

Nathalie Cochenec-Laureau¹, Jean Pierre Baud, Jean François Pépin, Abdellah Benabdelmouna, Patrick Soletchnik, Coralie Lupo, Céline Garcia, Isabelle Arzul, Pierre Boudry, Arnaud Huvet, Fabrice Pernet, Evelyne Bachere, Edouard Bedier, Bruno Petton, Florian Gaussem, Jean Yves Stanisière, Lionel Dégremont

(1) rédacteur, Chef de projet « surmortalité des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, en France »

Ifremer, Laboratoire de La Trinité Sur Mer, nathalie.cochennec@ifremer.fr

« Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, : acquis des recherches en 2010 »



"Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : acquis des recherches en 2010 »

Nathalie Cochenne-Laureau¹, Jean Pierre Baud², Jean François Pépin³, Abdellah Benabdelmouna³, Patrick Soletchnik⁴, Coralie Lupo³, Céline Garcia³, Isabelle Arzul³, Pierre Boudry⁵, Arnaud Huvet⁵, Fabrice Pernet⁶, Evelyne Bachere⁷, Edouard Bedier^{1*}, Bruno Petton^{5*}, Florian Gaussem^{1*}, Jean Yves Stanisière^{1*}, Lionel Dégremont³

¹ Ifremer – 56470 La Trinité sur mer – Responsable du projet « surmortalité des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* » ncochenn@ifremer.fr

^{1*} Ifremer – Laboratoire Environnement-Ressource - 56470 La Trinité sur mer

² Ifremer – Centre de Nantes – Responsable du programme « Aquaculture Durable » - 44300 Nantes

³ Ifremer – Laboratoire de Génétique et Pathologie – 17390 La Tremblade

⁴ Ifremer – Laboratoire Environnement Ressource – 17390 La Tremblade

⁵ Ifremer – UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins Technopole de Brest-Iroise 29280 Plouzane

^{5*} Ifremer, UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Station Expérimentale d'Argenton - Presqu'île du Vivier, 29840 Argenton en Landunvez

⁶ Ifremer – Laboratoire Environnement Ressource – 34203 Sète

⁷ Ifremer – Laboratoire « Réponse Immunitaire des Macroorganismes et Environnement" UMR 5119 ECOSYM "Ecologie des Systèmes Marins Côtiers " CNRS, Universités Montpellier - 34095 Montpellier cedex

Remerciements

Les actions concernant les études des surmortalité d’huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été financées par l’Ifremer, le MAAPRAT, les Conseils Régionaux et les Comités Régionaux de la Conchyliculture.

Les auteurs souhaitent également remercier toutes les personnes ayant participé aux groupes de travail initiés dans le cadre du projet « surmortalités des naissains d’huîtres creuses, *Crassostrea gigas* » 2010-2012. Les réunions ont été constructives et ont permis la pluralité et la complémentarité des échanges et des expériences aussi bien professionnelles, techniques que scientifiques sur ce sujet important.

Merci enfin à tous les laboratoires Ifremer et Centres Techniques pour leur mobilisation.

1. Introduction	4
2. Description du phénomène de surmortalité des naissains d’huîtres creuses en 2010 : les particularités par rapport aux années précédentes.....	4
Conclusions	5
3. Causes et facteurs déclenchant et/ou aggravant les mortalités.....	5
3.1. Présence d’agents infectieux	5
3.2. Confirmation du rôle prépondérant des agents infectieux dans ces surmortalités	7
3.2.1. Virus herpès OsHV1 μ var	7
Diagnostic et quantification de la charge virale	7
Transmission, propagation	7
Modélisation de l’infection par le virus herpès	8
3.2.2. <i>Vibrio splendidus</i> et <i>V. aestuarianus</i>	9
Diagnostic.....	9
Transmission, propagation	9
Efficacité de traitements antibiotiques sur l’infection bactérienne	10
Étude des mécanismes de résistance de la bactérie <i>Vibrio splendidus</i> au système de défense de l’huître	10
Conclusions	10
3.3. Facteurs favorisant et/ou aggravant les mortalités	11
3.3.1 Facteurs environnementaux.....	11
Température	11
3.3.2. Existence d’hôtes réservoirs.....	12
Autres espèces de mollusques	12
Huîtres adultes de gisements sauvages.....	12
3.3.3. Ploïdie, anomalies génomiques, physiologie et immunité de l’hôte, <i>C. Gigas</i>	13
Influence de la ploïdie et de la gamétogenèse sur l’infection par <i>Vibrio</i>	13
Influence des anomalies génomiques sur les mortalités.....	13
Identification de gènes ou de protéines associées à la survie et/ou la mortalité des naissains	14
Conclusions	16
3.3.4. Les pratiques d’élevage	17
Comparaison Huîtres d’écloserie et de captage	17
Impact de la date de captage du naissain sur les mortalités	19
Date des transferts	19
Structures d’élevage : poches, densités, niveau d’exondation	19
Conclusions	20
4. Quelles solutions en dehors des sorties de crise.....	20
4.1. Existe-t-il des environnements moins touchés par les mortalités ?.....	20
4.2. Huîtres sélectionnées pour leur meilleure survie	21
4.3. Sélection naturelle	23
5. Conclusions générales et recommandations.....	23
6. Références bibliographiques	26

1. Introduction

Depuis 2008, la filière ostréicole française doit faire face à des surmortalités exceptionnelles des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, (huîtres de moins d'un an) comprises entre 60 et 90% dans tous les sites d'élevage. Des cas de mortalité similaires ont été décrits en Irlande, dans les îles anglo-normandes, au Portugal en 2009 et au Royaume-Uni en 2010. Récemment deux épisodes de mortalité, associés à la présence d'un virus OsHV1 μ var (ou un variant très proche) ont été également décrits en Nouvelle Zélande (décembre 2010) et en Australie (janvier 2011) soulignant la vulnérabilité de la filière ostréicole dans le monde.

L'objectif de ce document est de faire un point sur les recherches menées depuis l'apparition de ce phénomène et de présenter les acquis scientifiques et techniques obtenus suite aux études menées en 2010 par différents acteurs de la filière (Laboratoires Ifremer et Centres techniques régionaux) dans le cadre du projet « surmortalité des huîtres creuses, *Crassostrea gigas* ». Ces résultats ont été présentés au cours de deux journées en décembre 2010 à l'Ifremer de Nantes, aux quelles participaient la DPMA, la DGAI, l'ANSES, le CNC, certaines CRCs et l'ensemble des scientifiques impliqués.

2. Description du phénomène de surmortalité des naissains d'huîtres creuses en 2010 : les particularités par rapport aux années précédentes

Depuis 2008, les caractéristiques des épisodes de mortalité observés en France ont évolué :

- En 2008, la surmortalité a été observée dans la quasi totalité des sites d'élevage (à l'exception de la Corse, de la mer Méditerranée et de certaines zones en Bretagne Nord). Trois pics temporels de mortalité ont été décrits: fin mai-début juin, fin juin-début juillet et fin juillet-début août (Réseau de Pathologie des Mollusques et étude épidémiologique, Miossec *et al.*, 2009).
- En 2009, les mortalités ont commencé plus précocement, fin avril et ont connu une progression du sud de la France vers le Nord (Observatoire Conchylicole, Réseau de Pathologie des Mollusques, Repamo) associée à la montée des températures jusqu'au seuil de 16°C et identifiant ainsi un nouveau seuil thermique. L'impact fort des conditions climatiques observées en 2008 et les années précédentes (hiver doux et printemps pluvieux) ne semblent plus pouvoir expliquer de manière satisfaisante les mortalités observées pour la deuxième année consécutive.
- En 2010, comme en 2009, tous les bassins de production de la Côte Méditerranéenne (sauf en eau profonde) à la Manche, présentant des écosystèmes très différents, ont été touchés par des surmortalités comprises entre 40 et 90% (Bédier *et al.*, 2010 ; François *et al.* 2010). Ces mortalités ont affecté de la même manière les naissains de captage naturel (diploïde, 2n) et d'écloseries (diploïde, 2n et triploïde, 3n). Ces épisodes ont commencé mi-avril en Corse et dans l'étang de Thau, ont touché simultanément vers la mi-juin la majorité des bassins de production de la côte Atlantique et ceux de Bretagne Nord, puis fin juin la Normandie. Comme en 2009, le secteur en eau profonde de la Baie de Quiberon et les sites de la Baie de Morlaix ont été les derniers touchés fin juillet et mi août respectivement avec des pourcentages de

mortalités dans ces secteurs qui n'ont pas excédé 40%. Quelques mortalités résiduelles ont été décrites jusqu'à fin septembre mais elles sont restées ponctuelles et limitées en terme d'intensité. Les mortalités, brutales, ont été associées en 2010 comme en 2009 à la montée rapide des températures jusqu'à 16° C : ce seuil faisant suite à une progression très rapide des températures dans les 4 à 5 jours qui précédaient (Pernet *et al.*, 2010). Cependant, des premières mortalités ont été observées à Bouin (Vendée) fin avril avec une température de l'eau de 12°C (P. Glize *et al.*, 2010). Ces mortalités n'ont pas dépassé 30%.

Une des particularités de 2010 est l'observation, pour la première fois d'une période d'interruption des mortalités lorsque la température de l'eau dépassait 24°C pendant plusieurs semaines dans l'étang de Thau (Pernet *et al.*, 2010) et en nurserie à Marennes Oléron (Bouquet *et al.*, 2010). L'impact des températures hautes sur les surmortalités reste à préciser : impact sur la physiologie du naissain et/ou sur la virulence des agents infectieux.

Conclusions

Les mortalités d'huîtres creuses en 2010, comme les années précédentes, touchent essentiellement les huîtres de moins d'un an, quelle que soit leur ploïdie (2n et 3n), lorsque la température de l'eau est comprise entre 16-17° et 24°C. Ces mortalités touchent toutes les zones d'élevage avec un taux moyen d'environ 70%. Au delà de 24°C, les mortalités semblent cesser mais ce point reste à confirmer. La période à risque des mortalités a donc évolué depuis 2008 et semble s'allonger dans le temps avec un démarrage des mortalités plus précocement dans l'année mi-avril et un arrêt fin septembre. Elle est toutefois différente en fonction des sites d'élevage.

