



Mars 2019

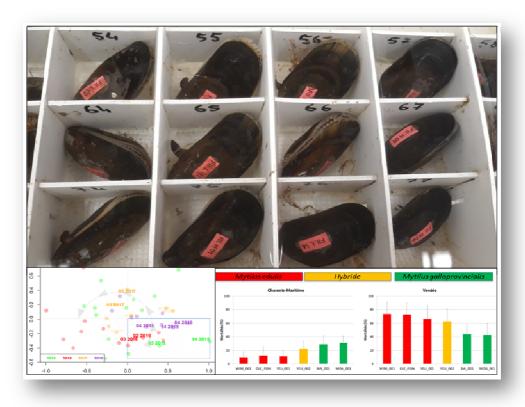


MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

- Département Ressources Biologiques et Environnement Unité SG2M, Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins ; Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture
- Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes
- Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais
- Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire
 Laboratoire Environnement Ressources Bretagne Nord
 ISEM, Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), Cnrs

Jean François Pépin, Abdellah Benabdelmouna, Nicolas Bierne, Jean François Bouget, Jean Michel Chabirand, Léo Chasselin, Lionel Dégremont, Philippe Geairon, James Grizon, Stéphane Guesdon, Jean-Baptiste Lamy, Christophe Ledu, Aurore Lejolivet, Olivier Le Moine, Elise Maurouard, Dimitri Morin, Julien Normand, Hubert Palvadeau, Aude Piraud, Stéphane Robert, Alice Saunier, Jean Luc Seugnet, Patrick Soletchnik, Delphine Tourbiez

Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles : description et facteurs liés -MORBLEU-



Rapport scientifique de l'étude MORBLEU, convention DPMA-Ifremer 2018

Convention DPMA 2018- IFREMER 18/2216164F





Fiche documentaire

Titre du rapport : Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles : description et					
étude des facteurs liés, action -MORBLEU-2018					
Référence interne : R.INT.RBE/SG2M-LGPMM-2019	Date de publication : 30/03/2019				
	Version: 1.0				
Diffusion :					
X libre (internet)	Référence de l'illustration de couverture				
restreinte (intranet) –	Benabdelmouna/ Guesdon/ Dégremont/2018				
interdite (confidentielle)	Langue(s): Français				
	NB : hormis le coordinateur, les auteurs sont				
	classés par ordre alphabétique.				
Résumé/ Abstract : <i>cf.</i> p 4-5	· · ·				
, ,					
Mots-clés/ Key words: Moules, Mytilus edulis, Mytilu	us galloprovincialis, mortalité, statut cytogénétique.				
anomalies génomiques, néoplasie hémocytaire, génoty					
diversité microbienne, Vibrio splendidus					
Comment citer ce document : Jean François Pépin,					
Bouget, Jean Michel Chabirand, Léo Chasselin, Lionel Dégremont, Philippe Geairon, James Grizon, Stéphane Guesdon, Jean-Baptiste Lamy, Christophe Ledu, Aurore Lejolivet, Olivier Le Moine, Elise Maurouard, Dimitri Morin, Julien					
Normand, Hubert Palvadeau, Aude Piraud, Stéphane Robert, Alice Saunier, Jean Luc Seugnet, Patrick Soletchnik,					
Delphine Tourbiez (2019). Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles : description et facteurs liés – MORBLEU. R.INT.RBE/SG2M-LGPMM. http://archimer.ifremer.fr/doc/					
THE TOTAL DESCRIPTION OF THE PROPERTY OF THE P					
Auteurs:					
Pépin Jean-Francois, Benabdelmouna Abdellah, Bierne Nicolas, Chasselin Léo, Dégremont Lionel, Guesdon Stéphane,					
Lamy Jean-Baptiste, Le Moine Olivier, Normand Julien, Robert Stéphane, Soletchnik Patrick					
Contributeurs :					
Bouget Jean-François, Chabirand Jean-Michel, Chollet Bruno, Garcia Céline, Geairon Philippe, Grizon James, Ledu					
Christophe, Lejolivet Aurore, Maurouard Elise, Morga Benjamin, Morin Dimitri, Palvadeau Hubert, Piraud Aude,					
Polseneare Pierre, Saunier Alice, Schmitt Anne, Seugnet Jean-Luc, Tourbiez Delphine, Marie-Agnès Travers					
DOI:					
DOI:					



