-11H	176176	192226	158176	150/170	100102	166170	252252	178252
FL-M-08H	176176	226240	154184	154/185/196/204	102102	162172	206206	176198
FL-M-8B	176176	226240	154184	154/196/204	102102	162172	206206	176198
FL-M-10B	176176	208222	150/214	168176	100106	166166	264/268	176180
FL-M-10H	176176	208222	150/162	168176	100106	166166	206/206	176180
FL-M-11H	176176	248248	152156	140140	98098	144/170	216228	180182
FL-M-11B	176176	248248	152156	140140	98098	170/180	216228	180182

De même, les analyses histologiques montrent un aspect anormal pour ces moules de basse « qualité cytogénétique » analysées avant mortalité (Figure 30) avec de tissus qui présentent des granulocytomes parfois étendus et d'importantes infiltrations hémocytaires dont la nature exacte reste à identifier (hyperplasie, néoplasie...).

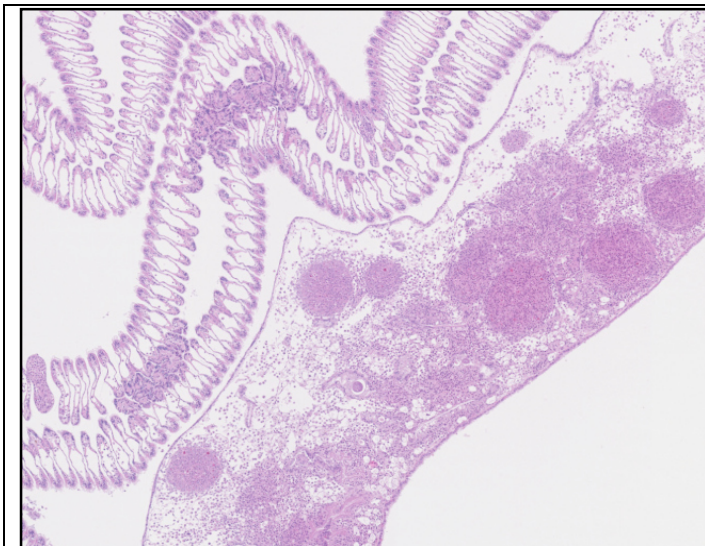


Figure 30 : profil histologique d'aspect anormal obtenu pour les moules ayant une basse qualité cytogénétique montrant des granulocytomes et des infiltrations hémocytaires étendus.

## Conclusions et perspectives

En 2015 comme en 2016, les analyses de cytométrie en flux réalisées sur l'hémolymphe révèlent une grande variabilité des lots de moules sur le plan du critère « qualité cytogénétique ». De

plus, cette **variabilité de la « qualité cytogénétique » initiale est aussi significativement corrélée avec les performances de survie des moules**. Il est important de rappeler que ce même phénomène de corrélation étroite entre qualité cytogénétique initiale et mortalité a déjà été mis à jour sur les naissains sauvages (de captage naturel) de *C. gigas* lors de diverses études dans le cadre des mortalités d'huîtres creuses observées depuis 2008 (Biovigilance, Capretar, Caryocyto, ANR-Gimpec). La qualité cytogénétique des cheptels conchylicoles est donc un facteur qui est corrélé à leur comportement face aux divers épisodes de mortalité.

Le suivi 2016 a mis en évidence une occurrence variable de moules anormales caractérisées par la présence dans leur hémolymphe de cellules aneuploïdes/polyploïdes. Cette gamme de cellules aneuploïdes/polyploïdes a déjà été décrite lors de l'analyse de moules issues de zones contaminées par des polluants chimiques (Bihari *et al.* 2003), mais aussi en association avec des processus néoplasiques, appelés néoplasies disséminées ou néoplasies hémocytaires, qui touchent non seulement les moules bleues mais aussi plusieurs autres espèces de bivalves marins (Barber 2004 ; Carballa *et al.* 2015 ; Metzger *et al.*, 2016). Pour explorer l'hypothèse d'un processus néoplasique, des analyses histologiques et moléculaires sur des moules préalablement identifiées par cytométrie en flux comme ayant une haute ou basse « qualité cytogénétique » ont été initiées. Il apparaît de ces analyses préliminaires que les moules de haute « qualité cytogénétique » présentent toutes un profil histologique normal sans lésion identifiable et de plus ne présentent pas de différence génétique en fonction des tissus analysés. De façon intéressante, **les moules identifiées comme étant de basse « qualité cytogénétique » présentent des différences génétiques notables distinguant leur hémolymphe de leur branchies avec, pour chaque moule, des marqueurs microsatellites souvent différents, en taille et en nombre, entre ces deux tissus**. Enfin, sur le plan de l'aspect histologique, ces moules de basse « qualité cytogénétique » présentent, en dehors de la mortalité, un aspect anormal caractérisé par la présence de nombreux hémocytes dans les tissus conjonctifs et de nombreux granulocytomes dont la nature exacte reste à identifier au travers de recherches additionnelles.

Quelle que soit son origine, impact génotoxique de polluants, néoplasie ou autre, il apparaît que **la « qualité cytogénétique » des cheptels mytilicoles est fortement corrélée aux épisodes de mortalité. Ce facteur apparaît comme un facteur pouvant favoriser la survenue d'épisodes de mortalité de moules décrits ces trois dernières années sur le littoral atlantique français**.

Des travaux proposés en 2017 devraient permettre d'approfondir les causes possibles de variabilité de la « qualité cytogénétique » des moules.

### 3.2.4. Des conditions physiologiques particulières en lien avec les mortalités ?

#### **Quel lien établir entre la période de ponte dans le Pertuis Breton (Filières) et les premières mortalités ?**

Les données d'observations réalisées par le réseau Mytilobs (Robert et Soletchnik, 2016) sur la base des suivis en 2014, 2015 et 2016 permettent de faire trois constats :

- i) les mortalités saisonnières (hiver-printemps) observées depuis 2014 sur le site des filières (Filière W) sont les plus précoces des pertuis charentais et surviennent **après que la température a franchi 11°C** (température qui correspond au début des pontes (Lubet, 1959 ; Marteil, 1976) ;
- ii) les mortalités saisonnières (hiver-printemps) observées sur le site des filières (Filière W) sont associées à la **période de reproduction et à une maturation plus précoce pour ce site** et la structure d'élevage associée (en 2015, 1er pic mi-avril, période durant laquelle les moules étaient en gamétogénèse active, (stade 3A et 3B – d'après Lubet, 1959, voir

Tableau 6 en Annexe 4 et Figure 31) ;

iii) les mortalités printanières observées sur le site des filières (Filière W) marquent un **arrêt entre mai et juin qui est concomitant avec la fin des pontes** et une **température qui s'élève au-delà de 16°C**. Cette observation paraît plus nettement lors des années à fortes mortalités (2014, 2016).

D'un point de vue descriptif, tous ces éléments concourent à considérer pour le secteur des filières du Pertuis Breton **que la période de ponte peut apparaître comme un facteur qui favorise l'occurrence des épisodes de mortalité au travers d'une fragilisation naturelle des animaux durant ce stade physiologique critique.**

On notera par ailleurs que ces animaux mûrent plus tôt sur ces structures du fait d'une immersion permanente qui induit un effort de reproduction plus important pour les moules de filières en conditions marines que pour celles en zone intertidale et plus estuarienne (Garen *et al.*, 2004 ; Robert *et al.*, 2007, Soletchnik et Robert, 2016). Ceci est mis en évidence par les travaux du Mytilobs avec des prélèvements histologiques tout au long des suivis mensuels et trimestriels. Les échantillons sont constitués de 15 individus par site et par prélèvement.

L'évolution de la maturation à la station Filière W au regard de la température entre octobre 2014 et septembre 2015 est présentée en Figure 31.

Dans ce processus physiologique évidemment, l'environnement à travers la température notamment joue un rôle de variable forçante essentiel.

**Cette hypothèse physiologique et environnementale pourrait justifier un plan d'expérience spécifique pour tester ces facteurs** (exploitation des collections de blocs fixés pour histologie, essais expérimentaux d'infection par cohabitation à différents stades, différentes températures...).

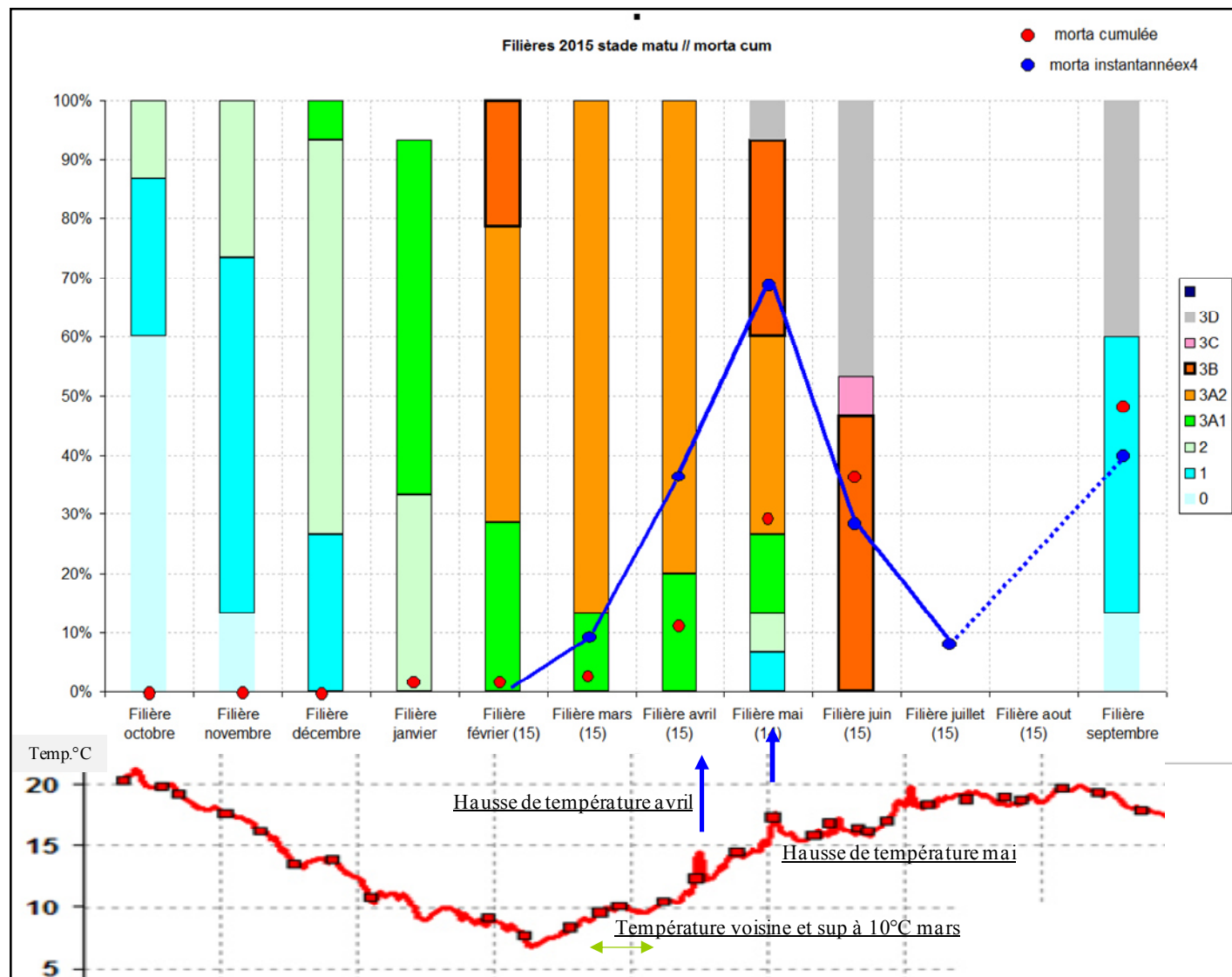


Figure 31 : suivis parallèles de l'évolution à Filière W en 2015 des stades mensuels de développement gonadiques des moules ; des niveaux de mortalité cumulée et instantanée ; des températures de l'eau en mesure haute fréquence (source S. Robert, Mytilobs)





## Quel lien établir entre l'état physiologique, le transcriptome des moules et les mortalités observées ?

L'objectif est ici de caractériser l'état physiologique et le transcriptome des moules dans les pertuis (durant un épisode ou hors épisode de mortalité). Ces analyses permettront de définir le **niveau d'expression des gènes** de la moule bleue en épisode de mortalité ou hors épisode de mortalité. Grâce à la création du méta transcriptome *de novo* (MouTon) et de son annotation, la **fonction biologique potentielle** associée à « ces gènes » permettra une identification des **voies activées ou inhibées** en réponse aux conditions analysées.