3. Causes et facteurs déclenchant et/ou aggravant les mortalités

3.1. Présence d'agents infectieux

Différentes analyses pathologiques pour la recherche d'agents infectieux associés aux surmortalités ont été réalisées en 2010, i) dans le cadre du Réseau de Pathologie des Mollusques (François *et al.*, 2010), de l'Observatoire Conchylicole (Bédier *et al.*, 2010), d'études régionales (Pernet *et al.*, 2010 ; Mazurié *et al.*, 2010, Gaussem *et al.*, 2010, Soletchnik *et al.*, 2010, Le Moine *et al.*, 2010, Renault *et al.*, 2010, Petton *et al.*, 2010, Benabdelmouna *et al.*, 2010) et ii) dans le cadre des centres techniques régionaux : suivis sentinelles régionaux et inter-régionaux (Glize *et al.*, 2010, Bouquet *et al.*, 2010, Blin *et al.*, 2010). D'autres agents infectieux, notamment différentes bactéries du genre *Vibrio*, ont été également recherchés par Glize (2010). **Quelle que soit la source des résultats, ils font tous apparaître la présence d'herpès virus OsHV1 μ var, *Vibrio splendidus*, *V. aestuarianus* et quelques rares cas d'autres espèces de *Vibrio*. Aucun nouvel agent infectieux n'a été détecté. Dans tous les cas, le génotype de référence OsHV1 (1995) n'a pas été retrouvé (Pépin, com. Pers.).**

Le bilan des analyses présentées repose sur les résultats du Réseau de Pathologie des Mollusques (analyses pathologiques sur des lots de professionnels lors de déclarations de mortalités et sur les lots de l'Observatoire Conchylicole). Les analyses ont révélé la présence du virus herpès OsHV1 μ var dans 95 % des lots analysés (67/70 lots) et dans 27% des lots de juvéniles et/ou d'adultes (3/11 lots analysés) et ce indépendamment du site de production et de la ploïdie des lots (2n et 3n). Ce virus est fortement associé à la présence de *Vibrio splendidus* et plus rarement à celle de *V. aestuarianus*. Comme en 2009, le génotype OsHV1 μ var représente la majorité du génotype d'OsHv1 diagnostiqué : 69 des 70 cas positifs (100% des 57 lots positifs en 2009). Depuis 2010 la technique d'identification du virus OsHV-1 μ var est réalisée par une technique nouvelle de PCR spécifique qui nécessite une quantité minimum d'ADN génomique du virus dans l'échantillon pour obtenir une bonne sensibilité et spécificité¹ (Commission Regulation (EU) n° 175/2010). Au préalable, cette identification était effectuée par un séquençage direct des produits amplifiés par PCR. Cette technique était plus longue.

La nouvelle technique a été mise au point à partir de zones polymorphes du variant par rapport au virus de référence. Il a été en effet possible dès fin 2008 d'identifier ce génotype appelé OsHV-1 μ Var du fait de la délétion de 12 paires de bases qu'il présente dans une zone de l'ADN (microsatellite de l'ORF4) (Segarra *et al.*, 2010). **Le polymorphisme de ce génotype μ Var se confirme en 2010 et se caractérise également par une délétion d'environ 600 paires de bases correspondant à la perte totale de deux gènes et à la perte d'une partie d'un troisième gène** (Pépin com. Pers.).

Ces résultats confirment l'émergence de ce nouveau variant depuis 2008 par rapport au génotype de référence décrit à partir d'échantillons collectés en 1995 (Le Deuff & Renault, 1999 ; Davison *et al.*, 2005) et la « substitution » totale de ce dernier observée en 2009 est confirmée en 2010..

Ces observations soutiennent les hypothèses de dynamique des mortalités proposées lors de l'étude épidémiologique réalisée en 2008 (Miossec *et al.*, 2009) et l'analyse de données de l'Observatoire Conchylicole en 2009 (G. Allain *et al.* 2010) :

- 2008 : année d'apparition et/ou première détection du μ variant avec contagion intra bassin (Thau et Charente) puis contagion inter-bassins (Allain *et al.*, 2010),
- 2009 : expression simple de la maladie présente partout en France probablement liée aux transferts des lots d'huîtres infectés en 2008,
- 2010 : confirmation et installation de la pathologie.

Les analyses 2010 mettent de plus en évidence une progression significative du taux d'infection par *V. splendidus* qui soutient l'hypothèse d'une piste infectieuse multiple : 92% du naissain infecté par *V. splendidus* en 2010 (72/78 lots) contre 50% en 2009 (25/50 lots analysés). Concernant *V. aestuarianus*, 14% des lots analysés ont été trouvés positifs (11/78 lots).

Ces données confirment une évolution du taux de prévalence par les agents infectieux décrits **avant et après 2008**. En effet, lors du programme MOREST, les taux moyens, entre 2001 et 2006, étaient de 40% pour le virus OsHV1 (de référence), 75% pour *V. aestuarianus* et 25% pour *V. splendidus*.

¹ La méthode de détection moléculaire du virus OsHV1 par qPCR ne permet pas d'assurer qu'un lot est indemne de virus, seulement qu'il contient moins de 100 à 1000 copies d'ADN viral par mg de tissu d'huître (seuil de détection).

3.2. Confirmation du rôle prépondérant des agents infectieux dans ces surmortalités

Avant les surmortalités de 2008, les études épidémiologiques basées sur les analyses collectées entre 1997 et 2006 (Renault et Arzul, 2001, Thébault *et al.*, 2003, Garcia *et al.*, 2007) ont établi que le lien de causalité entre la présence du virus herpes et les mortalités était peu élevé (Renault T., HDR, 2007). Ces résultats supportaient l'hypothèse du caractère opportuniste du virus OsHV1 (de référence) exacerbé par le stress de la maturation associée à la température de 19°C dans les mortalités avant 2008.

3.2.1. Virus herpes OsHV1 μ var

Diagnostic et quantification de la charge virale

De nouvelles données épidémiologiques ont été obtenus en 2009 et 2010 grâce notamment au développement de la méthode de détection du virus OsHV-1 par PCR quantitative (amplification génique enzymatique) qui permet d'associer à la détection d'ADN viral une charge virale indicative du développement de l'infection et de l'expression du virus. Elles ont permis de démontrer qu'**il existe une corrélation positive et significative entre le niveau de mortalité observé pour un lot et la charge virale associée** (Sauvage *et al.*, 2009, Dégremont *et al.*, 2010, Bouquet *et al.*, 2010, Gaussem *et al.*, 2010, Pernet *et al.*, 2010, Mazurié *et al.*, 2010, Blin *et al.*, 2010).

Transmission, propagation

La reproduction expérimentale de l'infection par le virus OsHV1 μ var, mise en place depuis 2008 puis standardisée et validée en 2010 (Schikorski *et al.*, 2010) permet de reproduire les mortalités selon deux voies d'infection, par injection musculaire et par cohabitation. Cette dernière reproduit le mode d'infection du milieu naturel, entre des lots indemnes et des lots infectés par le virus. **Le suivi de la charge virale au cours de ces essais montre des niveaux de répllication très forts du virus et une prolifération rapide passant de l'absence de détection à la détection d'ADN viral à plus de 1.10^6 copies d'ADN viral par mg de tissus dès J+3 post inoculation associée à des mortalités importantes de 90%.**

Les infections par cohabitation **prouvent la transmission horizontale du virus des huîtres contaminées aux huîtres saines (sensibles) et** révèlent que les particules virales sont libérées dans l'eau par les animaux moribonds en phase infectieuse. Le virus est détecté dans l'hémolymphe (système circulatoire des huîtres) 6 heures après la mise en contact avant de se propager à d'autres organes (branchies, manteaux, muscle adducteur). **Ces résultats démontrent la rapidité de la contamination et la vitesse de multiplication du virus dans les tissus d'huîtres, lorsqu'elles sont mises en contact avec des huîtres infectieuses.** Ces résultats reproduisent probablement ce qui se passe dans le milieu naturel entre des lots infectés et des lots « indemnes ». D'ailleurs des quantités importantes de plus de $>10^7$ copies d'ADN viral sont retrouvés dans l'eau à proximité des huîtres en élevage sur estran (Gaussem *et al.*, 2010). La nature du virus dans l'eau, libre ou adsorbé sur des particules reste à étudier.

Après injection musculaire d'une série de dilution décroissante d'une suspension d'OsHV1 μ var, on démontre **l'existence d'une relation entre la dose injectée et le niveau des mortalités observées. Les mortalités n'apparaissent dans cette expérience qu'à partir de 4×10^4 copies/ μ l d'ADN viral injectée** (Pépin *et al.* com. pers.). Cette donnée est primordiale dans la compréhension du déclenchement de la mortalité.

Bien que la transmission horizontale des mortalités et le pouvoir pathogène du virus OsHV1 μ var aient été établis depuis 2009, la comparaison de sa virulence avec le génotype de référence n'a pu être aujourd'hui réalisée en raison de la substitution de ce dernier dans les huîtres moribondes par le microvariant et la difficulté consécutive à pouvoir l'isoler à nouveau.

Le transfert de la technique de détection du virus OsHV1 ainsi que celle de détection des *Vibrio* a été réalisé vers 5 laboratoires qui sont aujourd'hui agréés par le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche. Sept autres laboratoires ont fait une demande pour être agréés ou reconnus. Les capacités analytiques ont donc été augmentées et devraient l'être encore (Renault *et al.*, 2010). Cela a en particulier permis la mise en place d'études ciblées développées au sein de différents laboratoires Ifremer et des Centres Techniques Régionaux. Le bilan de ces analyses montre qu'il existe une cohérence biologique entre les résultats expérimentaux et les études épidémiologiques de terrain à pas de temps de prélèvements serrés (Saulnier *et al.*, 2009, 2010, Bouquet *et al.*, 2010, Pernet *et al.*, 2010, Mazurié *et al.*, 2010, Gaussem *et al.*, 2010, Blin *et al.*, 2010) qui **confirme que la détection de charges très importantes d'ADN viral ($>10^7$ à 10^9) précède l'apparition des mortalités** ; la quantification est d'ailleurs un meilleur traceur du développement de la maladie que la détection simple.

Modélisation de l'infection par le virus herpès

Afin de mieux expliquer les phénomènes de surmortalité vis-à-vis d'une infection au virus herpès, deux modèles de la diffusion du virus herpès ont été testés : le premier basé sur un modèle théorique de type « SIR automate cellulaire » utilisant des données expérimentales en milieu contrôlé et le second sur une approche populationnelle.

La notion de « sensibilité » des huîtres (porteur sain actif avec possibilité de rémission et porteur sain inactif) a été démontrée comme nécessaire à la mise en place d'un modèle par automate cellulaire permettant de reproduire fidèlement la cinétique des mortalités observées en condition expérimentale pour un lot de naissains de captage naturel porteur de l'herpès virus (Benabdelmouna *et al.*, 2010). Différentes phases sont observées expérimentalement : i) une phase de latence (portage asymptomatique) pendant une vingtaine de jours nécessaire au démarrage des mortalités sans contamination externe, ii) une fois les conditions de température réunies, des mortalités élevées pendant 7 jours puis modérées pendant un mois, puis iii) arrêt des mortalités après 30 jours. L'hypothèse suggérée par ce modèle, en milieu contrôlé, est que les huîtres survivantes sont toujours porteuses du virus OsHV1 μ var et restent potentiellement vecteur dès que les conditions redeviennent favorables (J.Y. Stanisière *et al.*, 2010). **Ces résultats confirment le rôle prépondérant du virus OsHV1 μ var dans les mortalités et celui de la contamination horizontale dans la diffusion de la mortalité.**

L'approche de modélisation complémentaire a été construite à l'échelle de la population et dans le milieu naturel (Thébault *et al.*, 2010). Dans un premier temps une seule population « sensible » est considérée isolément, et les hypothèses les plus plausibles et les plus réalistes possibles sur les mécanismes de l'infection sont formulées à chaque étape. Le modèle propose la présence de plusieurs cycles qui se succèdent au cours de l'année.