Commanditaire du rapport : Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture -DPMA-				
Nom / référence du contrat : Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) Rapport définitif (réf. interne du rapport intermédiaire : R.INT.RBE/SG2M-LGPMM-2018/ARCHIMER)				
Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit: MOR	BLEU, Mytilobs, convention DMPA 18/2216164F			
Auteur(s) / adresse mail	Affiliation / Direction / Service, laboratoire			
Jean-François Pépin / <u>ifpepin@ifremer.fr</u>	(Ifremer/ODE/UL/LERPC) rattaché RBE/SG2M, Coordination MORBLEU)			
Abdellah Benabdelmouna <u>/Abdellah.Benabdelmouna@ifremer.fr</u>	(Ifremer/RBE/SG2M/LGPMM)			
Nicolas Bierne / nicolas.bierne@umontpellier.fr	ISEM, (UMR 5554), CNRS Université Montpellier2			
Léo Chasselin	(Ifremer/RBE/SG2M/LGPMM)			
Lionel Dégremont / Lionel.Degremont@ifremer.fr	(Ifremer/RBE/SG2M/LGPMM)			
Stéphane Guesdon/ Stephane.Guesdon@ifremer.fr	(Ifremer/ODE/UL/LERPC)			
Jean Baptiste Lamy /Jean.Baptiste.Lamy@ifremer.fr	(Ifremer/RBE/SG2M/LGPMM)			
Olivier Le Moine/ Olivier.Le.Moine@ifremer.fr	(Ifremer/ODE/UL/LERPC)			
Julien Normand/ Julien. Normand@ifremer.fr	(Ifremer/ODE/UL/LERN) rattaché RBE/SG2M)			
Stéphane Robert/ strobert@ifremer.fr	(Ifremer/ODE/UL/LERPC)			
Patrick Soletchnik / Patrick.Soletchnik@ifremer.fr	(Ifremer/ODE/UL/LERPC)			
Encadrement(s):				
Destinataire : DPMA				
Validé par : Christian Béchemin				



Résumé:

Depuis 2014, des épisodes de mortalité anormale affectent les cheptels mytilicoles tant adultes que juvéniles. Dès l'année 2015, une étude spécifique cofinancée par la DPMA et réalisée par l'Ifremer a été initiée, l'action de recherche MORBLEU (Mortalité des moules Bleues). Les années 2015- 2017 ont permis de dégager des éléments de connaissance et des pistes relatifs aux facteurs biotiques et abiotiques qui semblent intervenir dans le phénomène de hausse de mortalité des moules depuis 2014. Pour l'année 2018, les actions d'observation et de suivis du milieu et des moules ont été fortement réduites et trois axes principaux ont été poursuivis : i) l'étude de la relation entre l'évolution des équilibres microbiens planctoniques et l'apparition de mortalités de moules, ii) étude du lien entre la caractérisation cytogénétique de moules et l'apparition et la sensibilité aux épisodes de mortalité, iii) : Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité. Le travail de synthèse des résultats obtenus depuis 2015 et proposé initialement n'a pu être mené en 2018 et sera réalisé en 2019.

1-Description du phénomène de mortalité et son contexte environnemental

A travers les données de suivi du lot sentinelle de moules du réseau Mytilobs, on peut considérer 2018 comme une année qui présente des niveaux de mortalité modérés à fort, avec des valeurs supérieures à celles observées habituellement avant les épisodes de surmortalité de 2014 et, supérieures à celles constatées en 2015 et 2017.

Dans le suivi 2018, les secteurs de Maison Blanche et de Pont Mahé sont les plus affectés avec 80 et 50% de mortalité respectivement. Pour ce dernier site réputé « indemne » de surmortalité, on observe un accroissement régulier des niveaux de mortalité depuis 2015. Un « effet site » lié à des facteurs non définis est encore observé en 2018 et semble interagir avec les moules de toutes origines (lots sentinelles, lots expérimentaux, M. edulis ou M. galloprovincialis) pour le secteur de la baie de Bourgneuf. Dans cette zone l'expression des mortalités apparait plus précocement que sur les autres sites, avec un profil de mortalités chroniques qui s'étirent jusqu'en juin.

