

## Traitement à haute température des huîtres infectées par l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)

**TEMPO**

**- Rapport 2016 -**

**Coordination : Fabrice Pernet**

**Rédaction : Fabrice Pernet**

**Mars 2017**

**Convention DPMA 2016 16/1212569**



*Site ostréicole de la pointe du Château, Logonna-Daoulas, Rade de Brest*



# TEMPO

## Rapport scientifique TEMPO, convention DPMA- Ifremer 2016



## Préambule

Le naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* est touché chaque année depuis 2008 par des mortalités causées par un microvariant de l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1  $\mu$ Var). Plusieurs études montrent que ces événements de mortalité se produisent préférentiellement lorsque la température de l'eau est comprise entre 16°C et 24°C (Pernet et al. 2012; Petton et al. 2013; Renault et al. 2014). Au-delà de 24°C, il semble que le naissain ne subit pas de mortalité et l'ADN d'OsHV-1 n'est pas détecté. A 25°C la virulence d'OsHV-1 est inférieure à celle qui est mesurée à 16°C (Martenot et al. 2015). Par conséquent, une exposition rapide des huîtres infectées par le variant  $\mu$ Var à des températures supérieures à 24°C pourrait limiter les mortalités causées par le virus. Toutefois, le statut épidémiologique des survivants à l'infection et au traitement thermique doit être évalué. En effet, il faut savoir si ces huîtres qui ont été préalablement infectées par le virus sont porteuses d'OsHV-1 et il faut définir les modalités de réactivation du virus. D'autre part, ces huîtres peuvent demeurer sensibles à la maladie ou au contraire devenir résistantes, le système immunitaire ayant été stimulé par une exposition non-létale au virus. Ce projet fait suite au projet THERMARES (Convention DPMA 2013-Ifremer 2012/1/1210320/NYF) qui a mis en évidence que des traitements basses températures permettent de limiter les mortalités d'huîtres infectées par OsHV-1, mais que le virus persiste dans l'animal et peut être réactivé lorsque la température est supérieure à 16°C (Pernet et al. 2015).

Dans le cadre du projet TEMPO, il est proposé de (1) vérifier l'hypothèse selon laquelle l'exposition à haute température réduit la mortalité des huîtres infectées par OsHV-1, et (2) déterminer si les animaux qui ont survécu suite à l'infection et au traitement thermique sont sensibles/résistants à l'infection par le virus OsHV-1 et sains/porteurs lorsque la température est à nouveau favorable au développement d'une infection.

## 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> 08/03/2017 <b>nombre de pages :</b> 29 <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration(s) :</b> 9 figures <b>langue du rapport :</b> Français
<b>Validé par :</b> Elodie Fleury <b>Adresse électronique :</b> efleury@ifremer.fr		
<b>Titre du rapport :</b> Rapport scientifique TEMPO, convention DPMA-Ifremer 2016		
Contrat n°                      Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
<b>Auteur principal :</b> Fabrice PERNET  <b>Contributeurs :</b> Lizenn Delisle Bruno Petton Jean-François Burguin Benjamin Morga Charlotte Corporeau		<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins / Laboratoire de Physiologie des Invertébrés  Laboratoire des sciences de l'environnement marin UMR 6539 LEMAR  Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins
<b>Cadre de la recherche :</b> Action TEMPO – Convention DPMA-Ifremer 2016		
<b>Destinataire :</b>		DPMA-Ifremer

## Résumé

Le naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* est touché chaque année depuis 2008 par des mortalités causées par un microvariant de l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1  $\mu$ Var). Plusieurs études montrent que ces événements de mortalité se produisent préférentiellement lorsque la température de l'eau est comprise entre 16°C et 24°C. Par conséquent, une exposition rapide des huîtres infectées par OsHV-1 à des températures supérieures à 24°C pourrait limiter les mortalités causées par le virus. Il est proposé de (1) vérifier l'hypothèse selon laquelle l'exposition à haute température réduit la mortalité des huîtres infectées par OsHV-1, et (2) déterminer si les animaux qui ont survécu suite à l'infection par OsHV-1 et au traitement thermique sont sensibles/résistants à l'infection par OsHV-1 et sains/porteurs lorsque la température est à nouveau favorable au développement d'une infection exprimée. La survie des huîtres infectées par OsHV-1 à 29°C est nettement supérieure (81%) à celle des huîtres à 21°C (49%) et à 26°C (41%). Par ailleurs, les huîtres survivantes à une infection par OsHV-1 à 29°C ne semblent pas infectieuses, même lorsque la température devient permissive pour le virus (21°C). Enfin, lors d'une seconde exposition au virus en milieu naturel, les huîtres survivantes à une infection par OsHV-1 à 29°C présentent un risque de mortalité 2 fois supérieur à celui des huîtres infectées aux autres températures. Néanmoins, considérée sur l'ensemble de l'expérience, la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C est 1.5 fois supérieures (57%) à celles des huîtres exposées à OsHV-1 à 21°C et à 26°C (37%). Par conséquent, il y a un bénéfice à exposer les huîtres à OsHV-1 à 29°C plutôt qu'à 21°C ou à 26°C. Il restera à comprendre les fondements de cette interaction hôte-agent pathogène-température. La diminution du risque de mortalité à 29°C reste à élucider.

**Mots-clés:** Epidémiologie, Huître, OsHV-1, Risque, Survie, Température

**Key words:** Epidemiology, Oysters, OsHV-1, Risk, Survival, Temperature

# Sommaire

## Table des matières

<b>1</b>	<b><i>Introduction</i></b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b><i>Matériel et méthodes</i></b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Production de « naissains standardisés Ifremer » (NSI)</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Plan d'expérience</b> .....	<b>14</b>
2.2.1	Expérience 1. Effet de la température sur l'infection de l'huître par OsHV-1.....	14
2.2.2	Expérience 2 : Effet de la température sur le pouvoir infectieux d'OsHV-1 .....	15
<b>2.3</b>	<b>Paramètres suivis</b> .....	<b>17</b>
2.3.1	Survie.....	17
2.3.2	Détection d'ADN d'OsHV-1.....	17
<b>2.4</b>	<b>Statistiques</b> .....	<b>17</b>
2.4.1	Survie.....	17
2.4.2	Détection d'ADN d'OsHV-1.....	18
<b>3</b>	<b><i>Résultats</i></b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Expérience 1. Effet de la température sur la réponse de l'huître à l'infection .....	18
3.1.2	Expérience 2. Effet de la température sur le pouvoir infectieux d'OsHV-1 .....	25
<b>4</b>	<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b><i>Références</i></b> .....	<b>27</b>





---

## 1 Introduction

Les maladies infectieuses ont joué un rôle important tout au long de l'histoire de l'ostréiculture mondiale (MacKenzie and Clyde 1996; Gouletquer and Heral 1997; Nell 2001; Buestel et al. 2009; Troost 2010). Les mortalités estivales d'huîtres *C. gigas* ont été rapportées partout où cette espèce est cultivée : au Japon (Mori 1979), aux USA (Perdue et al. 1981; Cheney et al. 2000; Friedman et al. 2005) et en Europe de l'Ouest (France: Soletchnik et al. 2007; Germany: Watermann et al. 2008; Ireland: Malham et al. 2009).

Pendant l'été 2008, les mortalités d'huîtres âgées d'un an et moins se sont produites sur toutes les côtes françaises (Miossec et al. 2009; EFSA 2010). Ces mortalités ont été associées à l'infection des huîtres par un génotype nouvellement décrit ( $\mu$ Var) de l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Segarra *et al.* 2010). Depuis, ce virus a été détecté le long de la côte européenne, du Portugal à la Scandinavie (Dundon et al. 2011; Lynch et al. 2012; Peeler et al. 2012; Roque et al. 2012; Domeneghetti et al. 2014; Batista et al. 2015; EFSA 2015; Gittenberger et al. 2015; Morrissey et al. 2015; Mortensen et al. 2016), et des variants de ce virus ont été détectés en Australie (Jenkins et al. 2013; Paul-Pont et al. 2013), en Nouvelle-Zélande (Keeling *et al.* 2014) et en Asie (Hwang *et al.* 2013). Une relation causale entre le variant  $\mu$ Var et la mortalité des huîtres a été établie sur le plan épidémiologique (Schikorski et al. 2011; Bingham et al. 2013; EFSA 2015; Paul-Pont et al. 2015). Le virus OsHV-1 pose aujourd'hui un défi majeur pour la production de l'huître du Pacifique dans le monde entier.

Depuis 2009, dans la lagune de Thau, les mortalités d'huîtres creuses se sont systématiquement produites lorsque la température était comprise entre 17°C et 24°C, quels que soient l'âge des huîtres et la date de transfert (Pernet et al. 2012) (Figure 1). En laboratoire, OsHV-1 est transmis de façon optimale lorsque la température est comprise entre 16°C et 22°C (Figure 2). En dehors de cette fenêtre thermique, la transmission de la maladie et les mortalités d'huîtres qui en découlent étaient moindres, corroborant ainsi les observations faites en milieu naturel.

Par ailleurs, les huîtres préalablement infectées avec OsHV-1 et maintenues à 13°C pendant 40 jours, présente une absence de détection d'ADN viral dans les tissus, ne présentaient aucune mortalité, et ne transmettaient pas la maladie aux huîtres saines placées en cohabitation. Par conséquent, une exposition à 13°C pouvait offrir une voie de limitation des mortalités d'huîtres causées par OsHV-1. Pour tester cette hypothèse, l'effet de l'application de basses températures (10°C et 13°C) pendant des durées variables comprises entre 6 et 83 jours a été testé sur la survie du naissain d'huîtres préalablement infecté par une exposition en rade de Brest pendant 5 ou 8 jours, afin d'obtenir différents niveaux d'infection (Pernet et al. 2015) (convention DPMA 2013-Ifremer 2012/1/1210320/NYF).