En hiver, les huîtres porteuses resteraient infectées sans évoluer (phase latente), sans présenter de mortalité. Lorsque la température commence à monter, les huîtres porteuses deviendraient sensibles à l'infection. Un stress (par exemple une élévation de la température de plusieurs degrés en 24h) au cours de la période printanière

(température moyenne quotidienne supérieure à 14°C) réactiverait les porteurs latents et les rendrait infectieux.

Deux types de transmission sont alors considérés pour cette population :

- des infections intrinsèques (internes), réactivées une fois que toutes les conditions du milieu sont réunies, à partir des individus eux-mêmes devenus infectieux,
- et des infections post-mortem liés au relargage de tissus infectés (matériel infectieux) dans le milieu (eau de mer).

Ce modèle suggère que la transmission des mortalités est liée à la « survie » du virus dans l'eau, à la dose nécessaire pour infecter un naissain sensible, aux caractéristiques de la zone d'élevage et aux pratiques d'élevage. La diffusion du matériel infectieux peut être modulée par la distance entre les individus sensibles et l'hydrodynamisme de la zone (densité/dilution).

3.2.2. *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus*

Diagnostic

Le diagnostic des *Vibrios*, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* est réalisé par PCR quantitative à l'instar de ce qui est fait pour le virus herpès afin d'associer à la détection d'ADN bactérien une charge bactérienne indicative du développement de l'infection chez un naissain ou un pool d'individus (Saulnier *et al.*, 2010).

Transmission, propagation

L'étude de la pathogénèse de *V. splendidus* et *V. aestuarianus* a été réalisée dans le cadre de la thèse de Sophie De Decker (2010). Des essais expérimentaux par cohabitation des deux espèces de *Vibrio* ont révélé l'induction de mortalités atteignant un taux de 27% après seize jours de cohabitation, alors qu'aucune mortalité significative n'a été observée dans la condition témoin. Il a été montré que *V. splendidus* et *V. aestuarianus* infectaient les huîtres après seulement deux heures de cohabitation. Celles-ci présentaient alors des charges individuelles variables, comprises entre $4,5 \cdot 10^2$ et $2 \cdot 10^4$ UFC/ml dans l'hémolymphe. Ces deux *Vibrio* pathogènes ont été détectés dans l'ensemble des tissus analysés, manteau, branchies, palpes labiaux et glande digestive notamment, à des concentrations comprises entre $3,6 \cdot 10^2$ et $1,04 \cdot 10^6$ UFC/g de tissu. Les analyses ont permis de confirmer l'absence de détection du virus OsHv1. **Ces expérimentations ont démontré la transmission horizontale entre huîtres moribondes et huîtres saines confirmant le pouvoir infectieux de ces deux vibrios.** Cependant, les études ne montrent pas clairement de corrélation entre les événements de mortalité, la fréquence de détection des bactéries du groupe *Vibrio splendidus* et les charges en ADN viral associées. **Le lien de causalité n'est pas clairement démontré pour les *Vibrio*.**

La transmission horizontale est probablement facilitée par l'activité de filtration et le système de circulation semi-ouvert des hémocytes des huîtres. **D'ailleurs une corrélation positive a été observée entre les charges en flore vibrionacée totale quantifiée dans les hémolymphe des huîtres et l'eau des aquariums soulignant l'existence probable d'un équilibre dynamique entre ces deux compartiments, eau et hémolymphe en conditions expérimentales (S. De Decker, 2010).**

Efficacité de traitements antibiotiques sur l'infection bactérienne

Un suivi de la mortalité des naissains, à pas de temps rapproché, a été effectué et des prélèvements ont été réalisés sur des huîtres survivantes à 4 jours et 8 jours après le déclenchement des mortalités (Saulnier *et al.*, 2010). Les naissains ont été placés dans des aquariums contenant de l'eau de mer traitée aux UV en rajoutant ou non des antibiotiques à large spectre vis-à-vis des bactéries Gram négatif (dont les *Vibrio*). Sur les huîtres prélevées 4 jours après le déclenchement des mortalités, l'utilisation de l'antibiotique réduit les mortalités sans les supprimer pour autant. Ces résultats suggèrent l'implication probable du virus herpès qui n'est pas éliminé par le traitement antibiotique et montrent l'association des bactéries dans ces mortalités.

Ce traitement, testé sur des huîtres survivantes 8 jours après les mortalités, réduit significativement les mortalités dans les aquariums. Ces résultats permettent d'envisager deux hypothèses : i) les naissains survivants prélevés n'étaient pas infectés par l'herpès virus mais présentaient une infection bactérienne seule et ii) les naissains morts avant le prélèvement étaient morts du virus OsHV1 μ var et l'infection bactérienne associée a pu être jugulée chez les naissains survivants. Ces résultats suggèrent une infection multiple par synergie et/ou additivité.

Les différentiels de mortalité et de résultats d'analyse observés pour l'étude menée dans l'étang de Thau pourraient s'expliquer par des infections simples et/ou multiples en fonction des températures et/ou des conditions d'élevage (Pernet *et al.*, 2010).

Étude des mécanismes de résistance de la bactérie *Vibrio splendidus* au système de défense de l'huître

Bien que les mécanismes ne soient pas totalement élucidés, plusieurs espèces de bactéries, dont *V. cholerae*, pathogène chez l'homme, nécessitent une porine OmpU (protéine des membranes cellulaires) pour la colonisation de l'hôte et l'expression de sa virulence en conditions naturelles et expérimentales.

Chez l'huître creuse, il a été également montré que la porine OmpU était un effecteur majeur des interactions entre *V. splendidus* et *C. gigas* (Duperthuy, 2010). Des expériences réalisées à partir d'un mutant de *V. splendidus* (délétion de OmpU) ont permis de montrer l'implication de cette protéine (i) dans la résistance de *V. splendidus* aux peptides/protéines antimicrobiennes, incluant ceux de l'huître et (ii) dans la virulence des infections expérimentales : mortalités de 56 % pour la souche non mutante contre 11% de mortalité pour la souche mutante (Duperthuy, 2010).

Dans ce processus, la porine OmpU est nécessaire à la reconnaissance membranaire de l'hémocyte et à son invasion. De plus, la protéine majoritaire du plasma de l'huître (la superoxyde dismutase extracellulaire, Cg-ecSOD) reconnaît la porine OmpU et intervient en favorisant la phagocytose de la bactérie par les hémocytes.

Les études qui montrent que *V. splendidus* envahit les hémocytes de l'huître (cellules de défense des huîtres) en perturbant leur architecture cellulaire soutiennent cette hypothèse.

Conclusions

1. Les résultats 2010 font apparaître la présence majeure de l'herpès virus OsHV1 μ var, *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus*. Quelques rares cas d'implication d'autres espèces de *Vibrio* ont été notés. Aucun nouvel agent infectieux n'a été détecté. Dans tous les cas, le génotype de référence de OsHV1 n'a pas été retrouvé.

En intégrant toutes les nouvelles données obtenues en 2010, le lien de causalité entre le virus OsHV1 μ var et les surmortalités présente une « évidence élevée » et confirme l'action prépondérante d'OSHV-1 μ var dans les mortalités. De plus, l'étude d'autres parties du génome confirme clairement le polymorphisme du génotype OsHV1 μ var et conforte l'hypothèse d'un variant émergent depuis 2008 et la substitution du génotype de référence depuis 2009 et 2010.

2. Les modèles théoriques de diffusion de l'herpès μ var, développés en 2010, supportent l'hypothèse de deux types d'infection 1) basée sur la latence du virus et l'expression du virus de façon intrinsèque chez les naissains « porteurs asymptomatiques » dès que les conditions de température sont réunies et 2) par transmission horizontale par l'eau entre huîtres devenues infectieuses et « indemnes ».

*3. Les résultats de 2010 montrent l'existence de co-infections importantes entre le virus OsHV1 μ var et le *V. splendidus*. L'étude de la pathogenèse de ce dernier montre qu'il a un tropisme intra-hémocytaire facultatif qui lui permet de manipuler/réduire les mécanismes de défense de l'huître pour pénétrer et survivre dans les cellules de ce système.*

*Ces observations soulèvent plusieurs questions : une infection bactérienne est elle nécessaire au déclenchement et/ou à l'amplification des mortalités par le virus OsHV1 μ var? L'émergence du virus OsHV1 μ var peut-elle expliquer l'augmentation de l'espèce *V. splendidus* au détriment de celle de *V. aestuarianus* ? Existe-t-il des bactéries plus virulentes que d'autres dans le groupe phylétique assez vaste des *V. splendidus* ?*

3.3. Facteurs favorisant et/ou aggravant les mortalités

3.3.1 Facteurs environnementaux

Parmi les facteurs environnementaux susceptibles d'influer la mortalité, la température de l'eau apparaît comme un facteur prépondérant dans le déclenchement des mortalités et de l'expression du virus.

Température

Expérimentalement, il a été montré, que la température d'élevage de naissains injectés avec du virus OsHV1 μ var influait les résultats obtenus. Ces essais permettent d'observer, qu'à la température de 16°C ou moins, l'apparition de la mortalité est décalée dans le temps. Les premières mortalités sont observées à J+2, J+3 et J+5 respectivement à 22°C, 16°C et 10°C. (Pépin *et al.*, 2010).

L'impact de l'augmentation brutale de température a également été testé expérimentalement sur des lots de différentes origines avec des statuts sanitaires définis préalablement par qPCR (B. Petton *et al.*, 2010). Des lots de naissains de différentes origines (naturels 2n et d'écloserie 2n et 3n) ont subi une élévation brutale de la température de 13°C à 21°C et ont été maintenues à cette température de 21°C pendant une durée de 1 mois.

Cette épreuve thermique a permis de montrer que des naissains naturels détectés négatifs à la présence de virus OsHV1 μ var (qPCR) pouvaient, dans ces conditions expérimentales de remontée brutale de température, se révéler porteur asymptomatique du virus (sans mortalité)

et porteurs infectieux (avec mortalité). Les lots de naissains d'écloserie ont tous été qualifiés négatifs après cette épreuve.

Cette technique, simple à mettre en œuvre, devra être validée, mais elle représente d'ores et déjà un crible efficace et une voie complémentaire analytique pour qualifier sanitaire les naissains. De plus elle représente une approche de pathologie expérimentale particulièrement intéressante pour étudier différents aspects du phénomène infectieux (synergie des agents infectieux, effets de facteurs environnementaux et culturels...).

Malgré cette avancée expérimentale, il faut continuer d'améliorer la sensibilité des techniques de diagnostic et leur quantification car ces résultats montrent que même si le diagnostic est négatif, les huîtres peuvent jouer un rôle de réservoir et le risque d'infection dans ce cas n'est pas nul.