En fonction des gènes différentiellement exprimés (approche basée sur les ARN totaux extraits des tissus) entre conditions associées à la mortalité, il sera possible de détecter une/des signatures laissant suspecter la présence **d'un/de processus infectieux**. Les niveaux d'expression d'autres marqueurs de **stress ou de détresses physiologiques** pourront être également analysés pour soutenir une hypothèse plus multifactorielle.

Pour cela, des échantillons de moules vivantes, collectés avant, après et au cours des mortalités, sur des sites impactés et peu/pas impactés ont été étudiés. Afin de caractériser les animaux échantillonnés, la quantité de bactéries appartenant au groupe *Splendidus* présentes dans les tissus des animaux a été déterminée, et les données d'histopathologie obtenues dans l'action MYTILOBS ont été utilisées. Les 24 échantillons, choisis *a posteriori*, selon la spatialisation, le niveau des mortalités de 2015 et les indicateurs choisis, (quantité de bactéries et anomalies histo-pathologiques), ont été analysés par une approche transcriptomique à haut débit (RNA-seq).

Le matériel et méthode correspondant aux résultats présentés ici est détaillé en Annexe .

### Résultats

#### Assemblage du transcriptome *de novo* de la moule bleue

L'assemblage a été réalisé avec l'outil Trinity, suite à cet assemblage il a été filtré. Il a été identifié 517 388 contigs, ci-dessous sont présentées les statistiques de cet assemblage.

#### Statistique de l'assemblage filtré par Trinity

- Total trinity 'genes': 448 429
- Total trinity transcripts: 517 388
- Pourcentage de GC: 32.08 %
  
- Longueur médiane des contigs: 348
- Longueur moyenne des contigs: 439.54
- Nombre total de bases assemblées: 227410511

Les résultats obtenus de cet assemblage montrent qu'un grand nombre de contigs ont été générés (517 388) avec une longueur moyenne d'environ 439, 54pb. Une analyse complémentaire est en cours afin de vérifier ce résultat, les paramètres d'assemblage ayant été changés.

### Comparaison des réplicats

(A) Filière mars 2015, (B) Filière avril 2015, (C) Loix en Ré avril 2015, (D) Yves avril 2015, (E) Filière mai 2015, (F) Filière janvier 2015

Une analyse en composante principale a été réalisée sur tous les échantillons séquencés (n=24). Sur la Figure , trois clusters sont observés, un cluster avec les échantillons de Mars-Avril de Filière est à part ce qui laisse supposer que le signal de l'évènement en cours a bien été enregistré. Les échantillons Mai Filière, Avril Loix en Ré, Avril Yves forment le deuxième cluster qui pourrait correspondre à un groupe d'échantillons où l'évènement est en cours ou déjà passé. L'échantillon de Janvier à Filière forme un troisième cluster qui pourrait correspondre à un site non impacté avant mortalité. Le lot A présente une variance intra échantillon, mais aussi cette analyse montre des différences entre les lots.

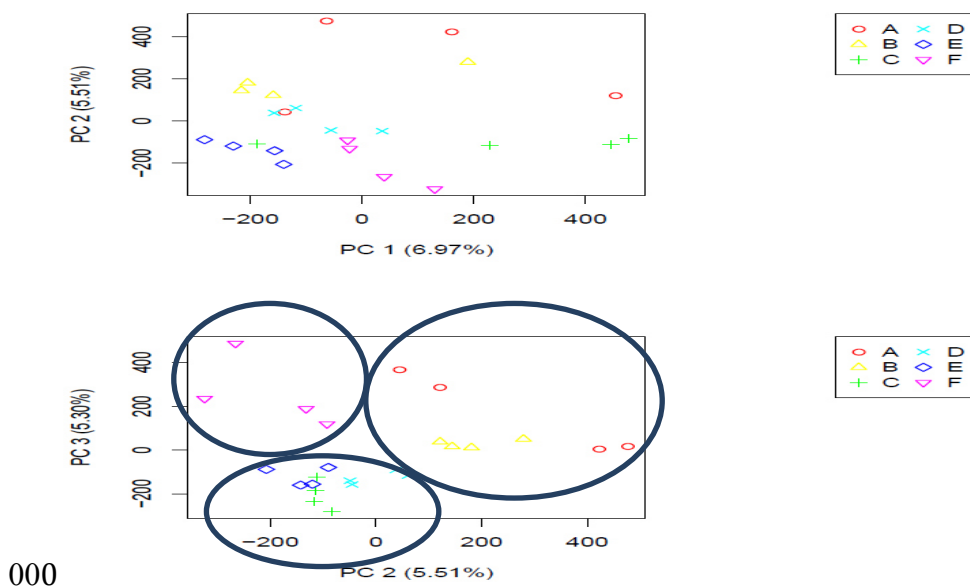


Figure 32 : analyse en composantes principales des lots séquencés. (A) Filière Mars 2015, (B) Filière Avril 2015, (C) Loix en Ré Avril 2015, (D) Yves Avril 2015, (E) Filière Mai 2015, (F) Filière Janvier 2015.

### Calcul de l'expression différentielle entre origine

Le calcul de l'expression différentielle a été réalisé avec le soft DESeq2, le différentiel d'expression a été réalisé entre les différents lots (Tableau 6).

Différentiel-expression	
A/B	Tableau 6 : présentation de toutes les combinaisons analysées pour évaluer le différentiel d'expression entre les différents lots, en prenant comme référence soit A : Mars-Filière (juste avant les mortalités), soit B : Avril – Filière (début des mortalités).
A/C	
A/E	
A/F	
B/E	
B/F	
B/C	
B/D	

La Figure 33 ci-dessous représente les Volcano plots des différentes analyses de différentiel d'expression pour le lot A par rapport à B, C, E et D. Ces graphiques ont été générés pour les

autres conditions présentées dans le tableau, mais ne figurent pas dans ce rapport. Sur ces graphiques l'ensemble des contigs différentiellement exprimés entre les conditions testées est observé. Les points rouges correspondent aux transcrits présentant une expression supérieure à 2 ou -2 et ayant une p value <0,001. Il est observé plus de gènes différentiellement exprimé avec une valeur significative entre le lot A et le lot E, cela correspond à une expression différentielle entre un lot A (avant les épisodes de mortalités) et le lot E du même site après mortalité.

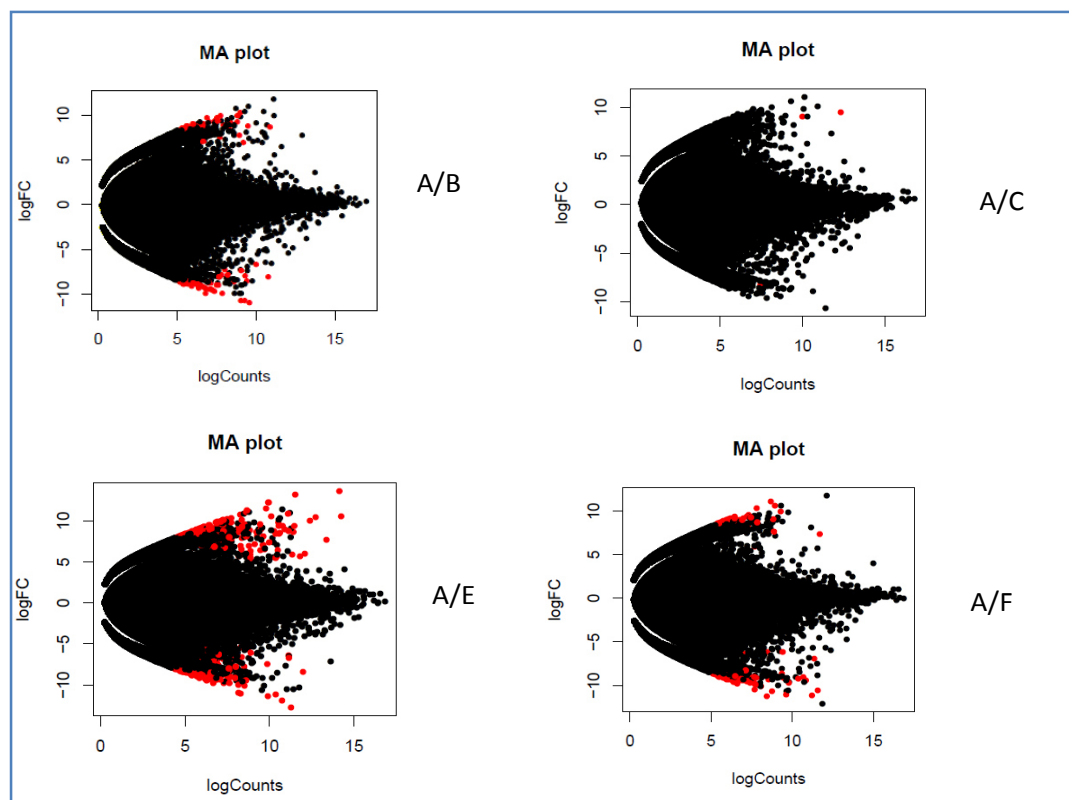


Figure 33 : représentation des « Volcano plots » des différentes analyses de différentiel d'expression pour le lot A par rapport à B, C, E et D.

### Conclusion et perspectives :

Ces données permettent de voir des tendances différentielles au niveau de l'expression des gènes en fonction des conditions testées. L'annotation du transcriptome *de novo* est en cours. Après avoir obtenu le résultat de l'annotation, il sera envisageable d'associer un gène différentiellement exprimé et significatif ( $p < 0.001$ ) avec une fonction biologique putative. Il est prévu de poursuivre ce travail en 2017.



**OBJECTIF 3 : CARACTERISER LE POTENTIEL ADAPTATIF DE  
POPULATIONS DE MOULES FACE AUX EPISODES DE  
MORTALITE MASSIVE**



## 4. Objectif 3 : Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité printanière

### 4.1. Introduction

Suite aux épisodes de mortalités observées principalement au printemps chez les moules depuis 2014, l'Ifremer mène des expériences visant à en identifier les causes. A ce jour, les causes exactes des mortalités restent inconnues, même si deux hypothèses prépondérantes sont avancées : une origine infectieuse, avec l'implication éventuelle de souches de *Vibrio splendidus*, et la « qualité cytogénétique » des populations de moules utilisées en élevage.

En complément à la recherche des causes des mortalités, il est intéressant de caractériser les capacités d'adaptation pour une meilleure résistance des moules face aux épisodes de mortalité printanière.

La voie utilisée pour évaluer les capacités de résistance accrue au phénomène a été de produire des animaux en écloserie et de tester ces animaux en zone d'élevage, mais également en conditions expérimentales. Cette production a nécessité l'utilisation d'animaux provenant de zones d'élevages mytilicoles ou de populations sauvages de moules. Cependant, ces animaux issus du recrutement naturel ne peuvent pas être utilisés directement pour des suivis de la résistance accrue au phénomène car il est impératif de connaître la survie des animaux pendant l'intégralité de l'historique de vie, notamment dans les premiers stades que l'on ne peut bien caractériser qu'en milieu contrôlé.