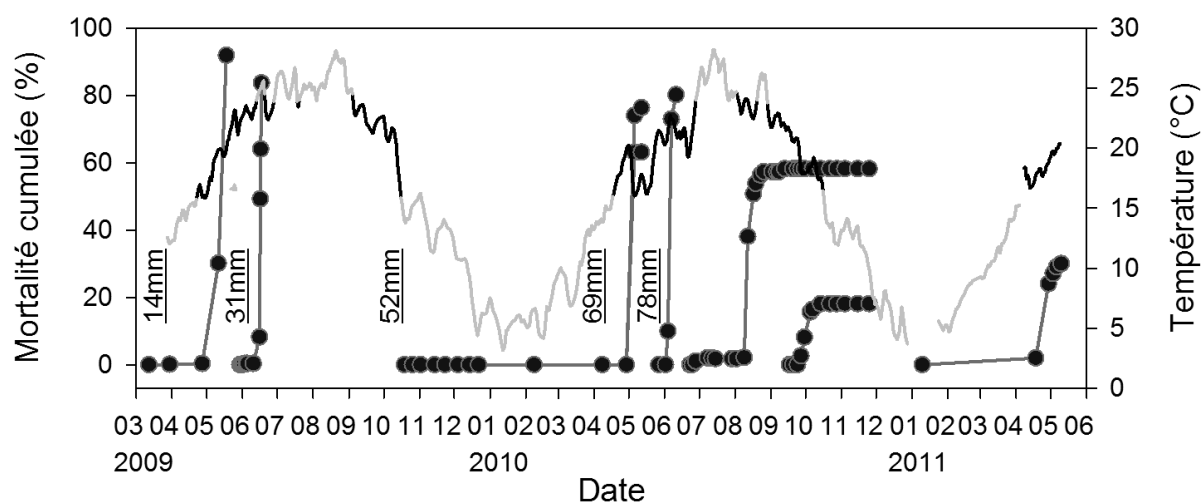


Figure 1. Mortalité cumulée (cercle, axe gauche) d'un lot d'huître dans la lagune de Thau en fonction des dates de transfert en relation avec la température de l'eau (axe à droite). La taille des coquilles au moment des transferts est indiquée sur la figure en mm. Les huîtres étaient âgées de 8 mois au premier transfert et de 30 mois au dernier transfert. La courbe de température en gris clair indique les valeurs  $<17^{\circ}\text{C}$  ou  $>24^{\circ}\text{C}$ , en noir les températures comprises entre  $17^{\circ}\text{C}$  et  $24^{\circ}\text{C}$  (Pernet et al. 2012).

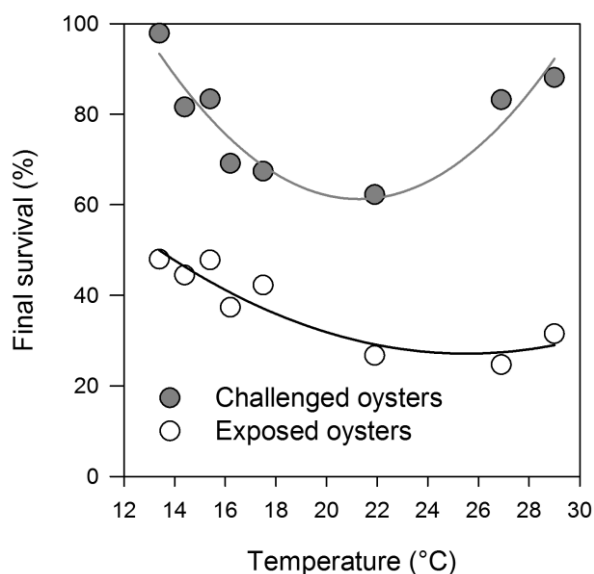


Figure 2. Survie finale du naissain d'huître exposé à OsHV-1  $\mu\text{var}$  sur le terrain (exposed oysters) et du naissain d'huître placé en cohabitation avec du naissain exposé à la maladie en milieu contrôlé (challenged oysters) en fonction de la température. La survie des huîtres exposées à la maladie est négativement corrélée avec la température, variant entre 48% et 25%. En revanche, la survie des huîtres placées en cohabitation (62 à 98%) avec les huîtres exposées diminue avec la température jusqu'à l'atteinte d'un plateau entre 16 et 22°C et augmente par la suite. OsHV-1 est transmis de façon optimale lorsque la température est entre 16°C et 22°C (Petton et al. 2013).

La survie moyenne des huîtres infectées par OsHV-1 était de 71% après 83 jours à basse température par rapport à seulement 23% chez les témoins maintenus à 21°C (Pernet et al. 2015) (Figure 3). Pendant l'exposition au froid, le niveau d'ADN viral dans les tissus d'huîtres a progressivement diminué jusqu'à devenir non détectable après 21 jours. Toutefois, lorsque ces huîtres acclimatées au froid ont été soudainement exposées à 21°C au laboratoire, elles ont présenté des mortalités importantes coïncidant avec la détection d'ADN d'OsHV-1 dans leurs tissus. OsHV-1 semble donc persister dans les huîtres, même à basse température, et le virus peut produire une infection exprimée après un choc thermique à 21°C. Globalement, les traitements à basses températures n'ont pas amélioré la survie des huîtres infectées par OsHV-1. Ces résultats suggèrent que les transferts d'huîtres infectées vers des zones d'élevage plus froides dans le but de limiter les pertes est une pratique qui ne ferait que retarder la mortalité (à moins que la température n'atteigne jamais 16°C).

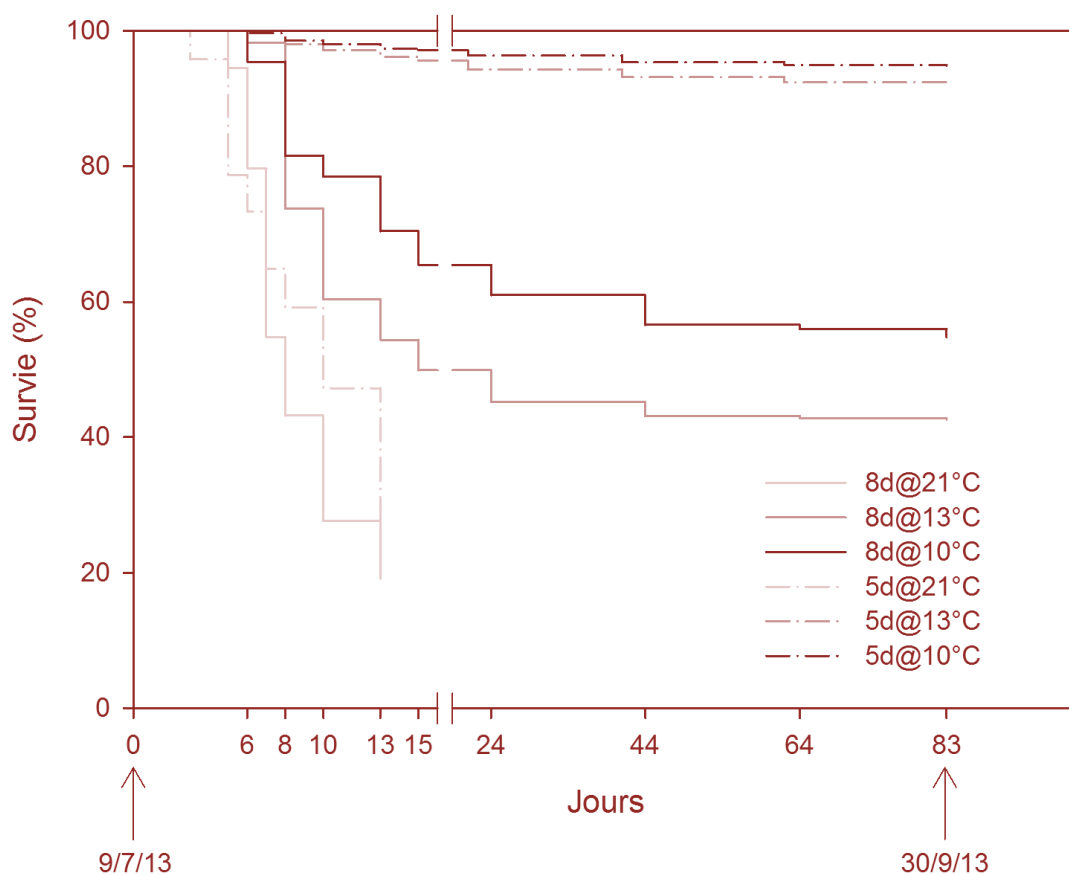


Figure 3. Survie des huîtres *Crassostrea gigas* en laboratoire à 21°C, 13°C et 10°C après exposition sur le terrain pendant 5 jours (en pointillé) ou 8 jours (ligne continue) dans une zone d'élevage où la mortalité causée par OsHV-1 était en cours. Le temps de survie a été mesuré en jours à partir du début du traitement thermique (Pernet et al. 2015).

Le fait que les mortalités d'huîtres causées par OsHV-1 se produisent préférentiellement lorsque la température de l'eau est supérieure à 16°C a été confirmé par la suite dans d'autres écosystèmes (Renault et al. 2014; Petton et al. 2015). En revanche, l'idée d'un seuil thermique « haut », au-delà duquel les effets du virus sur l'hôte sont moindres n'a pas été approfondi. Seule une étude montre que la virulence d'OsHV-1 est inférieure à 25°C comparée à 16°C (Martenot *et al.* 2015), ce qui pourrait expliquer que les huîtres meurent moins lorsque la température est supérieure à 24°C.