3.3.2. Existence d'hôtes réservoirs

Autres espèces de mollusques

Depuis la première description du virus herpès OsHV1 en France en 1991 (Nicolas *et al.*, 1991), celui-ci a été rapporté chez de nombreux mollusques bivalves autres que l'huître creuse, l'huître plate, *Ostrea edulis*, la palourde européenne, *Ruditapes decussatus*, la palourde japonaise, *R. philippinarum*, et la coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*.

En 2009, le virus OsHV1 μ var a été détecté chez des moules, *Mytilus edulis*, et chez *M. galloprovincialis* (Pernet *et al.*, 2010). En 2010, il a également été détecté chez des moules, dans un cas associé à des mortalités et chez un cas de mortalité de tellines, *Donax trunculus* (Repamo). Cependant, les charges virales étaient faibles. Des recherches spécifiques sur les autres espèces n'ont pas été réalisées en absence de mortalités (dans le cadre du Réseau de Pathologie des Mollusques, REPAMO).

Huîtres adultes de gisements sauvages

Les huîtres creuses adultes, *C. gigas*, constituent très certainement un réservoir pour le virus herpès car cette espèce est la plus représentée aussi bien en élevage que sur des bancs sauvages dans les sites de production français. Les huîtres adultes > 2ans depuis 2008, 2009 et encore cette année (Bedier *et al.*, 2010) ne sont pas touchées par les phénomènes de surmortalités. Des analyses ont permis de détecter de l'ADN viral et des protéines virales dans des huîtres adultes en élevage potentiellement porteuses asymptomatiques du virus de référence (Arzul *et al.*, 2002). Aucune donnée n'était jusqu'alors disponible sur les huîtres adultes de gisements sauvages. Des informations récoltées en 2008 et 2009 par les professionnels et aussi par Hily, (Com. Pers.) semblaient indiquer que la survie des naissains sauvages était même supérieure à celle des naissains d'élevage, généralement de l'ordre de 90%, à quelques exceptions près (Lejart, 2009). Ceci laissait à penser que les géniteurs sauvages présentaient une meilleure « résistance », « rusticité » face à ces mortalités notamment grâce à leurs conditions de vie : fixation sur des zones rocheuses situées très hautes sur l'estran sans manipulation ni transfert.

En 2010 une étude a porté sur l'analyse zoo-sanitaire de 4 gisements sauvages d'huîtres adultes et de naissains dans le Pertuis Charentais (Soletchnik *et al.*, 2010a). Ces gisements sauvages ont été choisis en fonction de leur isolement fort (2 sites) ou faible (2 sites) par rapport aux zones d'élevage : choix basé sur des simulations hydrodynamiques de la dispersion de traceurs émis par tous les stocks d'huîtres en élevage considérés comme

réservoirs potentiels de virus (Thèse I. Bernard, 2010). En fonction de la période de prélèvement, hors contexte de mortalité le virus OsHV1 μ var a été détecté dans les 4 stocks sur les huîtres adultes, quelque soit l'isolement, et sur le naissain uniquement sur les sites à isolement faible. **En période de fortes mortalités des naissains en élevage (juin 2010), le virus OsHV1 μ var n'a été détecté ni dans les adultes ni dans les naissains des stocks sauvages à isolement fort.** En revanche, un lot d'adulte dans un site à isolement faible (la Charente) et un lot de naissains (en Seudre) ont été diagnostiqués positifs au virus OsHV1 μ var.

Ces résultats montrent que les huîtres adultes sauvages peuvent être porteuses asymptomatiques du virus OsHV1 μ var suggérant que quelque soit leur isolement elles peuvent constituer des réservoirs de virus. L'hypothèse la plus probable est celle d'une transmission par l'eau en fonction de l'hydrodynamisme de la zone, ce qui sous entendrait que le virus peut avoir une durée de vie hors de son hôte relativement longue. Celle ci reste cependant à préciser expérimentalement, ainsi que sa forme (ex : adsorption sur particules...). **D'autres expériences effectuées sur du naissain de bancs sauvages, situés à proximité de zones d'élevage en rade de Brest (Pouvreau *et al.*, 2010), confirment que la mortalité est équivalente entre naissain sauvage laissé sur roche ou élevé en poche. Celui-ci ne présente donc pas une meilleure « résistance » au virus OsHV1 μ var.**

3.3.3. Ploïdie, anomalies génomiques, physiologie et immunité de l'hôte, *C. Gigas*

Influence de la ploïdie et de la gamétogenèse sur l'infection par *Vibrio*

L'étude de l'influence de deux facteurs de l'huître creuse sur sa sensibilité à une vibriose expérimentale, la gamétogenèse et le niveau de ploïdie, a été menée dans le cadre de la thèse de S. de Decker (2010). La réalisation d'une infection expérimentale par balnéation sur des huîtres présentant des stades de gonadogenèse contrastés a souligné l'importance de la reproduction et des phénomènes de pontes dans la transmission des *Vibrio* pathogènes.

Dans une seconde approche, des familles de demi-frères diploïdes et triploïdes ont été testées en infection expérimentale à quatre stades de gonadogenèse différents, par injection intramusculaire d'une suspension bactérienne de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*. **Les résultats montrent une sensibilité accrue de l'huître en période de gamétogenèse active et une capacité de survie identique entre des huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3n).**

Influence des anomalies génomiques sur les mortalités

Dans un contexte de fort développement de la filière triploïde, le réseau Biovigilance (Benabdelmouna *et al.*, 2010) a pour objectif de surveiller l'apparition et l'évolution de naissains polyploïdes dans les zones de production d'huîtres creuses que sont les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon. Les résultats de suivi de ploïdie par cytométrie en flux concluent à **l'absence d'animaux polyploïdes**, triploïdes ou tétraploïdes, captés dans les deux bassins prospectés. Cependant, les deux bassins de captage prospectés sont caractérisés par **la présence, à des niveaux variables allant jusqu'à 20% en fonction des sites et des années) de naissains affectés de diverses anomalies génomiques (cassures d'ADN et diminution de la taille du génome).** Ces anomalies génomiques, affectant les naissains de *C. gigas*, ont été montrées comme étant négativement corrélées avec le niveau de survie des naissains. De plus pour un lot de naissains donné, **le taux initial de ces anomalies génomiques déterminé précocement avant mortalité, se révèle être fortement prédictif**

du niveau des mortalités de ce lot. Dans le contexte des mortalités qui impactent lourdement depuis 2008 les naissains de *C. gigas*, et compte tenu du fait que les deux bassins naisseurs étudiés sont à la base de la fourniture des trois quarts des naissains annuellement utilisés en France, la présence de ces anomalies génomiques mises en évidence dans le cadre du réseau biovigilance suscite un intérêt particulier sur leur causes : Peut-on les lier à un impact terrigène ? Existe-t-il une hérédité avec une transmission verticale depuis les géniteurs vers les naissains annuellement captés?

Dans le cadre de ces questionnements, une étude a été menée afin de fournir une première spatialisation de la prévalence des anomalies génomiques dans les bancs de géniteurs sauvages répartis tout le long des pertuis Charentais en 2010 (Benabdelmouna *et al.*, 2010). Il a été montré que les huîtres des bancs sauvages pouvaient être classés en 3 catégories en fonction des taux d'anomalies génomiques évalués en cytométrie en flux : prévalence forte pour les huîtres de l'Ile Madame localisées à l'embouchure de la Charente (impact de la Charente ?), prévalence moyenne à forte pour les huîtres de La Rochelle, Ré, Gironde, Seudre (impact de l'urbanisme et/ou des fleuves Seudre et Gironde?) et une prévalence faible pour St Denis d'Oléron, l'Ile d'Aix, la Tranche, les Bouchouleurs, la Fumée..(sites plus isolées, océaniques ?). L'objectif final étant de rechercher un lien entre la qualité cytogénétique des naissains captés en un site de captage donné et cela en fonction de la qualité cytogénétique du ou des banc(s) de géniteurs sauvages dont il serait issu. Les résultats actuels sont encore ponctuels. Ils doivent être renforcés par d'autres suivis annuels afin de dégager des tendances historiques.

Identification de gènes ou de protéines associées à la survie et/ou la mortalité des naissains

- **Approche intégrative mesurant les interactions du milieu, la microflore et l'expression de gènes de l'immunité.**

Concernant cette approche intégrative, dans un premier temps, une étude *in situ* a été développée permettant un suivi de la microflore, de l'état de santé des huîtres et des paramètres environnementaux au cours d'un épisode de mortalité dans la zone conchylicole de l'étang de Thau au printemps 2010. Ce suivi a permis de mettre en évidence, au moment de l'apparition des mortalités, **des variations significatives de la microflore totale avec une chute d'abondance de bactéries du genre *Vibrio* concomitant avec la détection du virus OsHV1 μ var**. D'autre part, des résultats préliminaires portant sur l'état de santé des huîtres déterminé par la mesure des taux d'expression d'une dizaine de gènes de l'immunité montre aussi **des variations significatives au moment de l'apparition des mortalités et qui coïncident avec une montée rapide de la température de l'eau et le déclenchement des mortalités au seuil de 16°C**.

- **Capacités de survie des huîtres différenciées**

Deux approches du transcriptome (ensemble des ARNm présents dans une cellule dans une situation donnée) ont été développées pour élucider les bases moléculaires de la survie des huîtres, d'une part dans des lignées dites « R » et « S » issues du programme Morest, et, d'autre part, chez des huîtres survivantes à des infections expérimentales bactériennes. Pour cela, les ressources génomiques ont été considérablement enrichies chez *C. gigas*, par la

génération de plus de 29 000 séquences EST uniques (Expression Sequence Tags) (Fleury *et al.*, 2009).

Pour les travaux sur les huîtres « R » et « S », une puce à ADN contenant 9058 gènes (tous tissus) a été construite. Les prélèvements des huîtres « R » et « S » de 4^{ème} génération (issues du programme Morest) ont été réalisés au cours d'un suivi en Bretagne sud durant la période printemps-été. Mi-juin, une mortalité de 20% et 56% a été observée chez les huîtres « R » et « S », respectivement. L'analyse statistique des données de puce à ADN a révélé 34 gènes différentiellement exprimés entre « R » et « S » sur l'ensemble de la période précédant les mortalités. Ces gènes appartiennent aux catégories fonctionnelles « reproduction », « métabolisme énergétique » et « stress oxydant ». Cette analyse a en outre révélé une sur-représentation très significative de gènes associés à la catégorie « défense/immunité » (59%) à la date précédant le pic de mortalité.

Ce résultat suggère la capacité qu'auraient les huîtres « R » à réagir et se défendre, par comparaison aux huîtres « S », face à/aux agent(s) pathogène(s) à l'origine de cet épisode de mortalité. Les huîtres « R » présentant toujours dans le contexte des surmortalités une survie supérieure aux huîtres « S », l'ensemble de ces gènes pourrait représenter l'architecture génomique de la résistance à la mortalité et constitueraient donc une liste d'une vingtaine de candidats prioritaires pour de futures analyses (Huvet *et al.* 2010).