La caractérisation du contexte hydrologique permet de constater que les surmortalités d'intensité modérée à forte observées en 2014, 2015, 2016 et 2018 surviennent dans des périodes à fortes variations de salinité, contrairement à 2017 (année à faible niveau de mortalité). La température (particulièrement en hiver) semble également jouer un rôle important, notamment sur l'intensité des mortalités : les hivers chauds et stables de 2014 et 2016 présentent de fortes mortalités, ceux de 2015 et 2018 plus frais et variables sont caractérisés des mortalités plus modérées. L'environnement physique semble également agir sur les équilibres bactériens tant la singularité de leur évolution transparait au travers des années : opposition entre 2016 et [2015-2018] et 2017. Des analyses plus fines sur les équilibres microbiens et leur intégration dans le contexte hydro-climatique devraient permettre d'étayer un éventuel lien de ces communautés de bactéries et du phytoplancton avec les épisodes de mortalité de moules rencontrés depuis 2014 dans les Pertuis Charentais.

<u>2- Etude du lien entre la caractérisation génétique, histologique et cytogénétique de moules et la néoplasie disséminée</u>

i) Recherche du chimérisme génétique chez les moules bleues en France. Des travaux de génotypage associés à des analyses du statut cytogénétique par cytométrie en flux et des analyses histologiques sur des individus triés au préalable pour leur statut cytogénétique (majoritairement basse qualité) et issus de populations de moules ont été menés en 2017-2018. En parallèle, des travaux de génotypage ont également été menés sur des individus sans tri préalable issus de populations naturelles. L'objectif de ces analyses étaient de vérifier en croisant plusieurs techniques si des moules étaient affectées par des néoplasies affectant leurs cellules circulantes (hémocytes) et s'il existait une éventuelle concordance entre les résultats de ces différentes approches indépendantes. Un travail spécifique a été réalisé pour évaluer par deux méthodes de génotypages différentes, microsatellites et SNP, s'il existait une différence de génotype entre deux tissus, hémolymphe et branchie, d'un même individu. Au bilan, cette étude a permis de confirmer que les deux méthodes de génotypage biomoléculaire sont pertinentes pour caractériser des différences génétiques entre les deux tissus d'une même moule, signature d'une néoplasie en cours. Dans les populations de moules échantillonnées en 2016 et en 2017, la détection de néoplasies hémocytaires est confirmée par génotypage et par la cytométrie en flux en partie : il y a majoritairement concordance, les individus chimères présentent aussi des profils cytométriques anormaux. Les données de cytométrie obtenues sur l'hémolymphe des moules, croisées avec celles des génotypages démontrent la capacité de la cytométrie à pouvoir détecter et caractériser précocement des anomalies cytogénétiques et des processus néoplasiques hémocytaires chez la moule bleue.

ii) **En histologie**, sur des lots communs à ceux génotypés par microsatellites, aucun organisme pathogène d'importance n'a été observé (distinguable en histologie) excepté sur un lot du Pas de Calais, où le parasite à déclaration obligatoire Marteilia refringens a été détecté pour la première fois dans ce secteur. De même, aucun lien n'a été mis en évidence entre le statut cytogénétique des moules et les lésions observées en histologie.

Suivi individuel de l'évolution du profil cytométrique et relation avec le profil histologique. En 2018, une étude a été réalisée en combinant deux approches, la cytométrie en flux –méthode non létale permettant un suivi de chaque moule et l'histologie, afin de déterminer : i) si le statut cytogénétique d'un animal donné évoluait ou pas dans le temps? ii) si l'évolution du profil cytométrique d'un animal donné se traduit par des effets sur la structure histo-cytologique des tissus de cet animal? Les résultats acquis sur des moules triées au préalable au cours d'un suivi sur une année ont permis



d'établir quatre catégories de moules selon l'évolution de leur statut cytogénétique par cytométrie et l'analyse finale par histologie. Les moules mortes présentent des lésions tissulaires (infiltrations hémocytaires et granulomes) dont l'intensité semble liée à la complexité du profil cytogénétique. Cette étude a permis de montrer à l'échelle de l'individu l'évolution dans le temps des anomalies cytogénétiques et des processus néoplasiques.