Dans le cadre du projet TEMPO, il est proposé de (1) vérifier l'hypothèse selon laquelle l'exposition à haute température (>24°C) réduit la mortalité des huîtres infectées par OsHV-1  $\mu$ Var, et (2) déterminer si les animaux qui ont survécu à l'infection et au traitement thermique sont sains/porteurs et sensibles/résistants lorsque la température est à nouveau favorable au développement d'une infection exprimée.

Cette étude devrait permettre d'envisager des actions de réduction des mortalités d'huîtres et d'agents infectieux qui pourront être mises en œuvre naturellement sur le terrain, en profitant des variations saisonnières de température ou artificiellement en milieu contrôlé.

Plusieurs études rapportent un fort potentiel de la mise en place de traitements thermiques dans la lutte contre les agents pathogènes en aquaculture. Par exemple la crevette *Litopenaeus vannamei* infectée par le White Spot Syndrome Virus (WSSV) puis exposée 12 h à 33°C présente seulement 20% de mortalité contre 100% chez les témoins à 26°C (Rahman et al. 2006).

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Production de « naissains standardisés Ifremer » (NSI)

Pour cette étude, deux lots d'huîtres ont été produits selon un protocole standardisé décrit par Petton et al. (2015). Les géniteurs utilisés pour la production de NSI étaient issus de captage naturel réalisé à Fouras en 2013. Cent individus ont été prélevés aléatoirement dans ce stock et ont été utilisés comme reproducteurs à la station Ifremer d'Argenton. Le conditionnement a eu lieu en bassins de 500 L, dans une eau à 17°C enrichie en phytoplancton (Petton et al. 2015). Après 5-6 semaines d'alimentation, les gamètes ont été obtenus par lacération des gonades. Les fécondations ont été réalisées le 23 août 2015 (08/15) et le 23 février 2016 (02/16). Le taux de fécondation a été supérieur à 90%. L'embryogenèse s'est déroulée en bassin cylindro-conique de 150 L à une température de 21°C pendant 48h. Les larves véligères ont été collectées sur une toile à plancton de 40µm, avant d'être transférées dans des tubes de 5 L en flux ouvert à 25°C. Après 15 jours, les larves compétentes ont été placées au contact de micro brisure pour se fixer. Les jeunes huîtres ont été transférées à la nurserie Ifremer de Bouin après 38 jours d'élevage (1<sup>er</sup> octobre 2015 et 1<sup>er</sup> avril 2016). Le 28 Avril 2016, les deux lots de NSI ont été transférés à Argenton pour réaliser l'expérience.

Les huîtres du lot 08/15 âgées de 8 mois ont été utilisées comme « donneuses » et « receveuses » alors que les huîtres du lot 02/16 âgées de 2 mois ½ ont été utilisées comme « receveuses » dans l'expérience 1B (voir Figure 4).

### 2.2 Plan d'expérience

#### 2.2.1 Expérience 1. Effet de la température sur l'infection de l'huître par OsHV-1

- Partie A: effets des traitements à haute température (26°C et 29°C) sur le développement de la maladie, sa transmission et le risque de mortalité associé (Figure 4).

Le lot 08/15 a été divisé en deux groupes, les animaux sources du virus, ci-après nommés « donneurs » et les animaux à infecter, ci-après nommés « receveurs ». Entre le 9 mai et le 19 mai 2016, 3000 donneurs ont été acclimatés à 21°C, 26°C ou 29°C dans trois bassins de 500 L et 3600 receveurs ont été acclimatés aux mêmes températures dans 15 bassins de 45 L (5 bassins par température). Le taux de filtration (volume de microalgues consommé par gramme d'huître par jour) a été mesuré quotidiennement dans chaque bassin. Le débit d'eau a été maintenu à 12 L h<sup>-1</sup> par bassin. Tout au long de cette période d'acclimatation, les huîtres n'ont pas présenté mortalité anormale et l'ADN d'OsHV-1 n'a pas été détecté.

Le 19 mai 2016 (jour 0), les huîtres donneuses ont été anesthésiées à 21°C, 26°C ou 29°C dans une solution de MgCl<sub>2</sub> jusqu'à l'ouverture des valves (Suquet et al. 2009). Une suspension virale contenant 6.9×10<sup>6</sup> copies d'OsHV-1 µVar a été injectée dans le muscle adducteur (100 µL) d'après le protocole publié par Schikorski et al., (2011), et les animaux sont restés ensemble pendant 5 h dans leurs bassins respectifs.

La suspension virale a été réalisée au LGPMM à partir de 10 animaux fortement infectés. Les branchies et le manteau de ces animaux ont été placés dans un tube stérile de 50 ml contenant 10 volumes de d'eau de mer artificielle (ASW, 9 mL g<sup>-1</sup> tissus). Les tissus ont été broyés sur glace en utilisant un mélangeur Ultraturax (3 × 5 s). Après centrifugation (1000 g, 5 min, 4 ° C), le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et dilué dans 4 volumes d'ASW. L'homogénat a été filtré dans des conditions stériles en utilisant des filtres à seringue à des tailles de pores de 5 µm, 2 µm, 0,45 µm et 0,22 µm (Millipore, Billerica, USA).

Puis, les huîtres donneuses (N=150 huîtres, 250 g) ont été réparties dans 3 bassins de 45 L par température (total de 9 bassins) en cohabitation avec des huîtres receveuses (non-injectées). Des huîtres témoins injectées avec 100 µL d'eau de mer stérile (EDM) ont été distribuées dans 2 bassins de 45 L par température (total de 6 bassins). Des huîtres receveuses dites « non-acclimatées » ont été ajoutées dans tous les bassins (N=150 huîtres,

250 g). Lorsque les donneurs ont été transférés dans les 15 bassins de 45 L, le volume d'eau a été réduit à 30 L et maintenu sans renouvellement pendant 12 heures. Les huîtres mortes (donneuses et receveuses) ont été retirées des bassins après 48 h de cohabitation. Ce protocole est adapté de Morga et al. (en préparation).

La survie des huîtres receveuses (acclimatées et non-acclimatées) a été suivie tous les jours pendant 14 jours. Les huîtres receveuses acclimatées et non-acclimatées ont été prélevées dans chaque bassin (N=15 individus par bassin et par condition) 12, 24, 48 et 96 heures après le début de la cohabitation avec les animaux donneurs. Les tissus de 9 individus ont été disséqués, rassemblés, et congelés instantanément dans l'azote liquide avant d'être réduits en poudre avec un homogénéisateur MM400 (Retsch) et aliquotés pour les analyses en pathologie.

- Partie B: effet des traitements à haute température sur la persistance d'OsHV-1 dans les huîtres survivantes.

Le 2 juin 2016, après 14 jours de cohabitation avec les huîtres donneuses (injectées avec OsHV-1 ou témoin EDM), tous les bassins de 45 L ont été vidés, nettoyés et remplis avec de l'eau de mer à 21°C. Les huîtres donneuses ont été éliminées, et les huîtres receveuses survivantes ont été maintenues dans leur bassin à 21°C (Figure 4). De nouvelles huîtres naïves (N=60 individus 02/16) ont été ajoutées dans chaque bassin. La survie des huîtres receveuses (08/15) et naïves (02/16) a été suivie tous les jours pendant 11 jours. La présence de mortalité chez les huîtres receveuses ou chez les huîtres naïves indiquerait une réactivation du virus chez les receveuses et sa transmission aux naïves lorsque la température devient permissive (21°C). Pendant cette phase, les huîtres ont été alimentées *ad libitum* et le débit d'eau a été maintenu à 12 L h<sup>-1</sup> dans chaque bassin.

- Partie C: effet des traitements à haute température sur la tolérance ou la résistance à une infection en milieu naturel.

Le 13 juin 2016, les huîtres 02/16 survivantes ont été transférées sur un site d'élevage situé dans la Rade de Brest à la Pointe du Château (48°20'06.190'' N, 4°19'06.370'' W), où des épisodes de mortalité du naissain étaient en cours (suivis ECOSCOPIA et RESCOII 2016). La survie de ces huîtres a été suivie pendant 75 jours (Figure 4).

### 2.2.2 Expérience 2 : Effet de la température sur le pouvoir infectieux d'OsHV-1

Le 19 mai 2016 (jour 0), une suspension virale contenant  $6.9 \times 10^6$  copies d'OsHV-1  $\mu$ Var a été incubée à 21°C, 26°C et 29°C pendant 4 heures avant d'être injectée dans le muscle adducteur (100  $\mu$ L) des huîtres maintenues à 21°C. Ces animaux sont restés pendant 5 h à 21°C dans trois bassins distincts en fonction de la température d'incubation du virus. Puis, les huîtres donneuses (N=150 huîtres, 250 g) ont été réparties dans 3 bassins de 45 L par température d'incubation du virus (total de 9 bassins) en cohabitation avec des huîtres receveuses (non-injectées). Des huîtres témoins injectées avec 100  $\mu$ L d'eau de mer stérile (EDM) également incubés à 21°C, 26°C et 29°C ont été distribués dans 2 bassins de 45 L par température (total de 6 bassins). Les bassins contenant les huîtres injectées avec la suspension virale incubée à 21°C sont communs à l'expérience 1 et à l'expérience 2.