En ce qui concerne la recherche de **gènes de l'immunité impliqués dans la survie des huîtres** à des infections expérimentales bactériennes, une approche transcriptomique de DGE (Digital Gene Expression) a été développée conduisant à la caractérisation du transcriptome des hémocytes et à la mise en évidence de **gènes répondant spécifiquement** à la stimulation par les *Vibrio* pathogènes *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus*, **sur-exprimés chez des animaux capables de survivre** à ces infections (de Lorgeril *et al.*, soumis). Ces gènes associés à la capacité des huîtres de survivre aux infections appartiennent aux groupes fonctionnels de « réponse immunitaire » « adhésion cellulaire et communication », « cytosquelette », « chaîne respiratoire » et « apoptose ». La disponibilité de ce répertoire de gènes de l'immunité permet maintenant d'approfondir les interactions huîtres/*Vibrio*/OsHV 1 μ var et notamment de **définir si les phénomènes de co-infection peuvent induire un état d'immunodéficience exacerbant le pouvoir pathogène du *Vibrio* ou de l'herpès virus.**

Par ailleurs, deux autres banques DGE ont été générées pour mettre en évidence des gènes impliqués dans un **caractère prédictif de survie des huîtres** à des infections bactériennes, conduisant à l'identification de plus de 5200 gènes différentiellement exprimés (entre « Survie » et « Non survie »). L'expression relative de 282 gènes choisis parmi les banques DGE a été analysée sur les échantillons hémocytaires de 45 individus du groupe « Survie » et 45 du groupe « Non Survie » issus de quatre infections expérimentales indépendantes. Les analyses ont indiqué une variabilité d'expression assez importante entre individus du même phénotype (« Survie » ou « Non-Survie »). Ces constatations ont appuyé le choix de l'utilisation d'échantillons au niveau individuel pour la sélection des gènes marqueurs. L'analyse statistique des données a conduit à la mise en évidence de **10 gènes significativement associés au caractère prédictif de survie et non- survie des huîtres.**

Nous disposons de **5 gènes marqueurs d'un phénotype de « capacité de survie » et 5 gènes marqueurs d'un phénotype de « non-survie » selon un caractère prédictif.** Enfin, de façon surprenante, les analyses de qPCR à haut débit sur des lots d'huîtres ont permis de mettre en évidence de **fortes variabilités individuelles** d'expression de certains gènes de l'immunité. Pour certains d'entre eux, ces variabilités ont pu être reliées au niveau du génome à la présence/absence des gènes ou à des variations du nombre de copie des gènes. **Ce**

phénomène pourrait être une cause possible de la perte de résistance des huîtres aux stress physiologiques et environnementaux (Da Rosa *et al.*, 2011).

- **Identification de zones du génome impliquées dans les mortalités estivales**

Une approche dite QTL (Quantitative Trait Loci) est développée afin de détecter des zones du génome impliquées dans les mortalités estivales. Sauvage *et al.* (2010) ont mis en évidence 5 zones du génome expliquant une très grande part de la variance des caractères étudiés (survie et charge en OsHV-1) lors d'un épisode de mortalité survenu en 2006 (Sauvage *et al.*, 2009). **La forte corrélation détectée entre la survie et la charge en virus semble indiquer qu'une sélection pour la résistance au virus est une piste sérieuse.**

Cette même approche QTL est développée sur le caractère de « l'effort de reproduction » qui était un caractère avancé (dans MorestSamain & Mc Combie, 2007) comme important dans la réponse des huîtres face aux épisodes de mortalité. Les résultats permettront de vérifier si ce caractère est aussi important aujourd'hui dans le contexte des surmortalités qui apparaissent à des températures en dessous de celles impliquées dans la reproduction.

- **Présence de protéines associées aux mortalités**

Une approche complémentaire a été développée afin d'identifier les protéines (qui codent les ARNm) associées aux mortalités du naissain chez *C. gigas*, dans le but d'aider à la compréhension des mécanismes et **d'identifier des marqueurs précoces** de la pathogenèse sans *a priori* par électrophorèse 2D.

Il a été démontré que la mortalité est associée à la synthèse de plusieurs protéines du métabolisme cellulaire dont des enzymes nouvellement identifiées qui appartiennent au système de détoxification des métabolites de type aldéhydes. De tels composés ont été récemment découverts comme sur-stimulant la réplication de virus de l'hépatite C chez l'homme. **Ces protéines sont de véritables marqueurs qui décrivent les mécanismes qui précèdent la mortalité par infection expérimentale.** Les premiers résultats montrent que des composés de type aldéhyde sont contenus dans l'eau de mer, et qu'ils sont utilisés par les animaux infectés alors qu'ils ne le sont pas chez les animaux sains (Madec *et al.*, 2010).

Ces approches valident l'importance du couple bactérie/virus dans la mortalité, et confirment l'importance des facteurs environnementaux.

Conclusions

1. L'effet de l'élévation de la température de manière brutale jusqu'à un seuil de 16°C est confirmé dans les mortalités observées à l'issue d'expérimentations de laboratoires et de terrains.

2. Il existe d'autres espèces de mollusques potentiellement réservoirs du virus OsHV1 *muvar*, les moules, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* et les tellines, *Donax trunculus*.

3. Aucune sensibilité accrue n'a été observée entre des huîtres 2n et 3n vis-à-vis d'une infection expérimentale aux Vibrions suggérant que la ploïdie n'est pas un facteur prédominant dans les infections par *Vibrio*.

3. Les résultats 2010 révèlent que les huîtres sauvages ne sont pas plus résistantes que les huîtres d'élevage aux mortalités et qu'elles ont été probablement contaminées par une propagation externe (horizontale) à partir de lots d'élevage. Ces résultats permettent, toutefois, de montrer que l'isolement de certains stocks peut constituer une « barrière » à la diffusion des mortalités, puisque le naissain présent dans les zones à isolement fort est moins impacté que les autres en période de mortalité. Ceci ramène à l'idée de zones « sanctuaires » pour préserver ou développer certains élevages.

4. Le réseau biovigilance confirme l'absence d'animaux polyploïdes ($3n$ et $4n$) dans les naissains des grands bassins d'élevage (Arcachon et Marennes-Oléron). Cependant, les deux bassins de captage prospectés sont caractérisés par la présence accrue de naissains affectés de diverses anomalies génomiques (cassures d'ADN et diminution de la taille du génome). Leur cause reste à déterminer (apports terrigènes...). Les huîtres adultes de bancs sauvages présentent également des anomalies génomiques plus ou moins importantes. La présence de ces anomalies, de l'ordre de 20%, ne peut à elle seule expliquer les surmortalités mais peut permettre la caractérisation de l'intégrité génomique d'un lot de naissain de captage, outil potentiellement prédictif d'une fragilité.

5. Les approches plus fondamentales de compréhension des mécanismes de la survie des huîtres confirment l'influence de la température et l'importance d'un cocktail virus/bactérie dans les mortalités de naissain. D'autre part, la comparaison entre des huîtres ayant survécu ou non à un épisode de mortalité en 2010 dans l'étang de Thau semble relier la forte variabilité individuelle d'expression de certains gènes de l'immunité à la perte de résistance de ces naissains face à des stress physiologiques et immunologiques.

3.3.4. Les pratiques d'élevage

Diverses pratiques d'élevage sont susceptibles d'influer sur les phénomènes de mortalité et ont déjà été évoquées au cours du programme MOREST (Samain et Mc Combie, 2007). Elles peuvent contribuer à amplifier le système infectieux et les mortalités, toutefois leur diversité complique l'interprétation des résultats : nombreuses manipulations (fréquence de manipulation des poches, criblages, transferts), différentes densités d'élevage, mise en élevage de naissain à différentes périodes de l'année (pratique permise par l'approvisionnement en naissains d'écloserie).

Comparaison Huîtres d'écloserie et de captage

La filière ostréicole est basée sur deux types d'approvisionnement, des naissains recrutés dans le milieu naturel, des naissains produits en écloséries et nurseries privées. Dans le contexte de la crise actuelle des surmortalités, beaucoup de questions sont posées sur les produits d'écloserie, leur qualification et leur traçabilité.

Les procédés d'élevage ont été optimisés et sont maintenant maîtrisés dans les principales écloséries de mollusques (Ifremer et privées). L'écloserie Ifremer d'Argenton (Petton *et al.*, 2010) mène depuis 2007 une démarche fondée sur l'optimisation des procédés d'élevage (notamment flux ouvert) et la prophylaxie basée sur des indicateurs de qualité des géniteurs et du naissain produit. Cette démarche s'inscrit également dans l'objectif, à plus long terme, d'améliorer le système de prévention des risques infectieux dans les écloséries et de limiter la dissémination d'agents infectieux vers le milieu extérieur.

La comparaison de naissains issus de captage naturel (lots naturels d’Arcachon et de Fouras) et d’écloserie (lots d’écloserie Ifremer La Tremblade R/S/Témoin 3N) a été menée à La Tremblade en 2009 et 2010 pour étudier la cinétique et la diffusion des mortalités entre ces lots lorsqu’ils sont élevés seuls ou en mélange, en claires et en écloserie (Benabdelmouna *et al.*, 2010). La prévalence en virus herpes observée dans le lot de Fouras (14/150 lots) laisse supposer une forte contamination en année N et un portage important. Le lot d’Arcachon ne présentait que 1/150 huîtres diagnostiquées positives au virus, suggérant un impact moindre et un portage plus faible (Données REPAMO).

En condition isolée, seuls les lots issus de captage naturel ont subi des mortalités : 39% pour le lot de Fouras et 82% pour le lot d’Arcachon. Les lots produits en écloserie (R/S/Témoin 3N) n’ont présenté aucune mortalité. Le différentiel de mortalité observé entre les huîtres naturelles d’origine Arcachon et Fouras pourrait être lié au fait que ces huîtres n’ont pas été touchées de la même manière tout au long de leur parcours (du captage jusqu’à la mise en élevage). Ces résultats pourraient être rapprochés des hypothèses émises en 2009 où la **précocité du captage semble favoriser une meilleure survie** qu’un captage tardif : les juvéniles captés précocement étant impactés au cours de l’été (Benabdelmouna *et al.*, 2010).

Lorsque ces mêmes lots sont élevés en mélange, en claire, quelle que soit leur origine, ils présentent tous des mortalités comprises entre 80 et 100%, supérieures aux conditions séparées. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus en bacs en écloserie et confirment les différences observées entre les origines de naissains. Les résultats en mélange sont comparables à ceux observés sur estran. Les analyses pathologiques confirment dans les animaux moribonds quelle que soit leur origine (naturel et écloserie) la présence du virus OsHV1 μ var et du *Vibrio splendidus*.