Par ailleurs, au-delà de l'étude du potentiel adaptatif des moules face aux épisodes de mortalité (printanière), ces mêmes **productions de lots d'animaux « qualifiés », à l'historique connu, permettront aussi de disposer d'animaux contrastés pour réaliser les essais expérimentaux visant à tester et établir les conditions ou facteurs favorisant la survenue d'épisode de mortalités.**

### 4.2. Lots produits en 2015 et suivi en 2016

#### Production

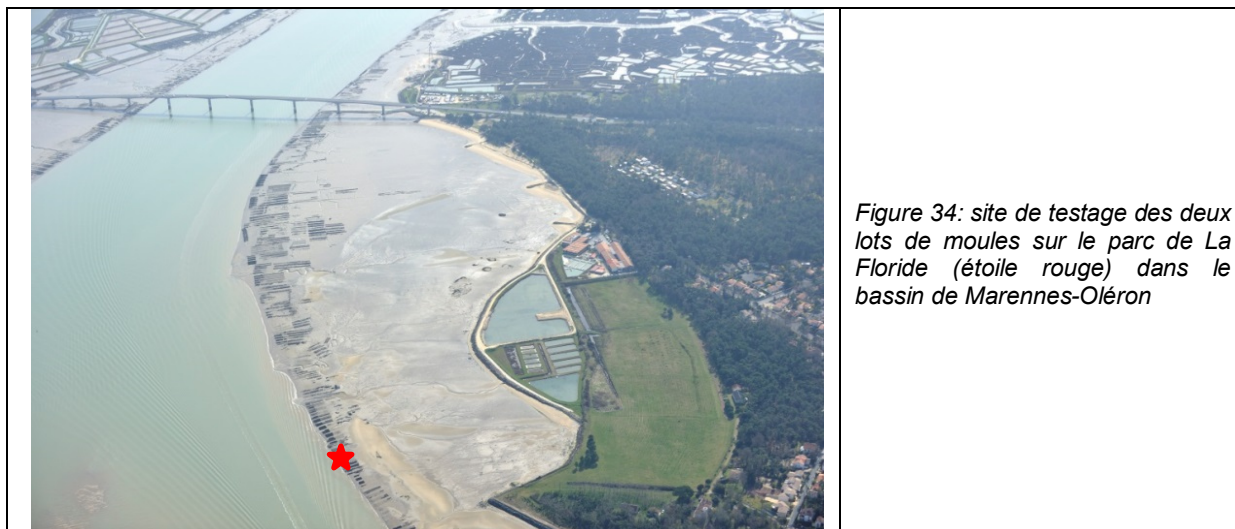
Deux lots de moules ont été produits en mars 2015 à l'écloserie de la station Ifremer de La Tremblade (LGPM). L'un des lots, nommé ensuite **lot G0-témoin**, a été produit à partir de moules échantillonnées sur le site d'Agnas en décembre 2014. Ces moules sont considérées comme n'ayant pas connu d'épisodes de mortalité. Le second lot, nommé **G0-lot sélectionné**, a été produit à partir de moules ayant survécu à des épisodes de mortalité dans la baie d'Yves en 2014 (premières « pressions de sélection » dans le milieu). Les deux lots ont donc pour origine géographique la Charente-Maritime.

Les deux lots ont été produits par une ponte en masse utilisant 300 et 200 géniteurs pour les lots témoin et sélectionné respectivement. Toutes les étapes d'élevages ont été réalisées à l'écloserie Ifremer de La Tremblade.

#### Premier testage d'une résistance accrue aux épisodes de mortalités en mer

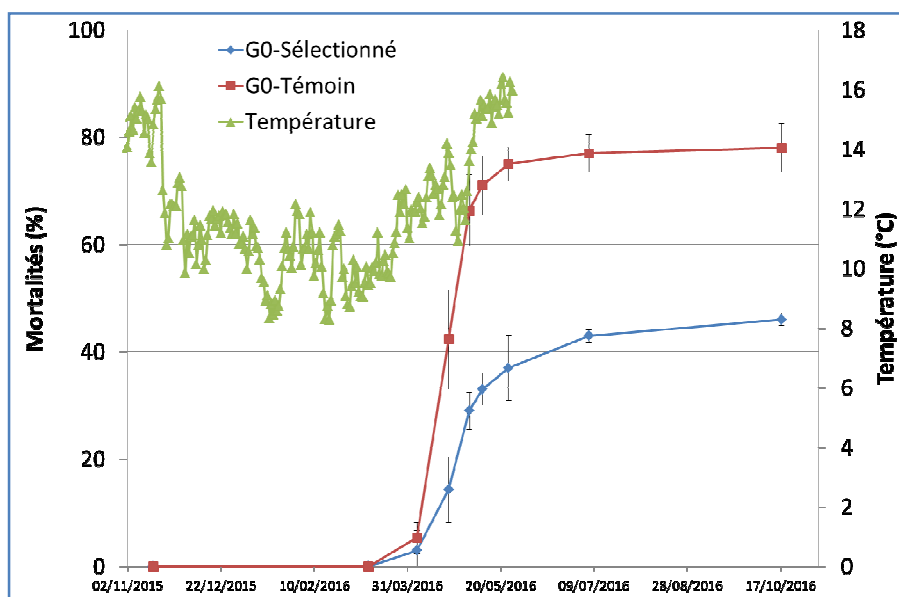
En novembre 2015, trois poches de 100 moules (âgées de huit mois) pour chaque lot ont été mises sur le site de La Floride (site ostréicole en estuaire de Seudre) pour le suivi des mortalités

(Figure 34). Le poids individuel moyen des moules était de 1,5g pour le lot témoin, et 1,7g pour le lot sélectionné.



De novembre 2015 à mars 2016, aucune mortalité n'a été observée (Figure 35). A partir du 5 avril, les premières mortalités ont été enregistrées. Celles-ci se sont accentuées en avril et mai pour atteindre 75% pour le lot Témoin et 37% pour le lot Sélectionné le 24 mai 2016. Ensuite, des mortalités sont encore été observées, mais elles sont restées limitées. A la fin du suivi en octobre 2016, les mortalités cumulées étaient de 78% pour le lot témoin et 46% pour le lot sélectionné.

Ce premier testage a permis de mettre en évidence une différence de mortalité entre les deux lots avec une mortalité moindre pour le lot sélectionné, suggérant **une réponse positive à la sélection pour améliorer la résistance des moules aux épisodes de mortalité printanière sur estran**. Cependant, ces premiers résultats encourageants ont été réalisés dans un site d'élevage non mytilicole. Cet aspect reste donc à étudier sur des zones plus représentatives des pratiques culturales couramment utilisées en mytiliculture.





*Figure 35 : mortalités (moyennes et écart-types) des moules pour le lot Témoin et le lot Sélectionné de novembre 2015 à octobre 2016 sur le site de La Floride (la température de l'eau de mer est indiquée en vert).*

### **Second testage de la résistance accrue aux épisodes de mortalité en mer**

Les deux lots, conservés à l'écloserie du LGPMM, ont été de nouveau mis sur le site de La Floride le 3 mai 2016 (poids individuel des moules 10g, âge~14 mois) à la fin du pic de mortalité observée pour le premier testage. Aucune mortalité n'a été enregistrée pour les deux lots suivis et celle-ci reste inférieure à 5% en décembre 2016 après sept mois de stabulation

Cette absence de mortalité indiquerait soit que les conditions environnementales n'étaient plus favorables aux épisodes de mortalité, soit un développement d'une résistance accrue des lots de moules testés, et enfin, soit une absence du ou des agents causaux.

### **Troisième testage de la résistance accrue aux épisodes de mortalités en laboratoire**

Les deux lots, conservés à l'écloserie du LGPMM, ont été également testés en laboratoire. A partir de février 2016 (11 mois d'âge), 50 moules par lot ont été mises dans un bac alimenté en eau de mer filtrée et traitée aux UV. Cette condition a été répliquée dans six bacs. Afin d'observer une potentielle transmission horizontale d'un agent pathogène, 100 moules « sources » ayant survécu à des épisodes de mortalité ont été mises en contact avec les lots témoin et sélectionné dans chaque bac. Trois sources ont été utilisées, chacune étant mise dans deux bacs : moules survivantes des épisodes de mortalités à Yves en 2014 et au laboratoire en 2015 (source Yves\_Sauvage), moules échantillonnées à d'Agnas en 2014 et survivantes d'épisodes de mortalités en 2015 au laboratoire (source Agnas\_Sauvage), et des moules produites en écloserie en 2015 à partir des moules d'Agnas et ayant connu un épisode de mortalité au stade naissain en laboratoire en 2015 (source Agnas\_Eclo). Enfin, des bacs témoins ne contenant que les deux lots d'écloserie ont également été suivis.

Pour les bacs témoin, aucune mortalité n'a été observée pendant la durée entière du suivi (février 2016 à janvier 2017). Pour les bacs contenant les sources, aucune mortalité n'a été relevée de février à avril 2016. Les mortalités ont débuté en mai 2016 et elles ont été observées tous les mois jusqu'à la fin du suivi en janvier 2017 (Figure 36). A cette date, la mortalité cumulée était de 77% pour le lot témoin et 63% pour le lot sélectionné.

En fonction des sources utilisées et des répliqués, cette différence de mortalité entre les lots témoin et sélectionné varie de -11% à + 37% (Figure 37). De même, les sources ont également montré des mortalités variant de 33% pour la source Agnas2\_Eclo à 57% pour la source Yves\_Sauvage (Figure 37). Ces résultats suggèrent que des moules survivantes à des épisodes **de mortalités survenus soit en mer, soit en laboratoire, peuvent être affectées par des épisodes de mortalité**, et (2) les causes des mortalités peuvent être différentes entre les bacs.

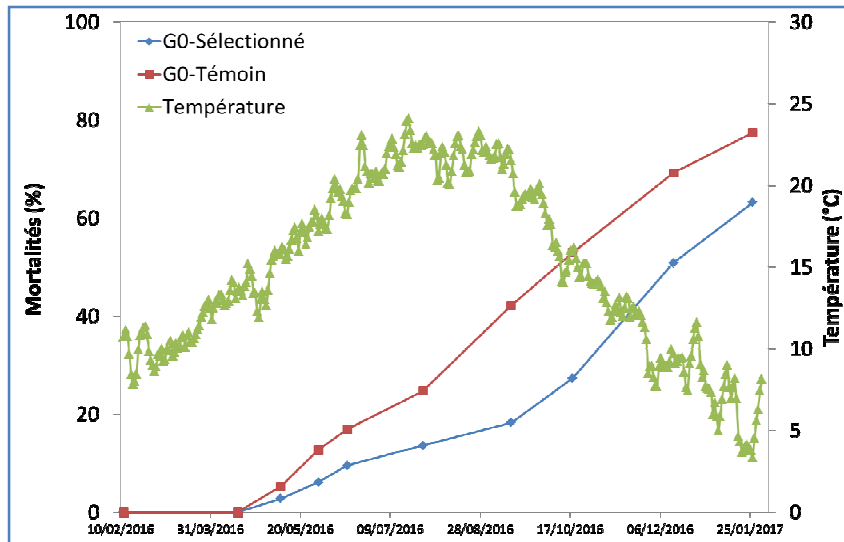


Figure 36: mortalités (moyennes des six bacs) des moules pour le lot Témoin et le lot Sélectionné de février à janvier 2017 en laboratoire (la température de l'eau de mer est indiquée en vert).