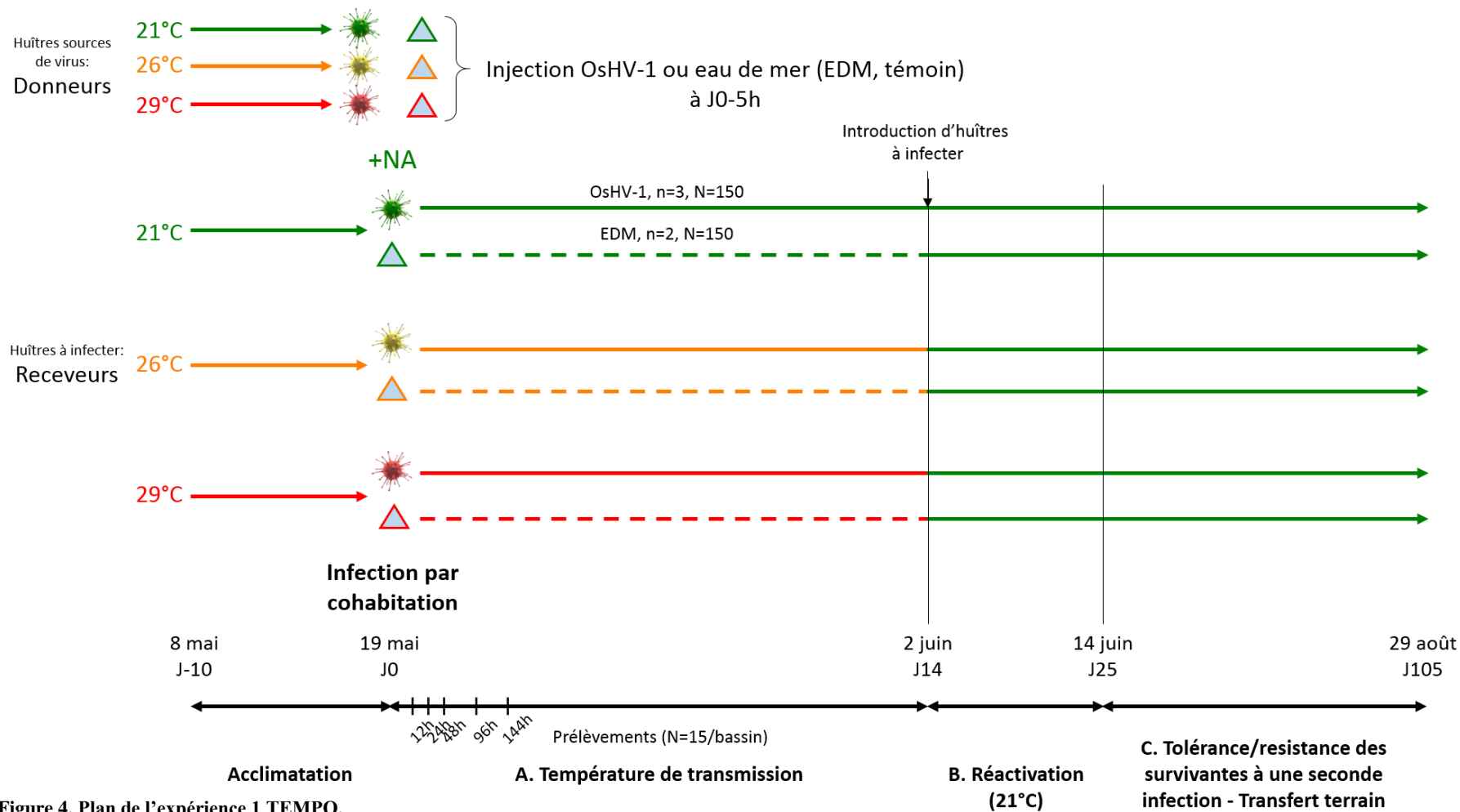


Figure 4. Plan de l'expérience 1 TEMPO.



---

## 2.3 Paramètres suivis

### 2.3.1 Survie

Les huîtres mortes, vivantes et prélevées ont été dénombrées afin d'évaluer la survie à chaque phase de l'expérience 1 et pendant l'expérience 2. Les huîtres mortes ont été retirées à chaque dénombrement.

### 2.3.2 Détection d'ADN d'OsHV-1

Les analyses de détection d'ADN viral appartenant à OsHV-1 ont été réalisées sur des échantillons d'huîtres entières (groupe de 9 individus par bassin). Les prélèvements ont été effectués pendant les expériences 1 et 2 à 0, 12, 24, 48 et 96 h post-cohabitation. Les échantillons de poudres d'huître ont été envoyés au laboratoire départemental vétérinaire de l'Hérault pour analyses en PCR en temps réel. La méthode analytique utilisée est basée sur une technique publiée (Pepin et al. 2008). Elle consiste en une amplification en temps réel basée sur la chimie SYBR green et l'utilisation du couple d'amorces DP-F/DP-R ciblant le gène de l'ADN polymérase d'OsHV-1. Cette approche fournit directement une donnée qualitative et quantitative, dans les limites de détection de la méthode. En cas de détection d'ADN d'OsHV-1, une quantification du nombre de copies d'ADN génomique peut être mesurée et associée. Elle renseigne sur l'implication ou non de l'agent infectieux en cas de mortalité. Une quantité d'ADN d'OsHV-1 supérieure à  $10^4$  copies  $\text{mg}^{-1}$  de tissu frais indique la réplication active du virus dans l'hôte et témoigne de son action dans le processus morbide.

## 2.4 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.4 (SAS Institute).

### 2.4.1 Survie

Les fonctions de survie ont été calculées selon Kaplan & Meier (1958). Le temps de survie a été mesuré en heures (expériences 1A, B et 2) ou en jours (expérience 1C) à partir du début de chaque phase de l'expérience. Les données ont été lues comme le nombre d'animaux morts dans chaque bassin à chaque dénombrement. Les courbes de survie des huîtres exposées ont été tracées et comparées entre les traitements thermiques.

Dans les expériences 1A et 1C, les courbes de survie des huîtres receveuses ont été comparées en utilisant le modèle de régression de Cox (1972) après avoir ajusté l'effet de la température [21°C, 26°C, 29°C] et de l'acclimatation [acclimaté vs non-acclimaté] (1A) et de la température [21°C, 26°C, 29°C] et de l'infection [OsHV-1 vs témoin EDM] (1C).

Dans l'expérience 1A (3 températures  $\times$  2 acclimations), la survie des huîtres témoins (les receveurs qui cohabitent avec les donneurs injectés avec de l'eau de mer stérile) n'a pas été incluse dans les modèles statistiques car elle était toujours supérieure à 95%. L'hypothèse de proportionnalité des risques (PH) a été vérifiée avec des résidus de martingale (Lin et al. 1993). Compte tenu du fait que l'hypothèse du PH n'était pas respectée, des covariables dépendantes du temps représentant l'interaction des covariables initiales et du temps ont été ajoutées au modèle. Le temps (t) était défini comme dichotomique:  $t \leq 120$  h ou  $t > 120$  d. Les rapports de risques personnalisés ont été produits au moyen de contrastes exponentiels.

Dans l'expérience 1C (3 températures  $\times$  2 infections), l'hypothèse du PH n'était pas respectée. Aussi, un premier modèle de régression de Cox a été ajusté sur l'effet de l'infection seul (OsHV-1 vs témoin EDM), toutes températures confondues. Dans un second temps, des

modèles de régression de Cox ont été ajustés sur l'effet de la température sur les huîtres en cohabitation avec les animaux infectés avec OsHV-1 d'une part et les animaux témoins d'autre part.

#### 2.4.2 Détection d'ADN d'OsHV-1

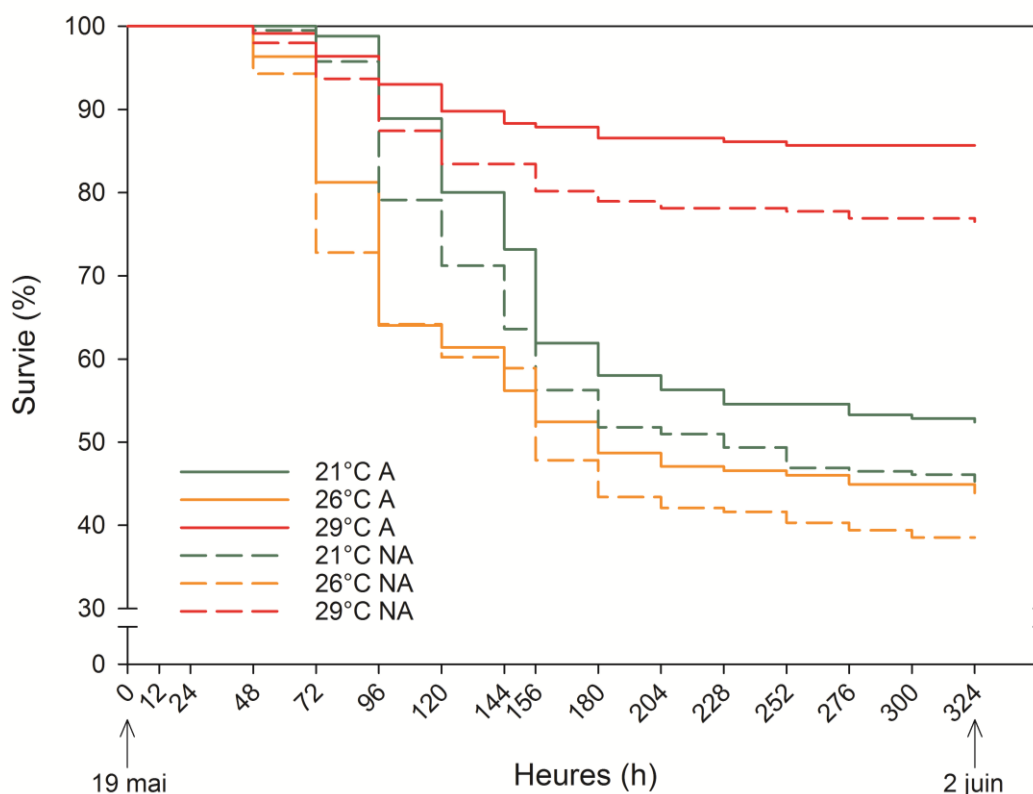
Un modèle mixte d'ANOVA a été effectué pour évaluer les différences dans les niveaux d'ADN de l'OsHV-1 dans les huîtres receveuses en cohabitation avec les huîtres infectées par OsHV-1, en fonction de la température (3 niveaux, parcelle principale), de l'acclimatation (2 niveaux, sous-parcelle) et du temps (4 niveaux, sous sous-parcelle) (expérience 1A).