Afin de tester la contamination par le virus et/ou les *Vibrio* de différents lots d’écloserie qualifiés « sains » à l’issue d’une épreuve thermique (Petton, 2010) une expérience a été menée dans trois sites contrastés supposés contrastés vis-à-vis des mortalités i) Argenton : température fraîche, site pauvre en phytoplancton, sans élevage ni gisement sauvage, ii) Aber : site intermédiaire avec une température > à 16°C seulement en juillet, zone d’élevage importante mais absence de gisement sauvage et iii) la rade de Brest : site présentant des mortalités, ou la température est souvent supérieure à 16°, avec des huîtres en élevage et un gisement naturel important (Petton *et al.*, 2010).

Les huîtres d’écloserie « qualifiées saines » présentaient une survie de 100% sur le site d’Argenton quelle que soit la date de prélèvement mensuel, de juillet à novembre 2010. Dans le site des Abers, la survie était de 40% en juillet ; aucune mortalité n’a été observée par la suite. Dans le site le plus impacté de la rade de Brest, les huîtres ont subi des mortalités de 80%, entre juillet et août ; ces mortalités ont cessé en septembre.

Ces résultats confirment que les huîtres produites en écloserie, en conditions contrôlées, ne constituent pas, à priori, un réservoir de virus et sont donc « saines ».

Ils montrent également que des huîtres « naïves » préservées des mortalités en écloserie peuvent rester plus ou moins épargnées lorsqu’elles sont élevées dans des zones « isolées » et/ou peu touchées par les mortalités. En revanche, **en condition de mélange** en milieu relativement confiné (claire), elles se révèlent très sensibles et semblent amplifier le phénomène des mortalités, suggérant que la combinaison de l’infection intrinsèque (interne) et de la transmission horizontale externe **constitue un facteur de risque supplémentaire.**

Impact de la date de captage du naissain sur les mortalités

Des études menées en 2009 ont permis de suivre quatre lots de naissains, deux de captage précoce (juillet et août) et deux de captage tardif (septembre) issus des deux principales zones de captage en Charente, la Seudre et la Moulière. Les suivis de mortalité de ces lots montrent des performances de survie supérieures pour le captage précoce (60%) comparativement au captage tardif (20%). En outre, le naissain du captage tardif présenterait plus d'anomalies génomiques que le naissain de captage précoce ce qui pourraient constituer une fragilité de ce naissain voire une plus grande réceptivité aux agents infectieux (Benabdelouma *et al.*, 2010). Des différences significatives de survie (12% et 40%) ont été également observées en 2010 sur des naissains respectivement « tardif » et « précoce » triés en fonction de leur taille et non de la date de mise à l'eau des collecteurs (Benabdelmouna *et al.*, 2010, Glize *et al.*, 2010).

Date des transferts

En dehors des périodes de mortalité (différentes d'une zone à l'autre) si un lot est introduit sur estran, sa mortalité est nulle, quelle que soit son origine (captage naturel et éclosion) (Dégremont *et al.*, 2010). Cela ne permet pas, toutefois, de porter un pronostic de survie en année N+1.

L'immersion avant (printemps) et durant la période de mortalité donne des résultats variables. Toutefois, à la lumière d'une étude épidémiologique menée à Pénerf, il semblerait que la cinétique de mortalité soit différente pour les lots de naissains de captage mis après les épisodes de mortalité de juin : celle-ci est décalée dans le temps (effet dose du virus présent dans la zone ?). Les pourcentages de mortalité cumulée en septembre restent toutefois très proches de ceux des autres lots (Gaussem *et al.*, 2010). Ces résultats sont à confirmer.

Structures d'élevage : poches, densités, niveau d'exondation

Les études menées pour tester les niveaux d'exondation montrent que **l'émersion ne présente un réel avantage en terme de gain de survie** (de l'ordre de 20% de gain) **que si elle s'effectue sur des parcs de dépôts** (coefficients 25-35). Les parcs d'élevage « hauts » (coefficients 55-60), et même les parcs découvrant à des coefficients 45 semblent s'exonder insuffisamment pour permettre un gain de survie important. Ils permettent parfois un gain de survie de quelques %. Dans tous les cas, c'est bien sur les parcs les plus profonds (ne découvrant qu'aux coefficients 75-80 à 100) que la mortalité est la plus forte.

L'effet de la densité sur la survie n'est pas concluante et apparaît souvent contradictoire. Si des gains de survie existent parfois, dans tous les cas ils sont faibles (quelques % au maximum). Ces résultats sont sans doute dus aux facteurs antagonistes entre la densité et la survie en situation infectieuse : quand le lot d'huîtres en poche est « pré-sélectionné », la densité forte permet de décaler dans le temps l'installation de l'infection due à la contamination externe par les masses d'eau environnantes. Les mortalités cumulées observées sont, toutefois, très proches de celles obtenues avec des lots élevés à des densités plus faibles. En revanche, quand les huîtres sont infectées et « sensibles », le déclenchement d'un foyer infectieux à l'intérieur d'une poche, induit une mortalité d'autant plus rapide et importante que la poche présente une forte densité (Soletchnik *et al.*, 2010).

Conclusions

- 1. La date de captage et sa précocité pourrait permettre une meilleure survie du naissain en année N+1. Cette pratique permettrait d'obtenir des animaux déjà « pré-sélectionnés » vis-à-vis des mortalités.*
- 2. Les comparaisons entre naissains de captage et naissains d'écloserie (quelle que soit la ploïdie) montrent que les lots d'élevage « porteurs asymptomatiques de virus » sont capables en conditions isolées et à la température seuil de 16°C de développer la maladie et de subir des mortalités en l'absence de transmission horizontale par l'eau (claires et écloserie). En mélange, une fois ces mortalités initiées, les agents infectieux se transmettent par l'eau aux naissains « naïfs » d'écloserie et la mortalité dans tous les lots est rapide et plus intense. L'environnement direct des lots (ou « qualité du milieu d'accueil ») peut influencer la dynamique de diffusion et l'intensité des mortalités quelle que soit leur origine et leur statut sanitaire de départ (avant transfert).*
- 3. Ces informations traduisent bien la nécessité de connaître précisément l'historique d'un lot. Il est donc nécessaire de connaître précisément son origine (naturel et d'écloserie), les données d'élevage (origine, mortalité en année de captage N ou en nurserie, statut sanitaire, date de captage ou de production en écloserie..) mais également les caractéristiques du site d'accueil (densité du bassin, cartographie des huîtres en élevage, présence de gisements naturels, statut sanitaire de la zone, importance des transferts ...).*

4. Quelles solutions en dehors des sorties de crise

Trois pistes de sortie de crise à court et moyen terme ont envisagées depuis 2008 : 1) un plan de sauvegarde qui permet un approvisionnement en naissains triploïdes « R » (3n) présentant une meilleure survie face aux mortalités depuis 2010 et en 2011, 2) une introduction d'huîtres du Japon (après test de leur sensibilité au virus OsHV1 μ var) et 3) un plan de réensemencement qui a pour objectif d'introduire dans le milieu naturel des huîtres diploïdes plus résistantes qui permettront de relancer le captage naturel de naissains présentant une survie améliorée. Les études menées en 2010 permettent de faire des propositions complémentaires et confirment l'intérêt de travailler sur la sélection « contrôlée » en écloserie et naturelle : l'intérêt de la sélection en écloserie étant qu'elle permet de gagner du temps sur la sélection naturelle plus aléatoire du fait du nombre important d'huîtres de bancs naturels et d'huîtres en élevage, de sensibilité différente et inconnue, qui « dilue » et ralentit la sélection naturelle d'animaux résistants.

4.1. Existe-t-il des environnements moins touchés par les mortalités ?

Lors du suivi de quelques gisements sauvages dans le Pertuis Charentais, Le Moine *et al.* (2010) ont suggéré que **l'isolement d'un site sauvage par rapport aux sites d'élevage peut constituer une « barrière » à la diffusion des mortalités.**

D'autres essais ont été menés dans des zones en profondeur jusque là peu ou pas exploitées, notamment en mer ouverte profonde au large de Marseillan en 2009 et en 2010 (Pernet *et al.*, 2010) et en Poitou Charente (Bouquet *et al.*, 2010).

Alors que les mortalités touchent les huîtres cultivées dans l'étang de Thau, **les huîtres maintenues en mer à 18m de profondeur ne présentent aucune mortalité ; l'hypothèse étant que la température dans cette zone ne dépasse jamais les 16°C ou très rarement sur de courtes périodes.** Toutefois, ces huîtres maintenues ainsi « protégées » du risque de mortalité en mer ouverte, transférées dans l'étang de Thau, en paniers australiens, sont rapidement infectées par le virus herpès et *V. splendidus* et meurent à 80%. La mortalité est donc similaires à celle des mêmes huîtres âgées de moins d'un an, élevées directement en étagn. Par conséquent, **quelles que soient l'âge et la taille des huîtres à la date du transfert dans l'étang de Thau, elles restent « sensibles » aux infections qui génèrent des mortalités.** En revanche, les huîtres survivantes à la mortalité en 2009, dans l'étang de Thau, ne présentent pas de mortalité supplémentaire et survivent à plus de 90% en 2010. **Les huîtres ayant survécu à un épisode de mortalité ne sont pas sensibles l'année suivante.**

De même, les essais menés en Poitou Charente (Bouquet *et al.*, 2010) en claires et au large en cage à la profondeur de 26m sur des naissains de plusieurs origines (captage 2n et éclosion 3n) donnent le même type de résultats : **il est possible de « préserver » les huîtres des mortalités lorsque les lots sont élevés seuls et/ou dans des élevages en mer ouverte.** De même qu'à l'Etang de Thau, dès que ces huîtres sont transférées sur estran, elles présentent très rapidement des mortalités importantes. **La « protection » d'un lot vis-à-vis des mortalités en année N ne permet pas en année N+1 de le préserver des mortalités.** Peu de résultats sont disponibles en année N+2, mais on n'a pas constaté de mortalité particulière sur cette classe d'âge: la survie d'un lot jusqu'à la commercialisation peut donc s'estimer à partir de la survie en année N+1.

Des essais ont été également menés en Baie de Quiberon, pour étudier les modalités de propagation des mortalités et des infections par le virus OsHV1 dans ce milieu ouvert (Mazurié *et al.*, 2010). Le lot de naissain naturel utilisé sur les différentes concessions de professionnels était faiblement contaminé au début de l'expérience (1/150). Le virus n'a pas été détecté dans ces lots jusqu'au mois de juillet, date du début des mortalités lorsque la température a atteint le seuil de 16°C. **La mortalité et la propagation du virus (de juillet à septembre) sont apparues spatialement limitées (1/3 des concessions étudiées).** Les fortes mortalités observées étaient en relation avec une charge virale très importante de l'OsHV1 μvar . **Ces résultats montrent un gradient décroissant de la mortalité cumulée selon la distance aux secteurs d'élevage d'estran les plus proches.** La spatialisation des mortalités est, par ailleurs, sans lien apparent avec la nature du sédiment, la croissance des huîtres et la densité des huîtres alentour. **Elle paraît davantage liée au renouvellement des masses d'eau autour des concessions étudiées.** Ces résultats suggèrent que l'on peut déterminer des zones plus « protégées » à l'intérieur d'une zone même infectée. Ces résultats seront confirmés par l'étude de l'hydrodynamisme de la Baie de Quiberon en 2011 (Mazurié *et al.*, 2010).