4-Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épisodes de mortalité

Testage de la survie de 100 familles de moules sur estran. En 2017-2018, une expérimentation a été menée dans la continuité des travaux initiés en 2016, pour comparer et comprendre la variabilité de réponse de moules de plusieurs gisements naturels face aux épisodes de mortalité. 100 familles de moules ont été produites en janvier/février 2017 par croisement entre des parents issus de populations provenant de gisements de moules de plusieurs origines françaises et des deux espèces présentes en France (Mytilus edulis et M. galloprovincialis). Ces familles ont fait l'objet d'un testage sur différents sites réputés pour avoir depuis les épisodes de 2014 des niveaux de mortalité de moules contrastés. Dans le site présentant des mortalités anormales chez les moules bleues : -les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités significatives, M. edulis (70%) présente des mortalités plus importantes que M. galloprovincialis (43%). Dans le site ne présentant pas des mortalités anormales les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités faibles mais l'espèce M. galloprovincialis (30%) présente des mortalités plus importantes que M. edulis (10%). Par ailleurs, des données par espèces et populations suggèrent des différences de résistance face aux mortalités entre les familles.

Etude de la sensibilité des familles de moules à une infection bactérienne expérimentale. -Les performances de survie des familles dans le site de Maison Blanche ont été comparées à celles obtenues en infection expérimentale contrôlée en laboratoire afin d'infirmer ou confirmer le rôle d'agents pathogènes identifiés comme potentiellement responsable des mortalités in situ. Les données de ces tests infectieux avec une souche de Vibrio splendidus montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux de survie observés sur l'estran à Maison Blanche et ceux obtenus expérimentalement suite aux injections de la bactérie. La souche de Vibrio splendidus isolée au cours d'un épisode de mortalité en 2014 et testée au cours de nos essais d'infection expérimentale n'est probablement pas la cause majeure des mortalités anormales rencontrées dans les sites mytilicoles.

Au-delà de la compréhension du phénomène des mortalités de moules et des données scientifiques acquises par l'ensemble des recherches conduites depuis 2015, les résultats et les précisions apportées sur les facteurs associés aux mortalités de moules dans le cadre de l'action MORBLEU devraient concourir à établir un lien entre ces connaissances et les actions à mettre en œuvre pour éviter, réduire ou compenser l'impact des mortalités sur les cheptels de moules. Une synthèse de l'ensemble des données sera produite en 2019.