### 3 Résultats

#### 3.1.1 Expérience 1. Effet de la température sur la réponse de l'huître à l'infection

- Partie A: effets des traitements à haute température (26°C et 29°C) sur le développement de la maladie, sa transmission et le risque de mortalité associé.

La survie des huîtres témoins (huîtres receveuses vivant en cohabitation avec des huîtres injectées avec de l'eau de mer stérile) était de 100% tout au long de l'expérience, indépendamment de la température et de l'acclimatation. Par conséquent, seules les huîtres receveuses ayant cohabité avec des huîtres infectées ont été considérées dans les analyses de survie suivantes.



**Figure 5.** Survie des huîtres *Crassostrea gigas* placées en cohabitation avec des huîtres infectées par OsHV-1 à 3 températures avec (A) ou sans acclimatation (NA) préalable. Le temps de survie a été mesuré en heures après le début de la cohabitation avec les huîtres infectées.

Les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les huîtres donneuses infectées ont présenté des mortalités dès 72 h à 26°C (survie de 81% et 72% chez les animaux acclimatés et non-acclimatés). A 21°C, il faut attendre 120h pour atteindre un niveau de mortalité similaire à celui

observé à 26°C. A la fin de la première phase de l'expérience, la survie des huîtres à 29°C est supérieure à celle obtenue à 21°C, elle-même supérieure à celle associée à 26°C, avec ou sans acclimatation préalable (survie 29°C > 21°C > 26°C). En moyenne, la survie finale des huîtres maintenues à 29°C était de 81% contre 49% et 41% à 21°C et à 26°C respectivement (Figure 5). La survie des huîtres non-acclimatés est de 5 à 9% inférieure à celle des animaux acclimatés (Figure 5).

Le modèle de Cox indique que le risque de mortalité varie en fonction de l'interaction de la température et de l'acclimatation (Table 1), suggérant que la température agit différemment sur le risque de mortalité selon l'acclimatation. Néanmoins, bien que pour les huîtres non-acclimatées les risques de mortalités observées à 21°C et à 29°C n'étaient pas significativement différents, le risque de mortalité à 29°C était 1.6 à 4.8 fois inférieur aux risques observés à 21°C et 26°C (Table 1). Le risque de mortalité était le plus élevé à 26°C : plus de 2 fois supérieur à celui observé à 21°C et 3.1 à 4.8 fois supérieurs à celui observé à 29°C (Table 1).

Par ailleurs, ce modèle indique que le risque de mortalité varie en fonction de l'interaction de la température et du temps (Table 1). Autrement dit, l'effet de la température sur le risque de mortalité n'était pas le même au cours de l'expérience. Entre 0 et 120h, le risque de mortalité était conforme à la description précédente (26°C > 21°C > 29°C), alors que pendant le second intervalle de temps (>120h), le risque de mortalité à 21°C était similaire à celui observé à 26°C (26°C = 21°C > 29°C), traduisant le retard des mortalités observé à 21°C.

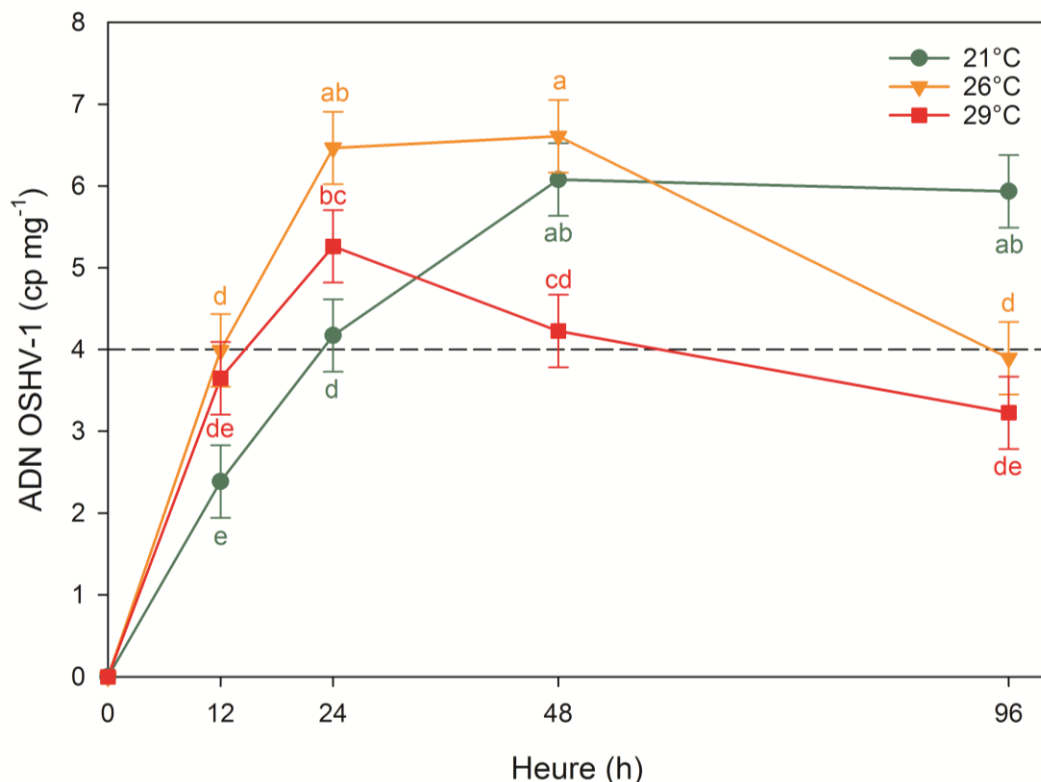
**Table 1. Risque de mortalité (odds ratio) des huîtres en fonction de la température, de l'acclimatation, et du temps (0-120h et 120h et plus). Des rapports de risques personnalisés ont été produits avec des contrastes exponentiels. Le tableau contient également l'erreur-type (SE) de l'estimation du rapport de risque et l'intervalle de confiance (IC) du ratio de risque, la statistique de Wald  $\chi^2$  et la valeur *P* résultante. Les valeurs de *P* significatives sont en gras (*P* < 0.05).**

Sources de variation	Contrastes	dl	$\chi^2$	<i>P</i>	Odds ratio	SE	IC (95%)	
Température, T°C		2	103.9	<b>&lt;0.001</b>				
Acclimatation		1	17.8	<b>&lt;0.001</b>				
T°C × Acclimatation		2	19.6	<b>&lt;0.001</b>				
	Acclimaté							
	21°C vs 26°C	1	75.2	<b>&lt;0.001</b>	0.44	0.04	0.37	0.53
	21°C vs 29°C	1	32.0	<b>&lt;0.001</b>	2.13	0.28	1.64	2.77
	26°C vs 29°C	1	127.0	<b>&lt;0.001</b>	4.82	0.67	3.66	6.33
	Non-acclimaté							
	21°C vs 26°C	1	8.5	<b>0.004</b>	0.53	0.12	0.34	0.81
	21°C vs 29°C	1	3.5	0.061	1.64	0.43	0.98	2.75
	26°C vs 29°C	1	43.8	<b>&lt;0.001</b>	3.11	0.53	2.22	4.35
Temps × T°C		2	60.1	<b>&lt;0.001</b>				
	[0-120h]							
	21°C vs 26°C	1	30.9	<b>&lt;0.001</b>	0.48	0.06	0.37	0.62
	21°C vs 29°C	1	11.4	<b>0.001</b>	1.87	0.35	1.30	2.69
	26°C vs 29°C	1	83.9	<b>&lt;0.001</b>	3.87	0.57	2.90	5.17
	[120h-324h]							
	21°C vs 26°C	1	2.1	0.144	1.17	0.12	0.95	1.43
	21°C vs 29°C	1	103.3	<b>&lt;0.001</b>	7.06	1.36	4.84	10.29
	26°C vs 29°C	1	73.3	<b>&lt;0.001</b>	6.06	1.27	4.01	9.15

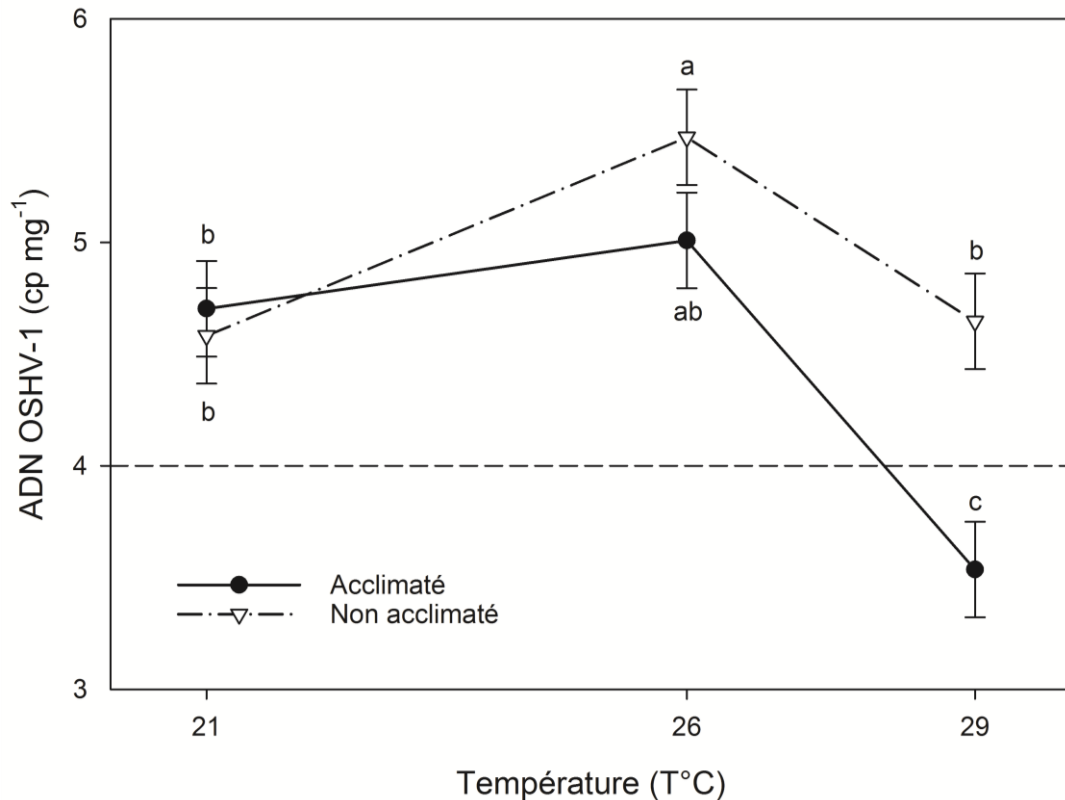
- Le risque de mortalité des huîtres receveuses placées en cohabitation avec des huîtres infectées par OsHV-1 est  $26^{\circ}\text{C} > 21^{\circ}\text{C} > 29^{\circ}\text{C}$ , avec ou sans acclimatation préalable.
- L'acclimatation préalable des huîtres aux conditions environnementales a un effet bénéfique sur la survie lorsqu'elles sont placées au contact d'huîtres infectées par le virus OsHV-1.