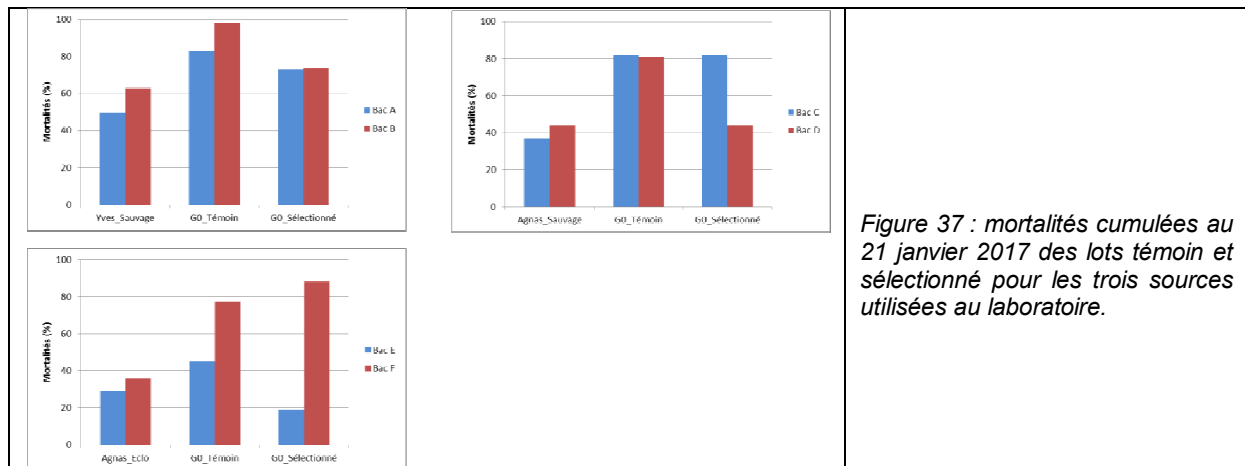


Figure 37 : mortalités cumulées au 21 janvier 2017 des lots témoin et sélectionné pour les trois sources utilisées au laboratoire.

### 4.3. Lots produits en 2016

De nouveaux lots ont été produits à l'écluserie du LGPMM de la station Ifremer de La Tremblade en janvier 2016. Comme pour les lots produits en 2015, les lots produits en 2016 utilisent une ponte en masse des moules échantillonnées en 2014 à d'Agnas et Yves, et qui avaient été conservées à l'écluserie. Les deux lots de moules, nommés témoin et sélectionné, respectivement pour les origines Agnas et Yves, ont ensuite été élevés dans les installations sécurisées de l'écluserie du LGPMM à La Tremblade, puis à la nurserie du LSPC à Bouin.

En octobre/novembre 2016, **un testage élargi** a été entrepris en testant le lot sélectionné et le lot témoin dans huit sites en sollicitant en complément de l'action Morbleu, l'action de surveillance Mytilobs et le centre technique SMIDAP (Tableau 7). Ce suivi réalisé dans des conditions professionnelles et expérimentales vise à **étudier les interactions entre les génotypes et les environnements**. Il est actuellement en cours.

Tableau 7 : sites de testages pour l'évaluation de la réponse à la sélection pour améliorer la survie des moules.

Région	Suivi effectué par	Site	Pratiques culturelles
Normandie	Ifremer (Mytilobs)	Baie des Veys	Poches
Vendée	SMIDAP (Tesco)	Le Fiol	Bouchot
Vendée	SMIDAP (Tesco)	La Plaine-sur-Mer	Bouchot
Charente-Maritime	Ifremer (Mytilobs)	Baie d'Yves	Bouchot
Charente-Maritime	Ifremer (Morbleu)	Baie de l'Aiguillon	Bouchot
Charente-Maritime	Ifremer (Morbleu)	Agnas	Poches
Charente-Maritime	Ifremer (Amélioration)	La Floride	Poches
Charente-Maritime	Ifremer (Morbleu)	Ecloserie	Bacs

## 5. Conclusions générales

En 2016, les objectifs de l'action de recherche MORBLEU étaient de : (i) continuer l'analyse des données collectées en 2015, (ii) effectuer une nouvelle campagne d'études et d'observations *in situ* pour mieux décrire le phénomène de mortalités, (iii) formuler des hypothèses sur les facteurs favorisant les mortalités et développer des essais pour tester ces hypothèses avec des lots de moules présentant un potentiel adaptatif face aux mortalités.

En raison de l'observation d'épisodes de mortalité de moules dans de nouveaux sites fin 2015, un nouveau site d'étude a été rajouté en baie de Bourgneuf. En 2016, les cinq sites ateliers des pertuis charentais et de Vendée étaient : Maison Blanche, Filière, Loix, Eperon, Boyard.

### Description des mortalités

**En 2016, des épisodes de mortalité massive de moules se sont produits pour la 3<sup>ème</sup> année consécutive.** Elles affectent tout autant les lots sentinelles MORBLEU et Mytilobs que les cheptels professionnels en élevage sur bouchots ou filières dans les secteurs 17-85-44. Les mortalités des pertuis charentais et de Vendée présentent des cinétiques variables selon les sites. En fin d'élevage, les taux de mortalités de 50% à 85% ont un caractère exceptionnel au regard des données historiques. Ils sont supérieurs à ceux rencontrés en 2015, et proches des taux de mortalité de l'année 2014<sup>4</sup>. Malgré trois années consécutives de mortalité massive, le **naissain n'est pas affecté au moment du captage** et le recrutement de chaque nouvelle cohorte reste très abondant.

### Etude de l'environnement sur les sites ateliers

*Peut-on identifier des conditions environnementales favorables à l'émergence des mortalités ?*

En 2016, l'étude hydrobiologique concerne les sites de Maison Blanche (proche de Noirmoutier) et les trois sites des Pertuis Charentais : Filière, Eperon et Boyard. D'un site à l'autre, les températures présentent de grandes similitudes et les salinités de grandes disparités. Parallèlement, les nutriments, les éléments traces métalliques dissous et les contaminants chimiques, mesurés tout les 15 jours environ montrent : (i) que les concentrations des

<sup>4</sup> Le contexte infectieux des mortalités ne fait pas partie de l'action Morbleu. Il est étudié dans les actions du Repamo, du Mytilobs2 et du LNR

nutriments (NO<sub>3</sub>, SiOH, PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>), en 2015 et 2016, sont dans la gamme haute des valeurs de référence (REPHY et DCE), (ii) que les teneurs en éléments traces métalliques (13 éléments) ne sont différentes, ni entre les trois sites ateliers (Boyard, Eperon, Filière), ni entre les deux années hormis pour le Cd, (iii) que des contaminants chimiques hydrophiles sont détectés sur POCIS à l'état de traces (<NQE- CMA) en 2015 comme en 2016, avec un effet saisonnier marqué. En 2015, le site de Boyard, le plus impacté en hiver par les contaminants, ne présente pas plus de mortalités de moules. Une analyse sur l'année 2015<sup>5</sup> ne montre aucune relation directe entre les mortalités de moules et le matériel dissous, qu'il s'agisse des éléments traces métalliques, des contaminants hydrophiles ou des sels nutritifs. En 2016 comme en 2015, les indices de diversité phytoplanctonique sont particulièrement bas durant l'apparition des premières mortalités de moules au printemps, cela au regard de séries temporelles de 15 ans. Ces faibles indices de diversité sont particulièrement marqués lors du développement de blooms phytoplanctoniques. Ces résultats sont cohérents avec ceux montrant que l'apparition du pic printanier de mortalité semble corrélée aux variations de la teneur en oxygène dissous.

Par ailleurs des analyses statistiques réalisées sur 17 années (2000-2016) à partir de variables climatiques et biologiques (diversité phytoplanctonique) permettent à nouveau de classer à part les **trois années à fortes mortalités, 2014, 2015, 2016 comme étant associées à une typologie environnementale particulière avec un climat hiver-printemps plutôt par "doux et pluvieux" et des indices de diversité bas**. Parmi ces trois années, 2015, dont l'hiver a été le plus froid, est également l'année avec de plus faibles mortalités.

L'étude de la **dynamique des communautés bactériennes planctoniques** (année 2015, approche NGS, métabarcoding) montre que des déséquilibres importants apparaissent au moment des premières mortalités. Il pourrait exister un lien entre la dynamique microbienne printanière et l'initiation des épisodes de mortalité de moules<sup>6</sup>. D'autre part, la survenue des premières mortalités de moules et celles des efflorescences phytoplanctoniques printanières sont concomitantes avec les premières pontes et le franchissement de la température au-delà de 10°C.

**Organisme pathogène suspect** : En 2016, aucun agent infectieux réglementé n'est identifié sur les échantillons de moules. La présence de bactéries majoritaires du groupe *Splendidus* est systématiquement relevée dans les échantillons. Une souche de *Vibrio splendidus* pathogène, isolée en 2010 sur des moules en provenance de Brest, induit des mortalités en conditions expérimentales, mais ne semble pas impliquée dans les phénomènes de mortalité de 2014 et 2015. Des expériences sont à conduire avec des souches isolées de moules à partir de 2014.

**Les analyses génétiques** montrent que les moules provenant des sites ateliers de MORBLEU/Mytilobs, en 2015 et 2016, étaient des *M. edulis* du Golfe de Gascogne<sup>7</sup>. Aucun signe de chimérisme *M. trossulus*/*M. edulis* n'a été retrouvé sur les moules collectées en 2015 et 2016. En revanche, l'observation de très rares chimères génétiques *M. edulis*/*M. edulis* suggère un possible processus néoplasique transmissible<sup>8</sup>. En 2016 comme en 2015, les analyses de cytométrie en flux sur l'hémolymphe révèlent une grande variabilité de la « qualité

<sup>5</sup> L'ensemble des données 2016 n'était pas encore disponible.

<sup>6</sup> De nombreuses données 2015 et 2016 sont encore à analyser (16S et 18S) pour éclairer cette hypothèse.

<sup>7</sup> Avec détection de rares hybrides *edulis/galoprovincialis* de génération avancée.

<sup>8</sup> Afin de détecter plus de chimérisme, il est envisagé d'effectuer cette étude sur deux tissus : l'hémolymphe et le manteau.

cytogénétique » selon les lots et leur origine, corrélée aux performances de survie des moules. Celles de basse « qualité cytogénétique » semblent se distinguer par un génotypage différent entre leur hémolymph et leurs branchies.

D'autres études visent à mettre en relation **l'expression de gènes avec des caractéristiques physiologiques**<sup>9</sup>. L'analyse des échantillons (2016) permet d'observer une expression différentielle qui semble associée à un évènement de mortalité. Des travaux initiés en 2015 montrent que un organisme pathogène (étiologie infectieuse bactérienne établie) peut rester présent dans les moules survivantes et induire une infection exprimée une 2<sup>ème</sup> année. Ces moules peuvent alors être à l'origine de mortalités d'autres stocks de moules non impactés auparavant au travers un processus de transmission de l'agent infectieux. Un lot de naissains issus de parents survivant à un épisode de mortalité (lot Wild) a été comparé à un stock non impacté (lot naïf Témoin). Confrontés à un nouvel épisode de mortalité, le lot « Wild » meurt moins que le lot témoin, traduisant ainsi une **réponse adaptative positive face à un épisode de mortalité des moules**. Un testage élargi de ces deux conditions est prévu en 2017 sur huit sites différents<sup>10</sup>. Ce suivi réalisé dans des conditions professionnelles et expérimentales vise à étudier les interactions entre les génotypes et les environnements et ainsi évaluer le potentiel adaptatif des moules face aux mortalités en cours<sup>11</sup>.

Ainsi, en l'état actuel des connaissances sur les mortalités de moules (2014-2016), l'implication de souches virulentes de *V. splendidus* est confirmée. De même, pour la deuxième année consécutive, la mise en évidence de forts taux d'anomalies cytogénétiques dans les cellules hémocytaires avant les épisodes de mortalité sont associés chez ces individus à des taux de survie moindres. La découverte de rares chimères génétiques *edulis/edulis* pose l'hypothèse d'un potentiel processus néoplasique transmissible chez cette espèce. L'environnement semble bien pouvoir moduler l'intensité des mortalités à travers des relations de type : [température – maturation – mortalités] et/ou [température – équilibre et interaction bactérienne/phytoplanctonique – mortalités]. Ces pistes restent à étudier plus précisément afin de comprendre s'il s'agit là de concomitances évènementielles ou si il existe des facteurs déterministes (à effet direct ou indirect) en relation avec les mortalités de moules.

---

<sup>9</sup> Sur le plan méthodologique, l'annotation d'un transcriptome de novo est en cours.

<sup>10</sup> Cette opération lancée fin 2016 est en cours et fait appel au delà de l'action Morbleu, à l'action de surveillance Mytilobs et au centre technique du SMIDAP (Tescor)

<sup>11</sup> La production de lots d'animaux contrastés, à l'historique connu, permettra aussi de disposer d'animaux « qualifiés » pour tester et établir les conditions ou facteurs favorisant l'expression des mortalités.