Liste des figures

Figure 1 : Position des sites ateliers de la campagne 2018 du Mytilobs et proportion de mortalité exprimée en pourcentage de l'effe	
initial (données Bulletin du Mytilobs 2018)	p16
Figure 2 : Positionnement interannuel des années 2000 à 2018 sur la base des températures atmosphériques (axe vertical	
orécipitations hivernales (axe horizontale) mesurées à la station Chassiron (Météo-France). Les données résultent d'agrégat hebdomadaires de données tri-horaires. Les années 2014, 2015, 2016, 2017 et 2018 sont illustrées en couleur bleue, verte, rouge, ora	
et violette respectivement	
Figure 3 : Évolution des températures (a) et des salinités (b) journalières (agrégées à partir des mesures in situ à haute fréque	ence
d'acquisition à la station Filière W) de 2014, de 2015, de 2016, de 2017 et de 2018 représentées par les lignes bleues, vertes, rou	
oranges et violettes respectivement. Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" au regard	
l'historique de 2008 à 2017. Situées dans la zone jaune supérieure, les valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone ja	
inférieure, où les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualij	
d'exceptionnelles	p19
Figure 4 : Chroniques de températures (a) et de salinités (b) observées sur 5 stations suivis dans le cadre du projet Mytilobs en 2018 :	
valeurs issues de mesures in situ enregistrées à haute fréquence d'acquisition et agrégées à la journéeé	
Figure 5 : Dynamique des abondances totales de microphytoplancton et de l'indice de diversité de Shannon, des mois de janvier à aoû	
2014 (a), 2015 (b), 2016 (c), 2017 (d) et 2018 (e) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton (Ifremer/Quadrige). Les bar	
verticales (polygones) de couleur (bleue, verte, rouge, orange et violette pour 2014, 2015, 2016, 2017 et 2018 respectivement), illust	
la période estimée de début de mortalité de moules s'appuyant sur le base d'informations de terrain des professionnels et des su	
conchylicoles de l'Ifremer (notamment Mytilobs, MORBLEU) Figure 6 : Positionnement multidimensionnelle (nMDS) des différentes unités taxonomiques (OTU) de bactéries identifiées pa	
technique du métabarcode d'ADN (dite eADN). Le graphique (a) montre le profil saisonnier retrouvé à partir des 4 années d'étu	
chaque couleur du bleu au rouge en passant par le bleu, le vert et l'orange définissant les mois de février à juillet. Sur la même bas	
données, le graphique (b) illustre les spécificités interannuelles (en vert, rouge, orange et violet pour 2015, 2016, 2017 et 2	
respectivement) ; le cadre bleu permet d'identifier une zone où sont retrouvés certains cortèges bactériens aux dates estimées de de	ébut
de mortalités printanières	p24
Figure 7 : Vue d'ensemble des deux campagnes d'échantillonnages et des mesures associées à chacun d'elles	
Figure 8 : Cartes thermiques (heatmap) de la campagne CP_ABD typé avec les 8 microsatellites. La distance utilisée est la distanc	
Bruvo adaptée à des marqueurs multi-alléliques et permettant de comparer des individus ayant des dosages alléliques différents. (1	-
gauche la carte thermique avant correction et (B) à droite la carte thermique après correction. Plus la couleur est chaude (rouge)	
les deux échantillons comparés sont similaires en terme génétique. Les cercles rouges pointent des segments inattendus. Les cercle	
tirets orange désignent les populations issues de sélections massales Figure 9 : (A) Boites à moustaches représentant les différences alléliques au sein des individus entre l'hémolymphe et la branchie.	
Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe. Les données individuelles ont été reportée	
gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses pour faciliter la lecture. Le type de marqueur est le microsatellite	
Figure 10 : (A) Boites à moustaches représentant le nombre de locus différents (SNP) par individu entre un échantillon provenant de	
hémolymphe et de sa branchie. Gills (B) Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe.	
données individuelles ont été reportées en gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses pour faciliter la lecture	
Figure 11 : (A) Boites à moustaches représentant le nombre de locus différents par individu entre un échantillon provenant de	
hémolymphe et de sa branchie. (B) Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe.	
données individuelles ont été reportées en gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses pour faciliter	
lecture Figure 12 : Graphique à bulles représentant le nombre d'individus (rayons du cercle) en fonction du nombre de différences alléliques ()35 (4 D
issu des 8 microsatellites) et du nombre de locus différents (LD, issu des 101 SNP) entre les deux échantillons intra-indiv	lAD, vidu
(comparaison H-T)	
Figure 13 : Graphique la qualité cytométrique des individus (couleur, plus la couleur est chaude plus les individus sont anormaux	:) en
fonction du nombre de locus différents (LD, issu des 101 SNP) en abscisses et du nombre de différence alléliques (AD, issu de	
microsatellites) en ordonnée entre les deux échantillons intra-individu (comparaison H-T)H-T)	
Figure 14 : Profil cytométrique de la moule Brv04 avec une basse qualité cytogénétique. En plus des noyaux diploïdes normaux (RN1)	
autres noyaux sont aneuplo-polyploïdes compris dans une vaste gamme de ploïdie (double flèche rouge, RN2)	
Figure 15 : Profil cytométrique de l'individu Pal07. En plus des noyaux diploïdes normaux (flèche verte), les autres noyaux non-diplo	
sont légèrement hyperdiploïdes (2n,3n, flèche rouge)	
Figure 16 : Profil cytométrique de l'individu Pal30. En plus des noyaux diploïdes normaux (flèche verte), les autres noyaux non-diplo	
les plus représentés sont des noyaux néoplasiques à très haut niveau de ploïdie, 9-10n (flèche rouge) Figure 17 : moules identifiées par une étiquette collée sur la coquille permettant de déterminer le lot (Filières) et l'individu (Fil H/L	
tout le long de la période du suivi jusqu'à sa mort	
Figure 18 : Profils cytométriques HCQ (type a) obtenus pour la moule Yeu35 lors des différentes dates d'analyses (a : octobre 2017	
février 2018, c : avril 2018, d : juillet 2018)	
Figure 19 : Coupe histologique normal d'une moule HCQ ne montrant aucune anomalie notable	
Figure 20 : Profils cytométriques LCQ-p (type b1) obtenus pour la moule Pen12 lors des différentes dates d'analyses (a : septembre 20	017,
b : janvier 2018, c : mars 2018)	
Figure 21 : Coupe histologique d'une moule LCQ-p montrant des infiltrations hémocytaires (IH) très étendues	
Figure 22 : Profils cytométriques LCQ-t (type b2) obtenus pour la moule Fil 32 lors des différentes dates d'analyses (a : février 2018	
mai 2018, c : juillet 2018, d : août 2018) Figure 23 : Coupe histologique d'une moule LCQ-t montrant des infiltrations hémocytaires (IH) et des granulomes étendus (G)	
Figure 24 : Profils cytométriques Néo (type c) obtenus pour la moule Brev14 lors des différentes dates d'analyses (a : octobre 2017	
rigure 24. i rojus cycometriques Neo (type cycotenus pour la moute brevi4 nois des aujerentes autes a analyses (a . octobre 2017 mai 2018, e : iniliat 2018, d : iniliat 2018, e : anit 2018). La flèche rouge indigue la nonulation de novaux némbaciques	, D. n57