**Table 2. Résultats de l'analyse de variance ANOVA sur l'effet de la température (21°C, 26°C et 29°C), de l'acclimatation (acclimatée, non acclimatée) et du temps (12, 24, 48 et 96h) et leurs interactions mutuelles sur la quantité d'ADN d'OsHV-1 dans les tissus d'huîtres. Les données étaient log (x+1) transformées. Les valeurs p significatives ( $P < 0,05$ ) sont en gras.**

Sources de variation	dl	F	P
<b>Parcelle principale : température (T°C)</b>			
T°C	2	9.9	<b>0.013</b>
<i>Erreur A: bassin(T°C)</i>	6		
<b>Sous-parcelle : acclimatation</b>			
Acclim	1	14.2	<b>0.009</b>
T°C × Acclim	2	7.7	<b>0.022</b>
<i>Erreur B: Acclim × bassin(T°C)</i>	6		
<b>Sous sous-parcelle : Temps</b>			
Temps	3	14.7	<b>&lt;0.001</b>
T°C × Temps	6	6.5	<b>&lt;0.001</b>
Acclim × Temps	3	0.7	0.569
T°C × Acclim × Temps	6	0.2	0.962
<i>Erreur C: Temps × bassin (T°C) + Acclim × Temps × Bassin(T°C)</i>	36		



**Figure 6. Quantification de l'ADN d'OsHV-1, exprimée en nombre de copies d'ADN par mg de poids frais, dans les huîtres receveuses à 21°C, 26°C et 29°C, placées en cohabitation avec des huîtres donneuses injectées avec une suspension d'OsHV-1. Les données sont log (x+1) transformées et sont les moyennes des individus acclimatés et non-acclimatés. Les lettres différentes indiquent des différences significatives.**



**Figure 7. Quantification de l'ADN d'OsHV-1, exprimée en nombre de copies d'ADN par mg de poids frais, dans les huîtres receveuses à 21°C, 26°C et 29°C avec ou sans acclimatation préalable, placées en cohabitation avec des huîtres donneuses injectées avec une suspension d'OsHV-1. Les données sont  $\log(x+1)$  transformées et sont les moyennes de tous les temps de mesure. Les lettres différentes indiquent des différences significatives.**

Au début de l'expérience, l'ADN d'OsHV-1 n'a pas été détecté dans les huîtres acclimatées aux trois températures. Les quantités d'ADN d'OsHV-1 ont été influencées par les interactions (1) de la température et du temps et (2) de la température et de l'acclimatation (Table 2).

Vingt-quatre heures après la mise en cohabitation avec les huîtres donneuses injectées avec la suspension virale, les quantités d'ADN d'OsHV-1 ont augmenté dans les huîtres receveuses jusqu'à atteindre plus de  $10^4$  cp mg<sup>-1</sup> (Figure 6). A 26°C, le taux d'augmentation de la quantité d'ADN d'OsHV-1 était similaire à celui observé à 29°C ( $3.4 \times 10^6$  vs  $4.0 \times 10^5$  cp mg<sup>-1</sup> respectivement) et supérieur à celui observé à 21°C ( $3.7 \times 10^4$  cp mg<sup>-1</sup>). Entre 24 et 48h, la quantité d'ADN d'OsHV-1 a été constante à 26°C ( $5.1 \times 10^6$  cp mg<sup>-1</sup>), en augmentation à 21°C, et en baisse (non-significative) à 29°C. Ainsi, après 48h de cohabitation, les quantités d'ADN d'OsHV-1 dans les huîtres receveuses étaient 26°C = 21°C > 29°C. Enfin, entre 48h et 96h, les quantités d'ADN d'OsHV-1 ont diminué à 26°C et à 29°C pour atteindre des valeurs proches de  $10^4$  cp mg<sup>-1</sup>, et sont maintenues constantes à 21°C. Ainsi, après 96h de cohabitation avec des huîtres infectées par OsHV-1, les quantités d'ADN viraux dans les huîtres receveuses étaient 21°C > 26°C = 29°C (Figure 6).

L'acclimatation a interagi avec la température sur les quantités d'ADN d'OsHV-1 mesurées dans les tissus des huîtres receveuses placées en cohabitation avec des huîtres infectées par le virus (Figure 7). En effet, à 21°C et à 26°C, l'acclimatation préalable des huîtres à la température n'a pas eu d'effet sur les quantités d'ADN viraux détectées dans les huîtres receveuses. En revanche, à 29°C, l'acclimatation préalable a permis de réduire de manière importante et significative les quantités d'ADN d'OsHV-1 détectées dans les huîtres.

Les quantités d'ADN d'OsHV-1 dans les huîtres receveuses sont liées à la température et à l'acclimatation et sont corrélées avec le risque de mortalité :

- le risque de mortalité est le plus faible à 29°C et cela coïncide avec des quantités d'ADN d'OsHV-1 moindres comparées à 26°C et à 21°C,
- le risque de mortalité est le plus fort à 26°C lorsque les quantités d'ADN d'OsHV-1 sont les plus élevées,
- les dynamiques de mortalités et les quantités d'ADN d'OsHV-1 à 21°C sont similaires à celles observées à 26°C avec un décalage temporel de 24-48h,
- l'acclimatation préalable réduit le risque de mortalité à 29°C et les quantités d'ADN d'OsHV-1 dans les huîtres.

- Partie B: effet des traitements à haute température sur la persistance d'OsHV-1 dans les huîtres survivantes.

Le 2 juin 2016, après 14 jours de cohabitation avec les huîtres donneuses (injectées avec OsHV-1 ou témoin EDM), les huîtres receveuses survivantes ont été maintenues à 21°C, une température permissive pour le virus OsHV-1, et de nouvelles huîtres à infecter ont été ajoutées dans chaque bassin. La survie des huîtres receveuses et naïves après 11 jours était de 100% aux trois températures.

Les huîtres receveuses survivantes à une infection à 29°C et les huîtres naïves placées en cohabitation n'ont pas présenté de mortalité à 21°C, ce qui suggère que:

- il n'y a pas de développement d'une infection exprimée chez les huîtres receveuses survivantes au point de générer des mortalités,
- il n'y a pas de transmission du virus des huîtres receveuses survivantes aux huîtres naïves, ou, si cette transmission a eu lieu, alors elle ne s'est pas traduite par une infection exprimée associée à des mortalités.

- Partie C: effet des traitements à haute température sur la tolérance ou la résistance à une infection en milieu naturel.

Le 13 juin 2016, les huîtres 02/16 qui ont survécu aux phases 1A et 1B ont été transférées sur un site d'élevage situé dans la Rade de Brest à la Pointe du Château, où des épisodes de mortalité du naissain causé par OsHV-1 étaient en cours. La survie de ces huîtres a été suivie pendant 75 jours (Figure 8).

Les huîtres receveuses qui avaient été en contact avec OsHV-1 et qui avaient subi des mortalités importantes ont mieux survécu (80.3%) que les huîtres receveuses qui avaient été placées au contact des huîtres témoins et qui n'avaient pas subi de mortalité préalable (47.7%, Figure 8). En effet, le risque de mortalité des huîtres non exposées à OsHV-1 était 3.3 fois celui des huîtres receveuses préalablement exposées au virus (Table 3). Ces différences de survie peuvent s'expliquer par la sélection d'animaux plus résistants lors de

l'épisode de mortalité qui a touché les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les huîtres infectées par OsHV-1 pendant la phase 1A.