## 6. Références bibliographiques

- Anonyme (2016). Projet CAMPEMOULES 1 – Caractérisation des performances des élevages de moules et évaluation de la qualité du milieu en Pays de La Loire - CRC Pays de la Loire, SMIDAP. 12 septembre 2016.(consulté le 14/03/17)  
[http://www.smidap.fr/images/pdf/AAP\\_2016/CAPEMOULES\\_SEPT\\_2016.pdf](http://www.smidap.fr/images/pdf/AAP_2016/CAPEMOULES_SEPT_2016.pdf)
- Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E.V., (2012). Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 667–684. doi:10.1128/MMBR.00007-12
- Asplund, M.E., Baden, S.P., Russ, S., Ellis, R.P., Gong, N., Hernroth, B.E., (2014). Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environ Microbiol* 16, 1029–1039. doi:10.1111/1462-2920.12307
- Barber, B. (2004). Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat.Living Resour.* 17, 449–466.
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., Benabdelmouna, A. (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat. Toxicol.* 146 : 93–104.
- Béchemin, C., Soletchnik, P., Polsenaëre, P., Le Moine, O., Pernet, F., Protat, M., Fuhrmann, M., Quere, C., Goulitquer, S., Corporeau, C., Lapegue, S., Travers, M.-A., Morga, B., Garrigues, M., Garcia, C., Haffner, P., Dubreuil, C., Faury, N., Baillon, L., Baud, J.-P., Renault, T., (2015). Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais. *Bulletin Epidémiologie, Santé animale et alimentation* 6–9.
- Béchemin, C., Soletchnik, P., Polsenaëre, P., Le Moine, O., Pernet, F., Protat, M., Fuhrmann, M., Quere, C., Goulitquer, S., Corporeau, C., Renault, T., Lapegue, S., Travers, M.-A., Morga, B., Garrigues, M., Garcia, C., Haffner, P., Dubreuil, C., Faury, N., Baillon, L., Baud, J.-P., (2014). Surmortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (Rapport d'expertise, mars 2014).
- Ben Cheikh Yosra, Travers Marie-Agnès, Morga Benjamin, Godfrin Yoann, Rioult Damien, Le Foll Franck (2016). First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Developmental And Comparative Immunology*, 57, 107-119. Publisher's official version : <http://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.014>
- Benabdelmouna Abdellah, Ledu Christophe (2016a). The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 138, 30-38. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>
- Benabdelmouna Abdellah, Ledu Christophe (2016b). Blue mussel mortality outbreak in France is associated with heavy genomic abnormalities detected by flow cytometric analysis of hemolymph. AMMR2016 - 1st International Symposium on Advances in Marine Mussel Research. 26-27 October 2016, University of Vigo, Spain. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00356/46720/>
- Benabdelmouna, A. and Hemissi, I. (2011). CARTAMO : CARTographie des Anomalies génomiques dans les gisements naturels d'huîtres creuses du bassin de Marennes Oléron. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00062/17281/>
- Benabdelmouna, A., Hemissi, I., Bodin, S., Robert, S., Ledu, C., Laporte, P. (2011). CAPRETAR : Etude comparative des caractéristiques cytogénétiques et des performances de survie de naissains sauvages issus du CAPtagePREcoce ou TARdif. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00062/17283/>
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., (2011). Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés. Publications de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Bierne, N., P. Borsa, C. Daguin, D. Jollivet, F. Viard, F. Bonhomme and P. David. (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M-galloprovincialis*. *Molecular Ecology* 12: 447-461.
- Bihari, N., Mičić, M., Batel, R., Zahn, R.K. (2003). Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. *Aquat.Toxicol.* 64, 121–129.

- Bratbak, G., Thingstad, T.F., 1985. Phytoplankton-bacteria interactions: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 25, 23–30.
- Buchan, A., LeCleir, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Micro* 12, 686–698. doi:10.1038/nrmicro3326
- Carballal, M.J., Barber, B.J., Iglesias, D., Villalba, A. (2015). Neoplastic diseases of marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 83
- Chistoserdov, A.Y., Smolowitz, R., Mirasol, F., Hsu, A., 2005. Culture-dependent characterization of the microbial community associated with epizootic shell disease lesions in American lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Shellfish Research* 24, 741–747.
- Costoya, X., deCastro, M., Gómez-Gesteira, M., Santos, F., 2015. Changes in sea surface temperature seasonality in the Bay of Biscay over the last decades (1982–2014). *Journal of Marine Systems* 150, 91–101. doi:10.1016/j.jmarsys.2015.06.00
- CREAA – CRC-Pays de la Loire (2016). Bulletin d'information année 2016, sept. Observatoire Mytilicole des Pertuis Charentais. [http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/20\\_fiche\\_moule.pdf](http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/20_fiche_moule.pdf)
- Cruaud, A., Rasplus, J.-Y., 2012. Les défis des nouvelles technologies de séquençage. *Biofutur* 294, 3506.
- Cruz Justine Marie (2015). Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. *Chimie analytique*. Université de Bordeaux 1, 2015.
- Dabrin Aymeric, Schafer Jörg, Blanc Gerard, Strady Emilie, Masson Matthieu, Bossy Cecile, Castelle Sabine, Girardot Naïg, Coynel Alexandra (2009). Improving estuarine net flux estimates for dissolved cadmium export at the annual timescale: Application to the Gironde Estuary. *Estuarine Coastal And Shelf Science*, 84(4), 429-439. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.07.006>
- Droop, M.R., 2007. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of Plankton Research* 29, 107–113. doi:10.1093/plankt/fbm009
- François Cyrille. (2015). Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00256/36691/>
- Fraïsse, C., K. Belkhir, J. Welch and N. Bierne. 2016. Local inter-species introgression is the main cause of outlying levels of intra-specific differentiation in mussels. *Molecular Ecology* 25: 269-286.
- Gaillardet, J., Viers, J., & Dupré, B. (2003). Trace elements in river waters. *Treatise on geochemistry*, 5, 225-272.
- Geret, F., Burgeot, T., Haure, J., Gagnaire, B., Renault, T., Communal, P. Y., & Samain, J. F. (2013). Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental toxicology*, 28(12), 689-699.
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F., 2010. REVIEW Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 409, 267–299. doi:10.3354/meps08607
- Guesdon Stéphane, Travers Marie-Agnès, Hervio Heath Dominique, Derrien Annick, Genauzeau Sylvie, Schmitt Anne, Leroi Laura, Pepin Jean-Francois (2016). Equilibre microbien et initiation des épisodes de mortalité de moules. Y aurait-il un lien? Journées ODE. 8-9 novembre 2016. Logonna Daoulas, France.
- Hsieh, J.L., Fries, J.S., Noble, R.T., 2007. *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary. *Ecological Applications* 17, S102–S109. doi:10.1890/05-1274.1
- Loch, T.P., Faisal, M., 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J Adv Res* 6, 283–300. doi:10.1016/j.jare.2014.10.009
- Lupo Coralie, Osta Amigo Axel, Fleury Elodie, Robert Stéphane, Garcia Celine, Arzul Isabelle, Baillon Laury, Bechemin Christian, Canier Lydie, Chollet Bruno, Dechamps Lucie, Dubreuil Christine, Fauray Nicole, Francois Cyrille, Godfrin Yoann, Lapegue Sylvie, Morga Benjamin, Travers Marie-Agnès, Tourbiez Delphine, Masson Jean-Claude, Verin Françoise, Cordier Remy, Gangnery Aline, Louis Wilfried, Mary Charlotte, Normand Julien, Penot Julia, Cheve Julien, Dagault Françoise, Le Jolivet Aurore, Le Gal Dominique, Lebrun Luc, Bellec Gwenaël, Bouget Jean-Francois, Cochennec-Laureau Nathalie, Palvadeau Hubert, Grizon James, Chabirand Jean-Michel, Pepin Jean-Francois, Seugnet Jean-Luc, D'Amico Florence, Maurer Daniele, Le Gall Patrik, Mortreux Serge, Baldi Yoann, Orsoni Valerie, Bouchoucha Marc, Le Roy Valerian, Pouvreau Stéphane, Queau Isabelle, Lamoureux Alice (2016). Bilan 2015 du dispositif national de surveillance de la santé des mollusques marins. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43486/>
- Martins, E., Queiroz, A., Serrão Santos, R., Bettencourt, R., 2013. Finding immune gene expression differences induced by marine bacterial pathogens in the Deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* 10, 7279–7291.

- Metzger, M. J., A. Villalba, M. J. Carballal, D. Iglesias, J. Sherry, C. Reinisch, A. F. Muttray, S. A. Baldwin et al. 2016. Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature* 534: 705-709.
- Morán, X.A.G., López-Urrutia, Á., Calvo-Díaz, A., Li, W.K.W., 2010. Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Global Change Biology* 16, 1137–1144. doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01960.x
- Moreau, P., Faury, N., Burgeot, T., & Renault, T. (2015). Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *PloS one*, 10(6), e0130628.
- Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.-F., Duchaud, E., 2008. Population Structure of the Fish-Pathogenic Bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3702–3709. doi:10.1128/AEM.00244-08
- Olofsson, M., Asplund, M.E., Karunasagar, I., Rehnstam-Holm, A.-S., Godhe, A., 2013. *Prorocentrum micans* promote and *Skeletonema tropicum* disfavours persistence of the pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 42, 729–733.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès (2016a). Projet «MORBLEU» année 2015. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais : de l'expertise aux actions de recherche, description et étude des conditions associées aux épisodes de mortalité ou susceptibles de les favoriser. Colloque LITEAU "Observation et recherche en appui aux politiques du littoral et de la mer". 14 et 15 janvier 2016, Brest, France.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès, Bechemin Christian, Soletchnik Patrick, Le Moine Olivier, Guesdon Stéphane, Lapegue Sylvie, Benabdelmouna Abdellah, Hervio Heath Dominique, Bierne Nicolas (2016b). Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais et Vendée 2014-2015 : de l'expertise aux actions de recherche. Description des conditions associées aux épisodes de mortalité. Point d'information sur l'étude en cours. Journée de la Santé des mollusques marins et Journées de l'Observation conchylicole. 02 au 04 février 2016, Ifremer, Nantes, France.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès (2016c). Projet de recherche "MORBLEU". Environnement des écosystèmes mytilicoles et crises de mortalité récentes, quelles interactions? Etude des facteurs pouvant favoriser les surmortalités de moules bleues (*Mytilus edulis*) dans les pertuis charentais et en Vendée (2014-2016). Journées ODE. 8-9 novembre 2016. Logonna Daoulas, France. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00361/47174/>
- Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., Marrasé, C., (2004). Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753–6766. doi:10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004.
- Polsenaère, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Gohin, F., Robert, S., Pépin, J. F., ... & Gouletquer, P. (2017). Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter 2014, Breton Sound, France). *Journal of Sea Research*.
- Riquet, F., A. Simon and N. Bierne. (2017). Weird genotypes? Don't discard them, transmissible cancer could be an explanation. *Evolutionary Applications* 10: 140-145.
- Robert Stéphane, Soletchnik Patrick (2016). Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis*, MYTILOBS / Campagne 2015. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00334/44494/>
- Robert Stéphane, Soletchnik Patrick, Pepin Jean-Francois, Le Moine Olivier, Guesdon Stéphane, Travers Marie-Agnès, Garcia Celine, Degremont Lionel, Benabdelmouna Abdellah, Osta Amigo Axel, Bierne Nicolas (2016). Mortalités massives de moules bleues (*Mytilus edulis*) sur les côtes françaises (2014-2016) : Eléments de connaissances (mai 2016). Rencontre avec des professionnels de la mytiliculture à Ifremer la Rochelle, le 20 mai 2016. Rencontre avec des professionnels de la mytiliculture. 20 mai 2016, Ifremer La Rochelle.
- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J.L., (2005). Links between Phytoplankton and Bacterial Community Dynamics in a Coastal Marine Environment. *Microb Ecol* 49, 163–175. doi:10.1007/s00248-003-1057-0
- Scheibner, M., Dörge, P., Biermann, A., Sommer, U., Hoppe, H.-G., Jürgens, K., (2014). Impact of warming on phyto-bacterioplankton coupling and bacterial community composition in experimental mesocosms. *Environmental microbiology* 16, 718–733.
- Soletchnik Patrick, Robert Stéphane (2016). Eléments de connaissance sur la mortalité et la reproduction de la moule bleue (*Mytilus edulis*) sur la façade atlantique. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00345/45634/>
- Stachowski-Haberkorn Sabine, Guesdon Stéphane, Bechemin Christian, Chiffolleau Jean-Francois, Brach-Papa Christophe, Soudant Philippe, Beker Beatriz, Jadas-Hécart Alain (2014). TOPHYAC. Tolérance des communautés phytoplanctoniques aux phytosanitaires dans le panache de la Charente.