4.2. Huîtres sélectionnées pour leur meilleure survie

Depuis 2001, des familles d'huîtres sélectionnées *C. gigas*, dites « R » pour présentant une meilleure survie aux mortalités estivales, ont toujours montré, depuis cette première et unique année de sélection, des mortalités significativement plus faibles que des lots témoins dans les sites répertoriés comme favorables aux mortalités estivales chez les juvéniles (Morest).

Dans le nouveau contexte des surmortalités 2008, une nouvelle génération d'huîtres sélectionnées (6^{ème} génération de reproduction – 1^{ère} génération de sélection) et des lots témoins ont été produits et testés sur estran en 2009 et/ou 2010. Les résultats obtenus montrent :

- des mortalités plus faibles pour les lots R (35%), et plus élevées pour les témoins (70%) après le test sur estran du naissain en 2009, **confirmant que la sélection réalisée en 2001 reste efficace dans le contexte des surmortalités 2008 et 2009 ;**
- une mise en place progressive de la « résistance aux mortalités » chez les huîtres sélectionnées et donc au virus OsHV1 μ var chez le naissain et le 18 mois, avec une résistance acquise pour plus de 90% des animaux « R » dès l'âge de 6 mois, alors que ce taux n'a pas dépassé 60% pour des huîtres témoins à 18 mois ;
- une faible mortalité (13-17%) pour le 18 mois (année N+1) en 2010 des animaux « R » et témoins survivants des mortalités 2009 au stade naissain. **Ces résultats confirment le maintien des bonnes performances de survie des huîtres « R » la seconde année d'élevage (N+1).**

En 2010, des naissains survivants de un an « R » et « T », issus d'un des tests sur estran en 2009 avec des mortalités de 19 et 57% respectivement, ont été suivies en laboratoire ainsi qu'un lot témoin de naissain « N » âgé de 6 mois n'ayant pas subi de mortalité et préservé en écloserie.

Au début de l'expérience en mars 2010, le virus OsHV1 μ var n'a pas été détecté dans le lot témoin « N » alors que 50% des huîtres témoins survivantes « T » et 4% des huîtres « R » survivantes étaient porteuses asymptomatiques 7 mois après l'épisode de mortalité 2009. Les huîtres « R » ou « T » pouvaient donc potentiellement constituer des réservoirs pour le virus. L'objectif était donc de vérifier cette possible transmission horizontale du virus d'huîtres « R » ou « T » d'un an vers du naissain naïf de 6 mois.

Trois mois après le début de l'expérience, les huîtres « N » naïves issues d'écloserie, élevées seules, n'ont pas présenté de mortalité ; lorsqu'elles étaient élevées en mélange avec les huîtres « R », aucune mortalité n'a été observée ; élevées en mélange avec les huîtres « T », elles ont subi 58 % de mortalité associée à la détection de quantités massives du virus OsHV1 après 3 mois d'expérience.

La transmission par cohabitation de la mortalité liée au virus OsHV1 n'a pas été observée entre des huîtres « R » porteuses du virus et des naissains « N » (naïfs issus d'écloserie) dans les conditions expérimentales de cette étude (Dégremont *et al*, 2010) contrairement aux huîtres « T » pourtant survivantes aux mortalités 2009.

Ces résultats démontrent le rôle de réservoir des huîtres « sensibles » survivantes âgées de un an et leur implication dans la transmission horizontale des mortalités aux naissains. Ils mettent également en lumière la capacité des huîtres « R » à réprimer le développement de l'infection (dans le cadre de cette expérience).

Pour poursuivre l'amélioration génétique vis-à-vis des mortalités, deux lots, nommés Agnas et Grève, ont été produits en mars 2010 en utilisant pour chaque lot, soit des parents ayant connu des mortalités en 2009 (lot A pour amélioré), soit des parents préservés des mortalités 2009 (lot T pour témoin). Les naissains de 3 mois ont été testés dès juin 2010 sur estran dans le bassin de Marennes-Oléron. En septembre, la survie du lot « Témoin Agnas » était de 4% contre 16% pour le lot « Amélioré Agnas ». Le même constat a été observé pour le lot « Témoin Grève » avec une survie de 13% contre 29% pour le lot « Amélioré Grève ».

Des résultats similaires ont été obtenus en Baie de Bourgneuf avec une survie de 4% pour le lot « Témoin Agnas » et 25% pour le lot « Amélioré Agnas ». Ainsi, **les descendants des lots**

utilisant comme parents les huîtres survivantes d'un épisode de mortalités ont montré une meilleure survie que les descendants des lots utilisant des parents n'ayant pas connu d'épisode de mortalité massive.

Ces résultats sont encourageants et confirment l'héritabilité du caractère et donc la possibilité d'améliorer la survie par la sélection.

4.3. Sélection naturelle

Suite à la demande de professionnels de l'Étang de Thau, une étude a été réalisée pour comparer les caractéristiques de survie de naissains produits localement à partir de géniteurs provenant de la Méditerranée (large), de télécaptage de larves provenant d'écloserie et de naissains provenant du captage naturel 2009. Les pourcentages de mortalité cumulée en octobre 2010 sont de 90%, 80% et 30% respectivement (Gervasoni, 2010). **Ces résultats semblent soutenir la mise en place, dans l'étang de Thau, d'une résistance dans les populations d'élevage par sélection naturelle.** Ils sont encore à confirmer. Ce site touché fortement par les mortalités est intéressant pour suivre la mise en place d'une sélection naturelle car il ne présente pas de gisements sauvages et son approvisionnement est essentiellement issu de naissains provenant d'écloserie.

5. Conclusions générales et recommandations

Ce bilan a été réalisé à partir des actions de recherche menées principalement en 2010 et tente de répondre aux questions et incertitudes existantes en 2009. Il précise les avancées scientifiques et techniques réalisées. Même si certaines questions sont soulevées, plusieurs conclusions fortes peuvent être proposées dès maintenant :

1. Tout d'abord, si les conditions climatiques particulières du printemps 2008 (et peut-être des années précédentes 2001-2006) pouvaient expliquer en partie les mortalités de l'été 2008, les analyses épidémiologiques plus fines réalisées par différentes équipes au niveau de diverses zones d'élevage montrent clairement **que le virus OsHV1 μ var joue un rôle prépondérant dans l'explication des mortalités 2010 et qu'il est clairement associé aux bactéries du genre *Vibrio splendidus*.** Le rôle respectif de ces agents reste toutefois à préciser. Ces conclusions suggèrent que de nouvelles mortalités sont à prévoir en 2011.

2. **Les résultats de 2010 confirment que la ploïdie (2n et 3n) ne modifie pas les performances de survie pendant la période à risque.** L'observation plus importante d'anomalies génomiques observées dans le naissain naturel, à partir du réseau biovigilance, même si elle n'explique pas de manière satisfaisante les surmortalités de 2010 pose la question des apports de substances polluantes (et/ou terrigènes) dans les bassins d'élevage. Différentes actions de recherche sont en cours. Il est important de rappeler que les anomalies génomiques n'ont aucun rapport avec l'utilisation de naissain d'écloserie et avec le développement des élevages d'individus triploïdes (Rapport Chevassus au Louis).

3. **Une influence nette du parcours zootechnique (historique du lot) et du statut sanitaire des naissains a été mise en évidence.**

Le taux de mortalité final pourrait donc être lié en partie à l'origine (captage naturel porteur asymptomatique et écloserie, à priori, « indemne », survie en année N, isolement faible ou fort, type d'élevage eau profonde, estran, claires, en mélange ou non...).

La survie peut être plus :

- **« importante » pour :**

1. **les naissains fortement touchés au cours de l'année de captage** quel que soit le statut de la zone d'accueil (infecté ou non). Ces résultats proposent une alternative intéressante pour les professionnels dans la mesure où les mortalités sur les collecteurs ont moins d'incidence économique que les mortalités au cours des élevages,
2. **les naissains de bancs naturels isolés, éloignés des zones d'élevage. Mais ils doivent rester dans des zones « épargnés des mortalités »,**
3. **les naissains « qualifiés indemnes » d'écloserie** mis en élevage dans une zone peu ou pas touchée par les mortalités (eau profonde, spatialement isolée). **Mais ils doivent rester dans des zones « épargnés » (marais, eau profonde, zone sans élevage, zone sanctuaire).** Ces choix techniques nécessiteront une réflexion sur la faisabilité économique d'un tel changement pour les entreprises ainsi qu'une réflexion approfondie sur le partage du littoral (AMP...).
4. **les naissains sélectionnés pour leurs capacités accrues de survie** (lignées « R » et « A » améliorées, par les programmes de sélection en cours), quelle que soit le statut de la zone d'élevage.

- **« moyenne » pour :**

1. **les naissains naturels peu touchés par les mortalités en année de captage N,**
2. **les naissains naturels en isolement faible, rapprochés des sites d'élevage infectés,**

- **« faible » pour :**

1. **les naissains « naïfs » (notamment d'écloserie) n'ayant pas subi de mortalité** et élevés en mélange avec des naissains naturels (porteurs) dans une zone touchée par les mortalités.

Il apparaît donc indispensable de mettre en place un dispositif de traçabilité et de certification sanitaire du naissain de captage et d'écloserie : plusieurs pistes sont envisageables, mais d'ores et déjà, l'épreuve thermique représente une avancée importante dans la mesure où elle permet de déclencher l'expression virale et donc de distinguer les naissains « sains », des naissains « porteurs asymptomatiques » et/ou infectieux.

4. **Les pratiques d'élevage (densité, bathymétrie..) ont un impact mineur sur les mortalités dans un milieu déjà très infecté.** Même si elles ne **modifient pas grandement la survie des lots de naissains**, l'organisation actuelle de l'ostréiculture présente une extrême vulnérabilité vis-à-vis de l'émergence de pathogènes nouveaux. L'importance des transferts inter-bassins et la pratique des transferts entre zones où apparaissent des mortalités et zones

apparemment moins touchées constituent de puissants facteurs de dissémination d'agents pathogènes émergents et vont à l'encontre de toutes les approches recommandées dans le domaine de la santé animale. De plus, l'absence d'informations systématiques sur de tels transferts (à défaut d'une réglementation) limite les études épidémiologiques et ne peut que retarder l'identification d'un nouveau phénomène pathologique. **La réduction de cette vulnérabilité de la filière, qu'elle résulte de l'organisation des professionnels, d'une intervention des pouvoirs publics ou de leur action conjointe (notamment dans la réflexion menée autour du nouveau schéma des structures), apparaît donc indispensable.**

5. Il apparaît également important de poursuivre les études épidémiologiques plus fines à l'échelle des différents bassins d'élevage pour **identifier les nouvelles zones potentielles qui pourraient être définies par l'analyse de l'hydrodynamisme.** Sans fournir de solutions « miracles » elles peuvent permettre de limiter les foyers infectieux **et de ralentir la dissémination des agents infectieux et donc la mortalité.**

6. A la lumière de l'ensemble des résultats obtenus depuis le programme Morest, **il semble primordial de poursuivre les recherches en sélection génétique, paramètre clé déterminant la survie des naissains,** et les actions plus fondamentales qui pourront déboucher à moyen terme sur de nouveaux marqueurs appliqués à la sélection. **Ces approches permettront aussi de définir si les phénomènes de co-infection peuvent induire un état d'immunodéficience et/ou de fragilité des naissains aggravant ainsi la virulence des Vibrio et/ou du virus OsHV1 μ var.**

6. Références bibliographiques

Arzul, I., Renault, T., Thébault, A. and Gerard, A., (2002). Detection of oyster herpes virus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* 84 (1-2), 151-160.