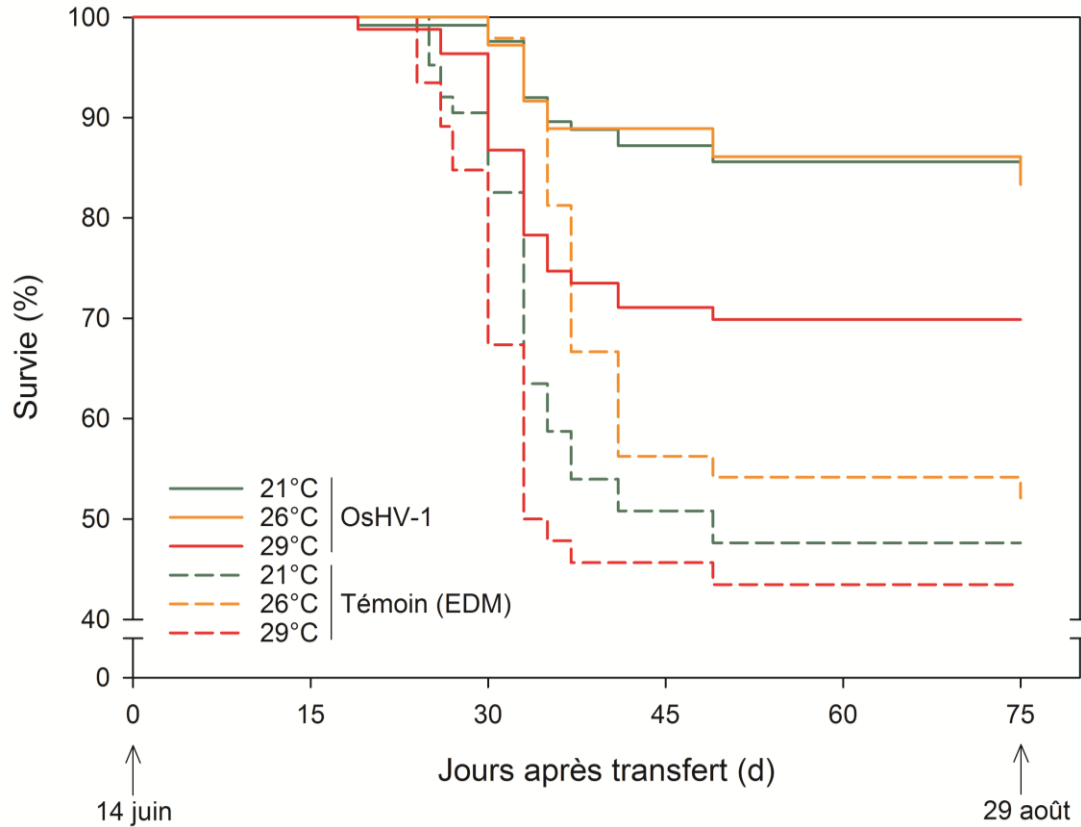


Figure 8. Survie des huîtres receveuses après le transfert en milieu naturel à la Pointe du Château en Rade de Brest où des mortalités d'huîtres causées par OsHV-1 étaient en cours. Ces huîtres avaient été en cohabitation 14 jours avec des huîtres injectées avec (i) une suspension virale d'OsHV-1 ou (ii) de l'eau de mer artificielle (témoin EDM) à 21°C, 26°C ou 29°C (Expt 1A) et par la suite exposées pendant 11 jours à 21°C, une température permissive pour la réplique virale (Expt 1B).

Table 3. Risque de mortalité (odds ratio) des huîtres en fonction de l'infection (toutes températures confondues) et de la température (T°C) en fonction de l'infection (OsHV-1 ou témoin). Des rapports de risques personnalisés ont été produits avec des contrastes exponentiels. Le tableau contient également l'erreur-type (SE) de l'estimation du rapport de risque et l'intervalle de confiance (IC) du ratio de risque, la statistique de Wald  $\chi^2$  et la valeur  $P$  résultante. Les valeurs de  $P$  significatives sont en gras ( $P < 0.05$ ).

Sources de variation	Contrastes	dl	$\chi^2$	$P$	Odds ratio	SE	IC95%
Infection		1	21.0	<b>&lt;0.001</b>			
	Témoin vs OsHV-1	1	21.0	<b>&lt;0.001</b>	3.35	0.88	2.00 - 5.61
Température	(OsHV-1)	2	6.6	<b>0.037</b>			
	21°C vs 26°C	1	0.1	0.725	0.86	0.36	0.38 - 1.95
	21-26°C vs 29°C	1	4.7	<b>0.030</b>	0.45	0.17	0.22 - 0.93
	(Témoin)	2	2.5	0.283			
	21°C vs 26°C	1	2.1	0.143	1.34	0.27	0.91 - 1.98
	21°C vs 29°C	1	0.4	0.546	0.79	0.30	0.38 - 1.67
	26°C vs 29°C	1	1.5	0.222	0.59	0.25	0.26 - 1.37



Le risque de mortalité des huîtres qui avaient été en cohabitation avec des huîtres témoins n'a pas été influencé par la température lors de la phase 1A (Figure 8, Table 3). En revanche, le risque de mortalité des huîtres receveuses qui avaient été exposées à OsHV-1 à 29°C était deux fois supérieur à celui des huîtres exposées au virus à 21°C et à 26°C (Figure 8, Table 3). A la fin du suivi en milieu naturel, la survie des huîtres qui avaient été exposées à OsHV-1 à 29°C était de 69.9% contre 85.6% à 21°C et 78.1% à 26°C (Figure 8). Cette différence peut également s'expliquer par le fait que les huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C ont subi moins de mortalités que celles qui avaient été exposées au virus à 21°C et à 26°C, et que la pression de sélection pour des animaux plus résistants à l'infection virale a été moins forte.

Globalement, sur l'ensemble des phases de l'expérience 1, la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C était de 56.6% contre 41.9% à 21°C et 32.0% à 26°C.

- Les huîtres préalablement infectées par OsHV-1 survivent mieux à une seconde exposition au virus en milieu naturel que les témoins non infectés, reflétant vraisemblablement la sélection d'animaux plus résistants.
- Les huîtres survivantes à une infection par OsHV-1 à 29°C présentent un risque de mortalité lors d'une seconde exposition au virus en milieu naturel 2 fois supérieur à celui des huîtres infectées à 21°C et à 26°C.
- Cependant, sur l'ensemble de l'expérience, la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C est 1.5 fois supérieure (56.6%) à celles des huîtres exposées à OsHV-1 à 21°C et à 26°C (37.0%)

### 3.1.2 Expérience 2. Effet de la température sur le pouvoir infectieux d'OsHV-1

La suspension d'OsHV-1  $\mu$ Var a été incubée à 21°C, 26°C et 29°C pendant 4 heures avant d'être injectée dans le muscle adducteur des huîtres maintenues à 21°C afin d'évaluer l'effet de la température sur le pouvoir infectieux du virus. Des huîtres témoins injectées avec 100  $\mu$ L d'eau de mer stérile (EDM) également incubées à 21°C, 26°C et 29°C ont été distribuées dans 2 bassins de 45 L par température (total de 6 bassins).

La survie des huîtres témoins (huîtres receveuses vivant en cohabitation avec des huîtres injectées avec de l'eau de mer stérile) était de 100% tout au long de l'expérience. Par conséquent, seules les huîtres receveuses ayant cohabité avec des huîtres infectées ont été considérées dans les analyses de survie suivantes.

Les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les huîtres donneuses expérimentalement infectées à 21°C, avec une suspension virale incubée à 21°C, 26°C et 29°C, présentent des mortalités significatives dès 72h (Figure 9). A partir de 180h, les mortalités se sont stabilisées chez les huîtres receveuses placées en cohabitation avec les animaux donneurs injectés avec les suspensions virales incubées à 21°C et 29°C alors qu'elles continuent de progresser chez les animaux en contact avec les huîtres injectées avec la suspension virale incubée à 26°C. A la fin de l'expérience, la survie des huîtres à 26 est inférieure à la survie observée à 21, elle-même identique à celle de 29°C (26°C < 21°C = 29°C). En moyenne, la survie finale des huîtres maintenues à 26°C était de 46% contre 52% à 21°C et à 29°C (Figure 9). Le risque de mortalité des huîtres receveuses en cohabitation avec les donneuses injectées avec la suspension virale à 26°C était 1.2 fois supérieur aux autres températures (Table 4).

Les expériences 1 et 2 suggèrent que le pouvoir infectieux d'OsHV-1 est plus important à 26°C comparativement à 21°C et à 29°C.

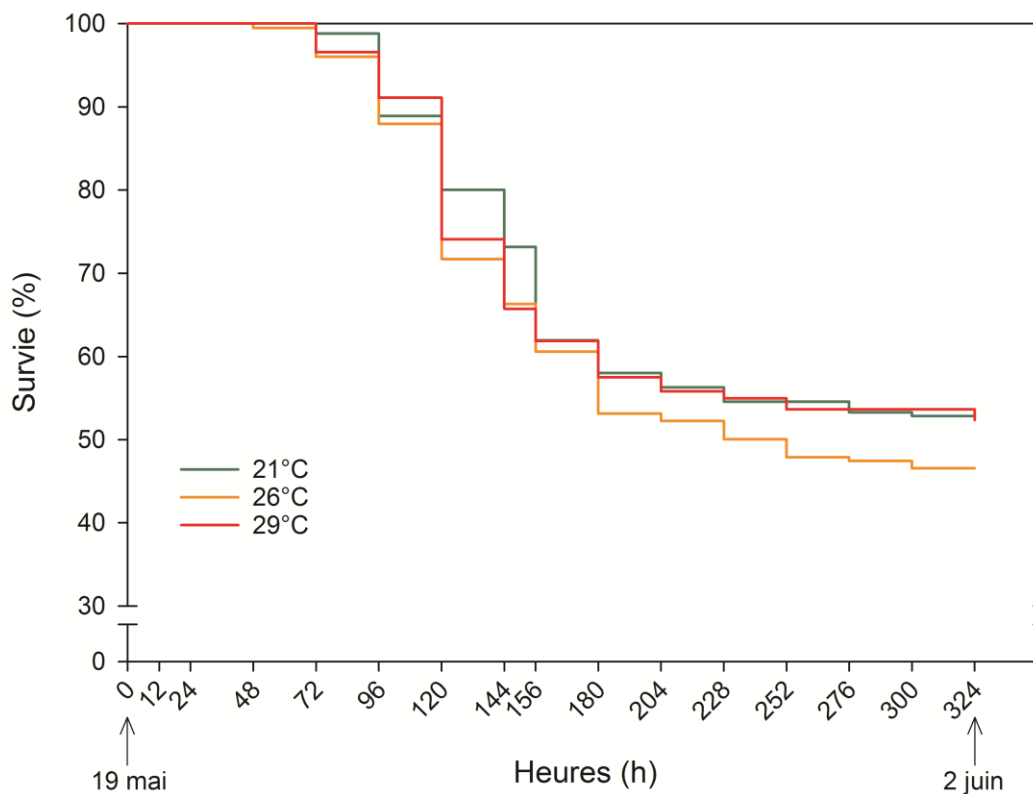


Figure 9. Survie des huîtres receveuses placées en cohabitation avec des huîtres donneuses injectées avec une suspension d'OshV-1, en fonction de la température d'incubation du virus avant l'injection. Le temps de survie a été mesuré en heures après le début de la cohabitation avec les huîtres infectées.