- Programme Évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00300/41115/>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21, 2045–2050. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x
- Tada, Y., Taniguchi, A., Nagao, I., Miki, T., Uematsu, M., Tsuda, A., Hamasaki, K., 2011. Differing Growth Responses of Major Phylogenetic Groups of Marine Bacteria to Natural Phytoplankton Blooms in the Western North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4055–4065. doi:10.1128/AEM.02952-10
- Travers Marie-Agnès, Pepin Jean-Francois, Soletchnik Patrick, Guesdon Stéphane, Le Moine Olivier (2016a). Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés – MORBLEU. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/>
- Travers Marie-Agnès, Morga Benjamin, Godfrin Yoann, Garrigues Manon, Garcia Celine, Dubreuil Christine, Tourbiez Delphine, Chollet Bruno, Osta Amigo Axel, Lupo Coralie, Renault Tristan (2016b). A bacterial suspect implicated in *M. edulis* mortalities in France? AMMR2016 - 1st International Symposium on Advances in Marine Mussel Research. 26-27 October 2016, University of Vigo, Spain.
- Vassilenko, E., & Baldwin, S. A. (2014). Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific Coast of Southern British Columbia, Canada. *Journal of invertebrate pathology*, 117, 68-72.
- Vethaak, A. D., Hamers, T., Martínez-Gómez, C., Kamstra, J. H., de Weert, J., Leonards, P. E., & Smedes, F. (2017). Toxicity profiling of marine surface sediments: a case study using rapid screening bioassays of exhaustive total extracts, elutriates and passive sampler extracts. *Marine environmental research*, 124, 81-91.
- Vezzulli, L., Colwell, R.R., Pruzzo, C., 2013. Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol* 65, 817–825. doi:10.1007/s00248-012-0163-2

## 7. Annexes

Annexe 1 : Décrire les mortalités de moules observées en 2016 et préciser leur contexte environnemental, observation in situ

2.Objectif 1 : Description du phénomène dans les Pertuis et en Vendée

2.1. Dispositif et stratégie d'échantillonnage

Sites de l'étude MORBLEU-2016

Les coordonnées des sites suivis au cours de cette étude et instrumentés pour des mesures hydrologiques en haute fréquence sont présentées dans le Tableau 8

Tableau 8 : Coordonnées des stations de mesures à haute fréquence d'acquisition

Station	Lon E WGS84	Lat N WGS84
Filière W	-1.375467	46.273729
L'Eperon	-1.24376	46.263479
Boyard	-1.200971	45.978756
Maison Blanche	-2.204600	47.000411

## Annexe 2 : Caractérisation hydrologique et chimique de 3 stations de l'étude : substances dissoutes (nutriments, éléments trace métalliques, contaminants). Premiers éléments descriptifs

### **Contextualisation environnementale des mortalités, environnement abiotique. Suivi des contaminants chimiques hydrophiles dans l'eau par POCIS**

Les échantillonneurs passifs de contaminants de la colonne d'eau sont dispositifs particuliers appelés POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Ce sont des échantillonneurs passifs intégratifs utilisés pour le suivi des contaminants hydrophiles ( $1 < \log K_{ow} < 4$ ) comme les pesticides, les substances pharmaceutiques, les détergents, etc. Les POCIS permettent d'échantillonner la fraction dissoute de ces contaminants sur des périodes de temps de plusieurs semaines. Ce dispositif permet d'accéder après calculs à la concentration moyenne des contaminants ( $\text{ng.L}^{-1}.\text{J}^{-1}$ ) sur la durée totale de l'exposition.

#### **Données de la campagne d'évaluation de la contamination chimique de l'eau 2015 :**

En 2015, entre février et début juillet il a été réalisé 11 campagnes d'exposition des membranes en mer (14 jours d'immersion en moyenne) sur les 3 sites ateliers, Filière, Eperon et Boyard. A partir de ces échantillons 68 substances ont été recherchées, 20 sont détectées et quantifiables. Parmi celles-ci **13\* molécules sont systématiquement trouvées et quantifiables dans tous les échantillons quelques soit le site atelier et la période d'exposition** (voir Tableau 9).

#### **Données de la campagne d'évaluation de la contamination chimique de l'eau 2016 :**

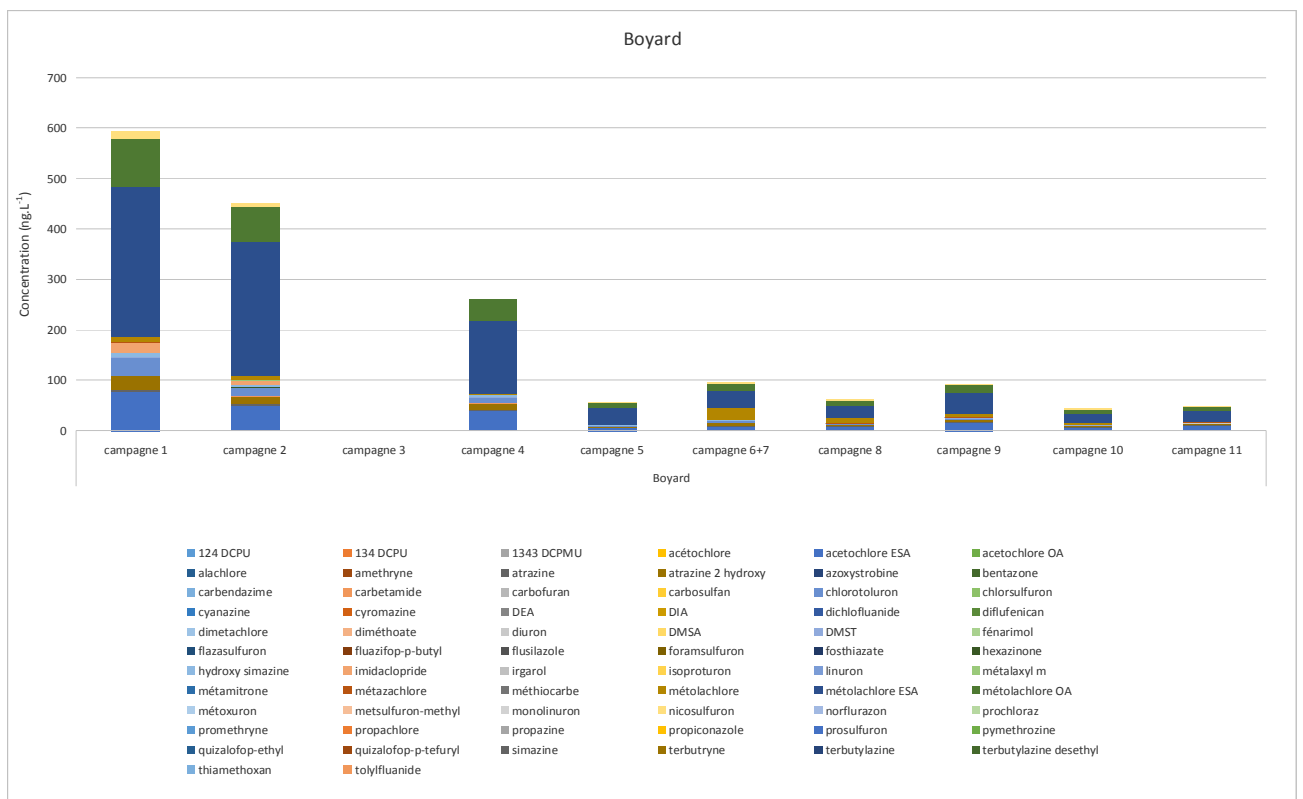
En 2016, entre février et début juillet il a été réalisé 7 campagnes d'exposition des membranes en mer (23 jours d'immersion en moyenne) sur les 3 sites ateliers, Filière, Eperon et Boyard. A partir de ces échantillons 68 substances ont été recherchées, une quarantaine sont détectées et quantifiables. Par rapport à 2015, cette augmentation du double du nombre de molécules détectées est liée semble t'il à une amélioration de la sensibilité de la méthode d'analyse par le laboratoire (LPTC –UMR EPOC Univ. Bordeaux1). Parmi les 40 substances détectées **17 molécules sont systématiquement trouvées et quantifiables dans tous les échantillons quelques soit le site atelier et la période d'exposition** (voir

*Tableau 9).*

Les données présentées ici correspondent à des périodes et des durées de campagnes différentes entre 2015 et 2016 et elles ne peuvent être comparées globalement compte tenu des forts effets saisonniers et de la différence d'échantillonnage (pertes de matériel pour certaines campagnes).

1. acétochlore ESA
2. atrazine
3. atrazine 2 hydroxy
4. chlorotoluron
5. DEA*
6. Diuron
7. DMSA*
8. DMST
9. hexazinone
10. hydroxy simazine
11. isoproturon*
12. metalaxyl m
13. métazachlore
14. métolachlore
15. métolachlore ESA
16. métolachlore OA
17. nicosulfuron*

Tableau 9 : Liste des 17 substances détectées systématiquement dans tous les échantillons en 2015 et 2016 (les substances 5, 7, 11 et 17 n'ont pas été systématiquement détectées dans les échantillons 2015)