Chevassus-au-Louis, B., Bœuf, G., Bonhomme, F., Mathieu, M. (2009). L'utilisation de naissain d'écloserie, en particulier triploïde, en ostréiculture : analyse des conséquences sanitaires, environnementales, génétiques et zootechniques 15 mai 2009. Rapport au Directeur de Cabinet du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche

COMMISSION REGULATION (EU) No 175/2010 of 2 March 2010 implementing Council Directive 2006/88/EC as regards measures to control increased mortality in oysters of the species *Crassostrea gigas* in connection with the detection of Ostreid herpes virus 1 μ var (OsHV-1 μ var). Diagnostic methods of detecting OsHV-1 μ var. Official Journal of the European Union, OJ L 52, 3.3.2010, p. 12

Da Rosa, R., de Lorgeril, J., Piquemal, D., Bachère, E., (2011). Transcriptome profiling and biomarker discovery for prediction of survival capacity of the oyster *Crassostrea gigas*. (sous presse)

Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng N., Steven A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R.M., Renault, T., 2005. A novel class of herpes virus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86, 41-53.

De Decker S., Normand J., Saulnier D., Pernet F., Castagnet S. & Boudry P. (2010) Differential responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* challenge over the reproductive cycle (sous presse dans *Journal of Invertebrate Pathology*).

De Lorgeril, J., Zenagui R., Da Rosa, R., Piquemal, D., Bachère, E. (2011). Whole transcriptome profiling of successful defense response to virulent *Vibrio* infections in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using Digital Gene Expression (DGE). (sous presse)

Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Caro A, Got P, Romestand B, Givaudan A, Mazel D, Bachère E, and Destoumieux-Garzón D. (2010). The major outer-membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology*, 12:951-63.

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jacquino, S., Bachère, E. and Destoumieux-Garzón, D., (2011). Use of OmpU for attachment and invasion of host immune cells through opsonisation by the extracellular superoxide dismutase in the *Crassostrea gigas* / *Vibrio splendidus* interaction. *PNAS*, Jan 31.

Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Gueguen Y, Bachère E, Tanguy A, Moraga D, Fabioux C, Lindeque P, Shaw J, Reinhardt R, Prunet P, Davey G, Lapègue S, Sauvage C, Corporeau C, Moal J, Gavory F, Wincker P, Moreews F, Klopp C, Mathieu M, Boudry P, Favrel P (2009). Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics*, 10: 341.

Fleury E, Moal J, Boulo V, Daniel J-Y, Mazurais D, Hénaut A, Boudry P, Favrel P, Huvet A (2010). Identification of new genes associated with summer mortality in the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* 12: 326–339.

Le Deuff, R.M and Renault T., (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.* 80,1317-1322.

Miossec, L., G. Allain, et al. (2009). First results of an epidemiological study on oyster (*Crassostrea gigas*) mortality events in France during summer 2008. International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics XII, Durban, South Africa.

Pernet *et al.* 2010. Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009. Rapport intermédiaire, ADECOM. Avril 2010 - RST.DOP/LER/LR 10-008. p86.

Schikorski. D., Faury N., Pepin J.F., Saulnier D., Tourbiez D., Renault T. (2010). Experimental Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research*, Volume 155, Issue 1, p 28-34.

Segarra A., Pépin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, Volume 153, Issue 1, P 92-99

Saulnier D., De Decker S., Haffner P., Cobret L. Robert M. & Garcia C. (2010) Large scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial Ecology*, 59(4):787-798

Schikorski.D., N.Faury, J.F.Pepin, D.Saulnier, D.Tourbiez, T.Renault. (2010). Experimental Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* (2010).

Schikorski. D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pepin JF (2011). Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research*, (sous presse).

Présentations lors des journées du 1 et 2 décembre 2010 : bilan 2010 du projet surmortalité des huîtres creuses, *C. gigas*

Bachère, F. Aujoulat, D. Destoumieux-Garzon, R. Da Rosa, J. De Lorgeril, P. Got, M. Leroy, J-L. Jeannot, E. Jumas-Bilak, F. Pernet (2010). Implication des populations microbiennes pathogènes et commensales dans la santé et la capacité de survie de l’huître *Crassostrea gigas*. *Projet EC2CO Micro/Gigas (2010-2011)*. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Bedier (2010). Observatoire conchylicole : résultats 2010 et perspectives 2011. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Benabdelmouna, I. Hemissi, S. Robert, S. Bodin, C. Ledu et P. Laporte (2010). Etude comparative des caractéristiques cytogénétiques et des performances de survie de naissains sauvages issus du CAPtage PREcoce ou TARdif. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Benabdelmouna, T. Guyader et I. Hemissi (2010). Résultats de la campagne 2010 du réseau Biovigilance et de l'action CARTographie de l'Aneuploïdie dans les gisements naturels d'huître creuse du bassin de Marennes Oléron. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Benabdelmouna, T. Guyader, C. Ledu, P. Laporte, L. Degrémont (2010). Etude de la CINétique et Diffusion de la MORTalité (CINDIMOR) chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Bernard, O. Le Moine, J-Y. Stanisière, S. Pouvreau, P. Gouletquer et F. Dumas (2010). Choix d'un site de repeuplement d'huîtres en utilisant un modèle hydrodynamique : exemple des pertuis Charentais. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Blin (2010). Limiter les mortalités par la mise en place d'une zootechnie adaptée. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Blin. (2010). Observatoire des mortalités et des agents infectieux associés. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Bouquet (2010) Recherche de solutions zootechniques. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Bouquet et D. Mille (2010). Suivi des agents infectieux en Poitou Charente. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Dégremont, T. Guyader, F. Bordeyne, D. Tourbiez et J-F. Pépin (2010). Effet de l'amélioration génétique par la sélection sur la survie chez des juvéniles et des adultes *C. gigas*. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

F. Gaussem, J-Y. Stanisière, J. Mazurié, G. Allain et N. Cochenec-Laureau.(2010). Caractérisation de la dynamique spatio-temporelle du phénomène de surmortalités des naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en rivière de Pénerf (Morbihan). Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Francois, C. Garcia et J.P. Joly (2010). Résultats 2010 Réseau de Pathologie des Mollusques REPAMO. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Gervasoni (2010). Résistance du naissain produit localement : éclosion, télécapture, capture naturel. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Glize, C. Trotter, M. Montergous (2010). Potentialités d'endurcissement des juvéniles d'huître creuse sur estran et en marais salés. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Huvet, E. Fleury, C. Fabioux, J. Normand, J-Y. Daniel, V. Quillien, M-J. Garet-Delmas, C. Corporeau, V. Boulo, D. Mazurais, P. Favrel, L. Degrémont, C. Sauvage, S. Heurtebise, E. Flahauw, S. Lapègue, J-L. Nicolas, P. Boudry.(2010). Identification de gènes associés à la survie de l'huître *Crassostrea gigas* : perspectives pour la compréhension des mécanismes et la sélection génétique. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Madec, J. Normand, M-J. Garet-Delmas, M. Koken, J-L. Nicolas et C. Corporeau. (2010). Analyse des signaux protéiques de *Crassostrea gigas* associés aux mortalités. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Mazurié, J-Y. Stanisiere, A. Langlade, J-F. Bouget, E. Leclerc (2010). Demi – élevage en baie de Quiberon. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

P. Glize, M. Montergous (2010). Suivi de populations sentinelles en Baie de Bourgneuf. Recherche de "nouveaux" agents pathogènes. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Pernet, J. Barret, P. Le Gall, F. Lagarde, N. Keck, C. Segueineau, C. Quéré, C. Corporeau, A. Huvet, L. Degremont et J-F. Pépin (2010) Mortalités massives de l'Huître creuse dans l'étang de Thau: causes probables et perspectives. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Petton, C. Mingan, L. Le Brun, I. Quéau (2010). Qualification des naissains. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Pouvreau, I. Bernard, P. Boudry, F. Cornette, C. Corporeau, F. Dumas, A. Huvet, M-J. Garet-Delmas, S. Lapègue, L. Le Brun, O. Le Moine, P. Le Souchu, J. de Lorgeril, C. Mingant, B. Petton, I. Queau, C. Quéré, V. Quillien, C. Séguineau, J-Y. Stanisière. (2010) Les bancs d'huîtres sauvages : Intérêt de leur étude dans le cadre du phénomène des mortalités. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Renault, I. Arzul, B. Chollet, N. Faury, C. François, C. Garcia, P. Haffner, E. Omnes, J-F. Pépin, M. Robert, D. Saulnier, D. Schikorski, A. Segarra et D. Tourbiez (2010). Connaissance des agents infectieux : herpès virus et vibrions. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Roussel, Hélène Cochet, Gwenhael Allain, Morgane Nedelec (2010) Essais sur des pratiques de durcissement et d'isolement de naissains en Bretagne Sud. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Soletchnik, S. Robert, O. Le Moine, P. Geairon, J-L Seugnet. (2010). Etude de l'influence de l'altitude d'élevage (ou de captage ?) sur la survie du naissain d'huîtres creuses. Résultats issus d'observations et d'expérimentations (2009 et 2010). Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Soletchnik, S. Robert, J-F. Pépin, C. Lupo, P. Geairon, J-L. Seugnet, I. Bernard. (2010) SPATialisation de la Contamination des stocks sauvages d'huîtres creuses par le virus herpès OSHV-1 microvar, dans les pertuis charentais. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Stanisière, J. Mazuriè, A. Benabdelmouna, L. Degremont (2010). Intérêt de la modélisation « individus centrés » pour la compréhension des processus épidémiologiques de OsHV1 chez *Crassostrea gigas*. Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.

Thébault, D. Cuzzucoli et N. Cochenec-Laureau (2010). Modélisation dynamique des mortalités liées à Herpès virus sur les huîtres : compréhension des mécanismes pour les populations en situation de production (sur site ostréicole). Journée du projet « surmortalité des huîtres creuses ». 1 et 2 décembre 2010.