Table 4. Risque de mortalité (odds ratio) des huîtres receveuses en fonction de la température d'incubation du virus avant l'injection aux huîtres donneuses. Des rapports de risques personnalisés ont été produits avec des contrastes exponentiels. Le tableau contient également l'erreur-type (SE) de l'estimation du rapport de risque et l'intervalle de confiance (IC) du ratio de risque, la statistique de Wald  $\chi^2$  et la valeur  $P$  résultante. Les valeurs de  $P$  significatives sont en gras ( $P < 0.05$ ).

Sources de variation	Contrastes	dl	$\chi^2$	$P$	Odds ratio	SE	IC95%
Température		2	7.52	<b>0.023</b>			
	21°C vs 26°C	1	7.46	<b>0.006</b>	0.83	0.06	0.72 0.95
	21°C vs 29°C	1	0.21	0.649	0.94	0.12	0.74 1.21
	26°C vs 29°C	1	1.08	0.298	1.14	0.15	0.89 1.46

## 4 Conclusion

La survie des huîtres infectées par OsHV-1 à 29°C est supérieure (81%) à celle des huîtres à 21°C (49%) et à 26°C (41%). Par ailleurs, les huîtres survivantes à une infection par OsHV-1 à 29°C ne semblent pas produire une infection exprimée chez des congénères à 21°C. Enfin, lors d'une seconde exposition au virus en milieu naturel, les huîtres survivantes à une infection par OsHV-1 à 29°C présentent un risque de mortalité 2 fois supérieur à celui des huîtres infectées aux autres températures. Néanmoins, sur l'ensemble de l'expérience, la survie des huîtres exposées à OsHV-1 à 29°C est 1.5 fois supérieures (57%) à celles des huîtres exposées à OsHV-1 à 21°C et à 26°C (37%). Il reste à comprendre les fondements de cette interaction hôte-agent pathogène-température. Les résultats obtenus laissent suspecter un effet bénéfique d'une température élevée (29°C) sur les capacités de défense de l'huître.

## 5 Références

- Batista FM, López-Sanmartín M, Grade A, Morgado I, Valente M, Navas JI, Power DM, Ruano F (2015) Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread. *Aquaculture* 435: 43-51 doi 10.1016/j.aquaculture.2014.09.016
- Bingham P, Brangenberg N, Williams R, van Andel M (2013) Investigation into the first diagnosis of ostreid herpesvirus type 1 in Pacific oysters. *Surveillance* 40: 20-24
- Buestel D, Ropert M, Prou J, Gouletquer P (2009) History, status, and future of oyster culture in France. *J Shellfish Res* 28: 813-820 doi 10.2983/035.028.0410
- Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19: 353-359
- Cox DR (1972) Regression Models and Life Tables. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 20: 187-220 doi 10.1007/978-1-4612-4380-9\_37
- Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, Rosani U, Stauder M, Pretto T, Pezzati E, Arcangeli G, Turolla E, Pallavicini A, Venier P (2014) Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish Shellfish Immunol* 41: 37-44 doi 10.1016/j.fsi.2014.05.023
- Dundon WG, Arzul I, Omnes E, Robert M, Magnabosco C, Zambon M, Gennari L, Toffan A, Terregino C, Capua I, Arcangeli G (2011) Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 mu var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314: 49-52 doi 10.1016/j.aquaculture.2011.02.005
- EFSA (2010) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on the increased mortality events in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *EFSA* 8: 1894-1953 doi 10.2903/j.efsa.2010
- EFSA (2015) Oyster mortality. *EFSA Journal* 13: 59 doi 10.2903/j.efsa.2015.4122
- Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, Burge CA, Hargove JS, Barber BJ, Elston RA, Bureson EM, Reece KS (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Org* 63: 33-41
- Gittenberger A, Voorbergen-Laarman MA, Engelsma MY (2015) Ostreid herpesvirus OsHV-1 muVar in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *J Fish Dis* doi 10.1111/jfd.12332
- Gouletquer P, Heral M (1997) Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *NOAA Tech Rep NMFS* 129: 137-164
- Hwang J, Park J, Yu H, Hur Y, Arzul I, Couraleau Y, Park M (2013) Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *J Fish Dis* 36: 969-972 doi 10.1111/jfd.12093

- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu X, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, Kirkland PD, Frances J (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Org* 105: 109-126 doi 10.3354/dao02623
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481 doi 10.1080/01621459.1958.10501452
- Keeling S, Brosnahan C, Williams R, Gias E, Hannah M, Bueno R, McDonald W, Johnston C (2014) New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1—an opportunistic longitudinal study. *Dis Aquat Org* 109: 231-239 doi 10.3354/dao02735
- Lin DY, Wei LJ, Ying Z (1993) Checking the Cox Model with Cumulative Sums of Martingale-Based Residuals. *Biometrika* 80: 557-572 doi 10.2307/2337177
- Lynch SA, Carlsson J, Reilly AO, Cotter E, Culloty SC (2012) A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139: 1526-1532 doi 10.1017/S0031182012000881
- MacKenzie J, Clyde L (1996) History of oystering in the United States and Canada, featuring the eight greatest oyster estuaries. *Mar Fish Rev* 58: 1-78
- Malham SK, Cotter E, O'Keeffe S, Lynch S, Culloty SC, King JW, Latchford JW, Beaumont AR (2009) Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture* 287: 128-138
- Martenot C, Denechère L, Hubert P, Metayer L, Oden E, Trancart S, Travaille E, Houssin M (2015) Virulence of Ostreid herpesvirus 1  $\mu$ Var in sea water at 16°C and 25°C. *Aquaculture* 439: 1-6 doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.012>
- Miossec L, Allain G, Arzul I, Francois C, Garcia C, Cameron A (2009) First results of an epidemiological study on oyster (*Crassostrea gigas*) mortality events in France during summer 2008 ISVEE XII - International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa
- Mori K (1979) Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 53: 361-369
- Morrissey T, McCleary S, Collins E, Henshilwood K, Cheslett D (2015) An investigation of Ostreid Herpes Virus microvariants found in *Crassostrea gigas* oyster producing bays in Ireland. *Aquaculture* 442: 86-92 doi 10.1016/j.aquaculture.2015.02.026
- Mortensen S, Strand Å, Bodvin T, Alfjorden A, Skår CK, Jelmert A, Aspán A, Sælemyr L, Naustvoll LJ, Albretsen J (2016) Summer mortalities and detection of ostreid herpesvirus microvariant in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway. *Dis Aquat Org* 117: 171-176
- Nell JA (2001) The history of oyster farming in Australia. *Mar Fish Rev* 63: 14-25
- Paul-Pont I, Dhand NK, Whittington RJ (2013) Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 412-413: 202-214 doi 10.1016/j.aquaculture.2013.07.038
- Paul-Pont I, Evans O, Dhand NK, Whittington RJ (2015) Experimental infections of Pacific oyster *Crassostrea gigas* using the Australian ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1)  $\mu$ Var strain. *Dis Aquat Org* 113: 137-147 doi 10.3354/dao02826
- Peeler EJ, Reese RA, Cheslett DL, Geoghegan F, Power A, Thrush MA (2012) Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1  $\mu$ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Prev Vet Med* 105: 136-143 doi 10.1016/j.prevetmed.2012.02.001
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149: 269-276 doi 10.1016/j.jviromet.2008.01.022
- Perdue JA, Beattie JH, Chew KK (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *J Shellfish Res* 1: 9-16
- Pernet F, Barret J, Gall PL, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, Pépin J-F, Keck N (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary

- with farming practises in the Thau lagoon. *Aquaculture Env Interact* 2: 215–237 doi 10.3354/aei00041
- Pernet F, Tamayo D, Petton B (2015) Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* 445: 57-62 doi 10.1016/j.aquaculture.2015.04.010
- Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 6: 205-222 doi 10.3354/aei00125
- Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Env Interact* 3: 257-273 doi 10.3354/aei00070
- Rahman MM, Escobedo-Bonilla CM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, Wille M, Sanz VA, Pensaert MB, Sorgeloos P, Nauwynck HJ (2006) Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261: 842-849 doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.007>
- Renault T, Bouquet AL, Maurice J-T, Lupo C, Blachier P (2014) Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat: relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality. *Appl Environ Microbiol* 80: 5419-5426 doi 10.1128/aem.00484-14
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Elandaloussi L, Gairin I, Rodgers CJ, Furones MD (2012) First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324–325: 303-306 doi 10.1016/j.aquaculture.2011.10.018
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T (2011) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* 155: 28-34 doi 10.1016/j.virusres.2010.07.031
- Segarra A, Pepin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153: 92-99 doi 10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Soletchnik P, Ropert M, Mazurie J, Fleury PG, Le Coz F (2007) Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271: 384-400
- Suquet M, de Kermoisan G, Araya RG, Queau I, Lebrun L, Le Souchu P, Mingant C (2009) Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 22: 29-34
- Troost K (2010) Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J Sea Res* 64: 145-165 doi 10.1016/j.seares.2010.02.004
- Watermann BT, Herlyn M, Daehne B, Bergmann S, Meemken M, Kolodzey H (2008) Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J Fish Dis* 31: 621-630 doi 10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x