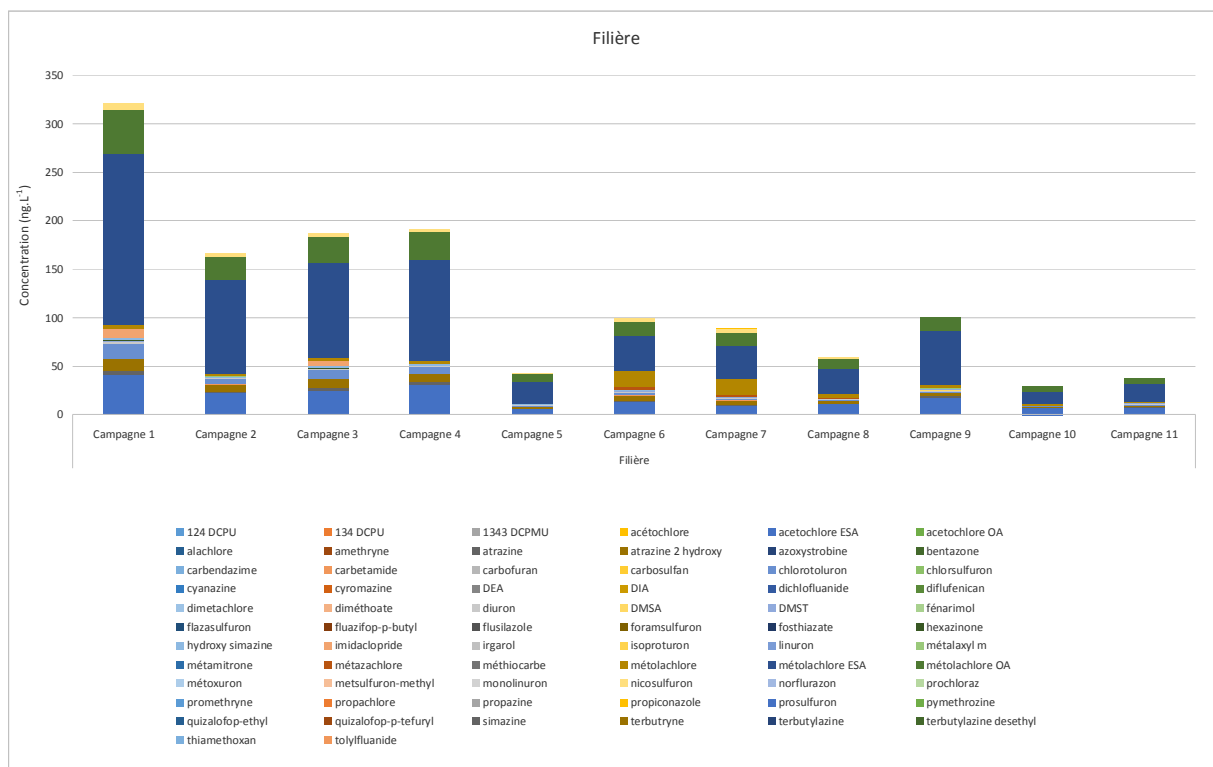
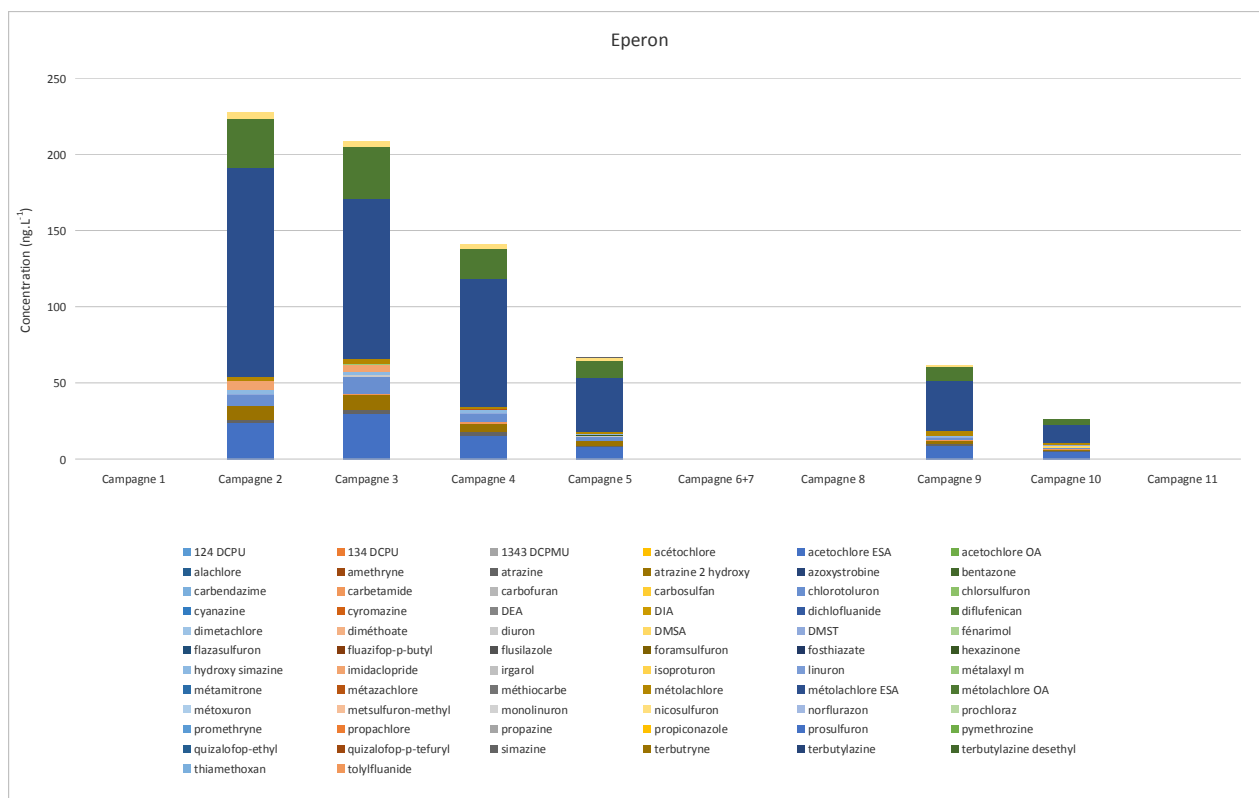


Figure 38 : Concentrations des molécules détectées sur membrane POCIS au cours des campagnes de l'année 2015 pour les trois sites ateliers Filière, Eperon et Boyard.

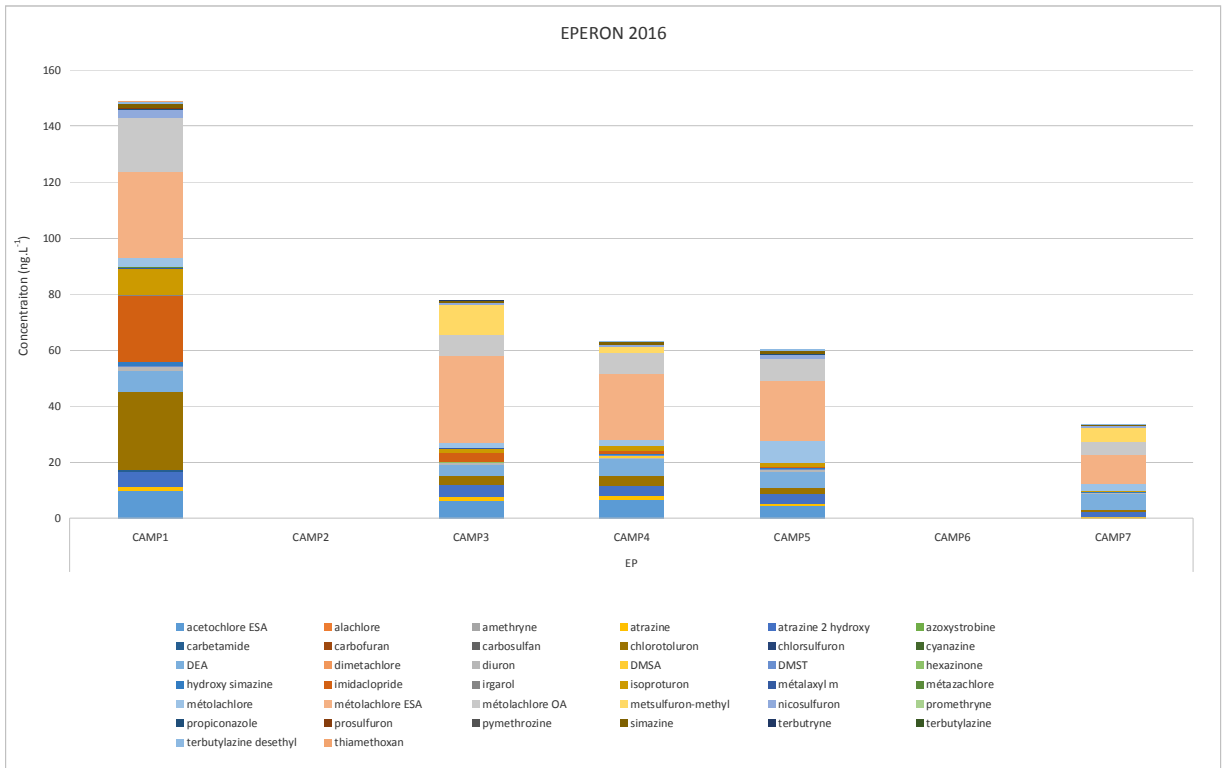
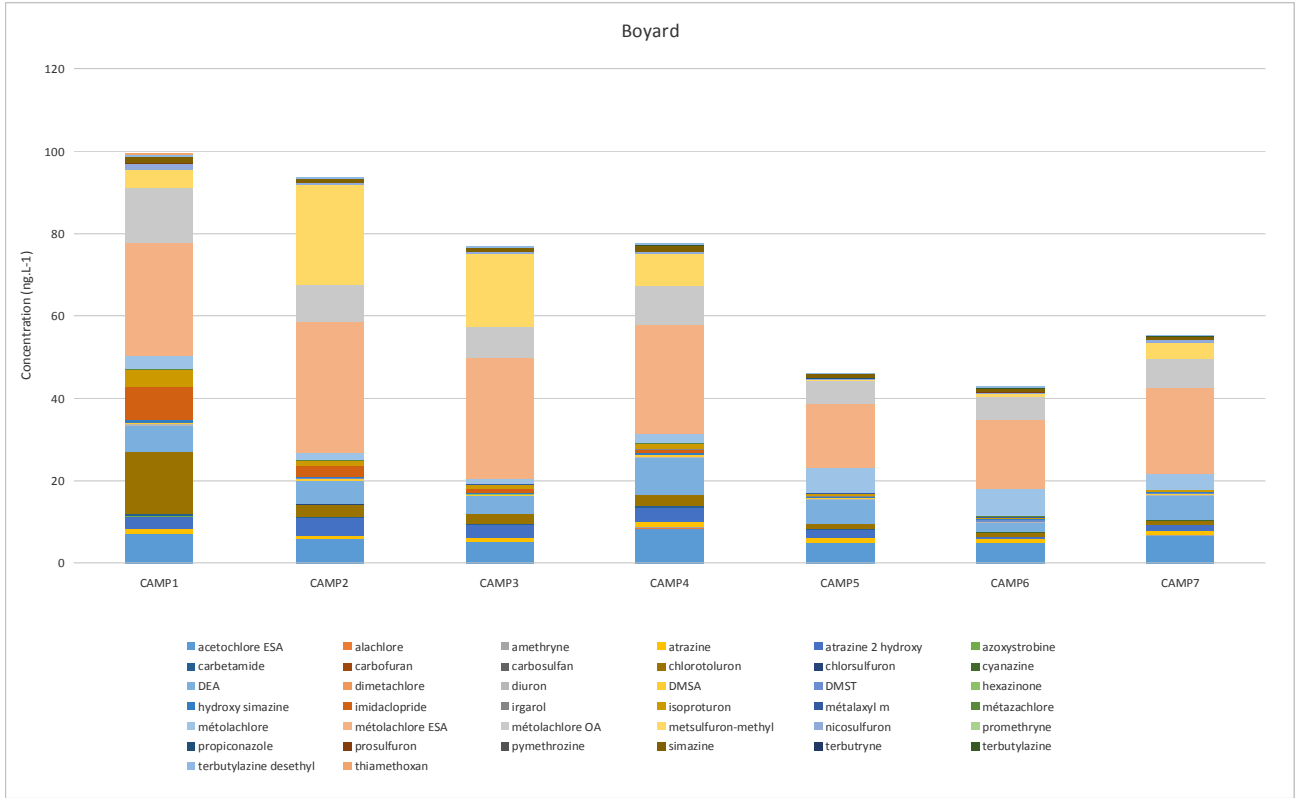




Figure 39 : Concentrations des molécules détectées sur membrane POCIS au cours des campagnes de l'année 2016 pour les trois sites ateliers Filière, Eperon et Boyard et pour le site Noirmoutier (Maison Blanche) en Vendée

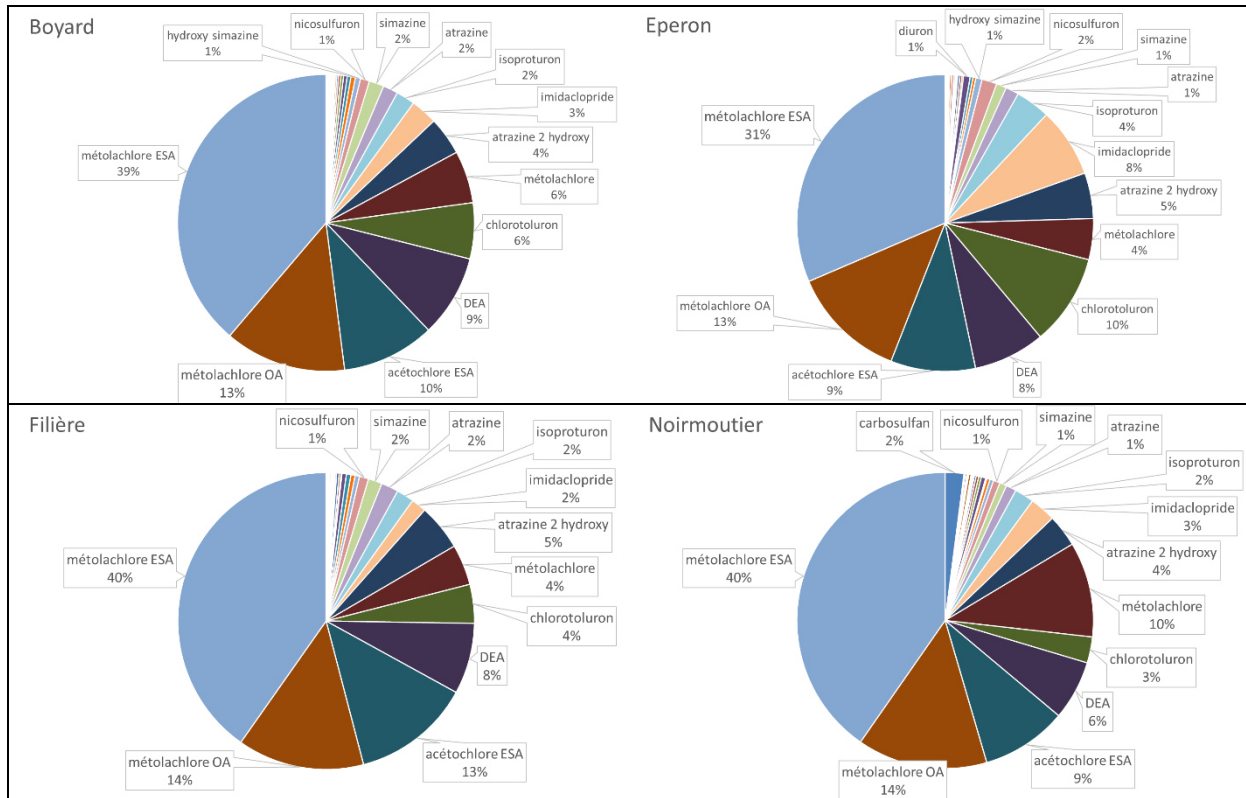


Figure 40 : Empreinte moyenne de contamination sur l'ensemble des sites échantillons de février à juillet 2016.

Les concentrations sur les différents sites entre le mois de février et le mois de juillet 2016 suivent le même profil de variation. Le suivi des concentrations laisse deviner un pic hivernal de pesticides lié au métolachlore et à ses métabolites qui a vraisemblablement lieu sur les mois de janvier et février. Le suivi suggère également un deuxième pic de contamination centré sur le mois de mai 2016 (campagne 4 ou 5 selon les sites). L'empreinte de contamination ne varie pas de façon significative dans le temps.



Tableau 10 : Liste des dates de campagnes d'exposition des membranes POCIS en 2015 et 2016.

Date de mise à l'eau	num. Campagne mer	Nbr. jours exposition (J)	Code sites
27 janvier 2015	CAMP1	13	FI-EP-BO
9 février 2015	CAMP2	17	FI-EP-BO
26 février 2015	CAMP3	18	FI-EP-BO
16 mars 2015	CAMP4	16	FI-EP-BO
1 avril 2015	CAMP5	12	FI-EP-BO
13 avril 2015	CAMP6	15	FI-EP-BO
28 avril 2015	CAMP7	13	FI-EP-BO
11 mai 2015	CAMP8	15	FI-EP-BO
26 mai 2015	CAMP9	16	FI-EP-BO
11 juin 2015	CAMP10	11	FI-EP-BO
22 juin 2015	CAMP11	15	FI-EP-BO
1 février 2016	CAMP1	29	FI-EP-BO
15 mars 2016	CAMP2	16	FI-EP-BO
30 mars 2016	CAMP3	19	FI-EP-BO
18 avril 2016	CAMP4	29	FI-EP-BO
17 mai 2016	CAMP5	27	FI-EP-BO
13 juin 2016	CAMP6	29	FI-EP-BO
11 juillet 2016	CAMP7	14	FI-EP-BO
26 janvier 2016	CAMP1	29	Noirmoutier
25 février 2016	CAMP2	29	Noirmoutier
25 mars 2016	CAMP3	31	Noirmoutier
25 avril 2016	CAMP4	30	Noirmoutier
25 mai 2016	CAMP5	27	Noirmoutier
21 juin 2016	CAMP6	31	Noirmoutier

### Annexe 3 : Premiers signalements de mortalités dans le pertuis Breton en février 2014 et apports des fleuves

La toute première déclaration de mortalités de moules a eu lieu le 5 février 2014, sur des moules « sauvages » captées sur des tables ostréicoles de la pointe de Groin (Fosse de Loix / île de Ré). Une représentation de la contribution des fleuves aux apports durant cette période, montre que d'autres secteurs géographiques, au Sud Ouest du Pertuis Breton et d'Antioche (Ars en Ré, Antioche, Les Saumonards) présentent des profils voisins de celui où se sont déclarées les mortalités (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**42). Durant cette période, la Dordogne et la Garonne représentent environ 70% des apports, et les quatre autres fleuves (Loire, Charente, Sèvre et Lay), le complément.

Une analyse de 20 stations pendant 24 mois, montre que seul le mois de février 2014 (mois d'émergence des 1eres mortalités anormales chez la moule) se caractérise par une aussi forte influence des apports des fleuves : Sèvre et Lay dans le nord du pertuis Breton, et Charente, Garonne et Dordogne dans le sud du Bassin de Marennes-Oléron.

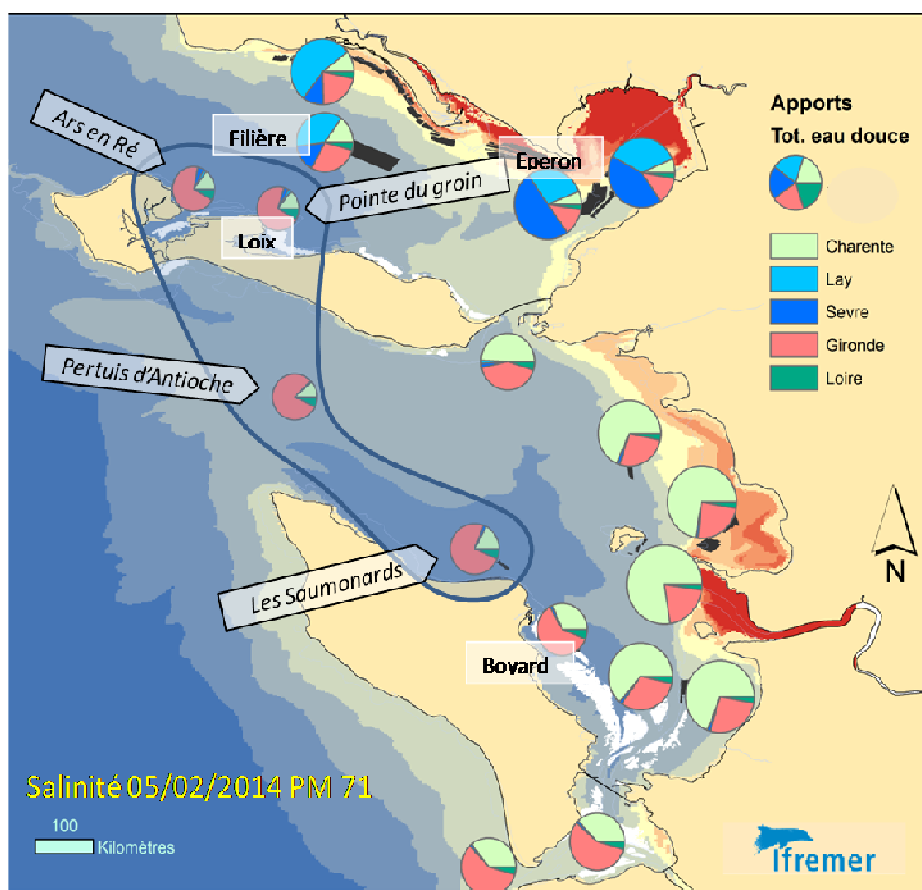


Figure 41 : Contribution des fleuves internes et externes aux pertuis charentais lors de l'émergence des mortalités de moules dans le pertuis Breton au cours de l'hiver 2014 (représentation pour février 2014). Le trait bleu représente un secteur homogène de contributions des fleuves aux apports.

## Annexe 4 : Quel lien établir entre la période de ponte dans le Pertuis Breton (Filières) et les premières mortalités ?

Tableau 11 : Liste des différents stades sexuels gonadiques chez la moules d'après Lubet, 1959.

Stades	Observations & classement
<b>0</b>	Repos sexuel. Pas de tissus gonadique, follicules vides. Tissu de réserves
<b>1</b>	Beaucoup de gonies, sexe encore difficilement identifiable. Tissus de réserves.
<b>2</b>	Identification du sexe possible et présence de toutes les cellules germinales. Vitellogenèse. Tissus de réserves.
<b>3 A1</b>	Majorité des gamètes mûrs. Présence de toutes les cellules germinales et diminution des tissus de réserve.
<b>3 A2</b>	Gamètes prêts à être pondus. Présence de toutes les cellules germinales et absence de tissus de réserve.
<b>3B</b>	Vidange par ponte +/- totale. Prédominance des cellules mûres. Pas de tissus de réserves sauf au stade 3B final.
<b>3C</b>	Il reste des cellules mûres et on observe une nouvelle génération de gonies. Réapparition de tissus de réserve.
<b>3D</b>	Emissions tardives. Les follicules ne contiennent que des restes de gamètes mûres. Réapparition de tissus de réserve.

## Annexe 5 : Quel lien établir entre l'état physiologique, le transcriptome des moules et les mortalités rencontrées ?

### Matériel biologique

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

Le Tableau 12 présente les pourcentages de mortalités cumulées enregistrés sur les différents sites et les lots d'animaux ici étudiés. Un suivi temporel sur le site de Filière a été privilégié, avec un point de comparaison pour le mois d'avril avec les sites contrastés d'Yves et de Loix en Ré.

Tableau 12 : Mortalités cumulées enregistrées sur les animaux déployés par MYTILOBS et utilisés ici pour l'étude transcriptomique (cases colorées en vert), lettre correspond au codage du lot pour l'analyse bioinformatique.

	déc-14	janv-15	févr-15	mars-15	avr-15	Mai-15	Juin-15
<b>Filière</b>	0%	1% (F)	1%	3% (A)	12% (B)	29% (E)	29%
<b>Loix en Ré</b>		1%	1%	11%	34% (C)	55%	55%
<b>Yves</b>	2%	2%	2%	2%	2% (D)	6%	6%

### Mise en poudre et extraction d'ARN totaux

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

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

### Séquençage RNA-seq

Les banques d'ADNc ont été fabriquées à partir de les ARN totaux de 24 échantillons. Ces échantillons d'ARN étaient conformes aux critères de pureté requis (A260 / A230 et A260 / A280 > 1,8) et le niveau de qualité (RNA Integrity Number RIN > 8) pour préparer une banque

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

### **Traitement des données de RNAseq**

Le traitement des données a été modifié par rapport à ce qui était envisagé en 2016. L'analyse des données a été réalisée en ligne de commande. Dans un premier temps il a été assemblé un méta-transcriptome *de novo* chez la moule bleue à partir des données disponibles dans les bases de données publiques et à partir des données issues de nos bibliothèques. Cette étape est nécessaire car actuellement il n'existe pas de génome ou de transcriptome de référence chez la moule bleue *M. edulis*. Il a été identifié un jeu de données disponible et pertinent (Romiguier *et al.* 2014). L'utilisation de Trinity *de novo* RNAseq permet de construire ce transcriptome *de novo*. La deuxième étape du traitement est d'aligner toutes les séquences des 24 bibliothèques sur le méta-transcriptome *de novo*, cet alignement permet de déterminer le niveau d'expression. Une analyse statistique Deseq2, (Love *et al.* 2015) permet d'obtenir les gènes significativement différentiellement exprimés entre deux conditions. Enfin une dernière étape est encore en cours d'analyse qui consiste à annoter le méta-transcriptome *de novo* afin d'obtenir la fonction biologique de chaque contigs.