Figure 25 : Préparation histologique issue d'une moule néoplasique (Néo) montrant le remplacement pratiquement total des hémocytes
normaux (flèche noire) par des cellules néoplasiques de très grande taille ayant un rapport nucléocytoplasmique réduit et des noyaux
pléomorphes et hypertrophiés
Figure 26: (a) profil cytométrique de moules avec les différents types cellulaires, aneu-polyploïdes caractéristiques du statut LCQ et
polyploïdes de très haut niveau de ploïdie caractéristiques du statut Néo (ex. RN2, noyaux entre 12-16n). (b) Préparation histologique
d'une moule au profil cytométrique intermédiaire présentant à la fois : des infiltrations hémocytaires et un granulome (flèches noires),
des grandes cellules néoplasiques à noyaux pléomorphes caractéristiques du statut Néo (flèches
bleues)p58
bleues)p58 Figure 27 : Evolution mensuelle des stades de développement gonadique des moules du lot sentinelle Mytilobs au site des Filières dans le
Pertuis Breton. Le premier pic de mortalité apparait aux stades 3A, 3B précurseurs des pontes. (a) Campagne 2014-2015 à mortalité
modérée, (b) Campagne 2015-2016 à forte mortalité. Les spots bleus indiquent le niveau des mortalités cumulées du
lotp61
Figure 28 : Evolution des mortalités (% ± écart-type entre les réplicas) du lot témoin (Control) et du lot «sélectionné» (Selected) en
première génération de sélection massale, et température de l'eau de mer (°C) sur les sites Le Fiol (panel A) et La Plaine-sur-Mer de
septembre 2016 à Juillet 2017p65
Figure 29 : Localisation des populations de moules échantillonnées pour la production des 100 familles (du nord au sud : Wim_001,
Mog_001, Yeu_001 & Yeu_002, Ole_Pon, Bia_001)p66
Figure 30 : Localisation des quatre sites de testages des 100 familles de moules (du nord au sud : Baie des Veys, La Plaine-sur-Mer,
Maison Blanche et La Floride)p67
Figure 31 : Evolution des mortalités (moyenne et intervalle de confiance à 95%) du lot de moules constitués d'un mélange de 50 moules
par famille sur le site de La Plaine-sur-Mer d'octobre 2017 à juillet 2018. Suivi réalisé par le SMIDAPp68
Figure 32 : Mortalités d'octobre 2017 à juin 2018 pour les moules testées à la Maison Blanche (a) par population (b) par espècep68
Figure 33 : Mortalités d'octobre 2017 à juin 2018 pour les moules testées à La Floride (a) par population (b) par espècep69
Figure 34 : Mortalités moyennes (intervalle de confiance à 95%) au point final en juin 2018 par espèce et par sitep70
Figure 35 : Comparaison entre les mortalités observées en infection expérimentale pour des moules injectées avec une souche virulente
de Vibrio splendidus (14/053 2T1) et les mortalités observées à la Maison Blanche en juin 2018p72
Figure 36 : Comparaison entre les mortalités observées en infection expérimentale pour des moules injectées avec une souche virulente
de Vibrio splendidus (14/053 2T1) et les mortalités observées à la Maison Blanche en juin 2018. a: M. edulis, b : Hybride, c : M.
galloprovincialis
Figure 37 : Carte présentant pour les secteurs Morbihan, Loire Atlantique et Vendée les sites de prélèvements et de suivis de moules
relatifs aux actions de - Observation de la dynamique des épisodes de mortalité-2018 - et -Caractérisation des bases génétiques de la
surviep80
Figure 38 : Carte présentant pour les secteurs Vendée et Charente Maritime, les sites de prélèvements et de suivis de moules relatifs aux
actions de Observation de la dynamique des épisodes de mortalité-2018 - et -Caractérisation des bases génétiques de la surviep81
Figure 39 : Obtention des lots de moules contrastés pour le paramètre la surviep83



Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution depuis 2014 des niveaux de mortalité cumulée (%) lors des suivis du Mytilobs en lien avec les sites ateliers MORBLEU (ND, absence de données).)p15
Tableau 2 : Liste des populations échantillonnées pour la campagne CP_ABD, code, site origine, coordonnées, espècep29
Tableau 3 : Liste des populations échantillonnées pour la campagne CP_JB, code, site origine, coordonnées, espècep30
Tableau 4 : Détails du nombre d'échantillons envoyés et des comparaisons possibles sur les différents jeux de donnéesp31
Tableau 5 : Détails du nombre d'individus de la campagne CP_JB (moules non triées) par site de prélèvement et génotypés (SNP), du nombre d'individus supposés atteints en prenant le seuil de LD > 5 et la prévalence instantanéep36
Tableau 6 : Bilan du nombre d'individus désignés comme atteints en fonction des différents outilsp39
Tableau 7 : Origine des lots de moules reçus pour analyses histologiquesp44
Tableau 8 : Organismes pathogènes observés sur les différents sites au cours de l'étudep46
Tableau 9 : Lésions tissulaires observées sur les différents sites au cours de l'étude 2017p48
Tableau 10 : Données des campagnes 2015 et 2016 du Mytilobs pour la recherche de granulomes avant et pendant la période de ponte des moules au site Filièrep62
Tableau 11 : Nombres de familles produites par espèce et populationsp60
Tableau 12 : Protocole du testage des 100 familles de moulesp67
Tableau 13 : Statistiques descriptives des mortalités observées (%) au point final en juin 2018 à Maison Blanche et à La Floridep71
Tableau 14: Liste des différents stades sexuels gonadiques chez la moules d'après Lubet, 1959;p82



Sommaire	p 9
1. Introduction générale 1.1. Rappel et contexte 1.2. Objectifs 1.3. Stratégie de bancarisation et de mise à disposition des données 1.4. Eléments de communication du projet MORBLEU en 2018	p11 p12 p13 p13 p14
2. Objectif 1. Décrire le contexte environnemental associé aux épisodes de mortalité de moules relation entre l'évolution des équilibres microbiens et l'apparition des mortalités	: p15
 2.1. Observation de la dynamique des épisodes de mortalité -2018 : mortalités observées sur le lot de mosentinelle 2.2. Caractérisation du contexte environnemental 2.2.1. Contexte hydro-biologique des élevages 2.2.1.1. L'environnement abiotique : situation climatique interannuelle et en 2018 2.2.1.2. L'environnement biotique : évolution des équilibres microbiens 	p15 p17 p17 p18 p21
3. Objectif 2. Evaluer des facteurs intrinsèques à l'hôte favorisants les mortalités : étude du lien la caractérisation cytogénétique et histologique de moules et la néoplasie disséminée	p26
 3.1. Recherche du chimérisme génétique comme traceur d'un processus néoplasique chez les moules ble France 3.1.1. Aspects génétiques et cytométriques pour l'étude de la néoplasie 3.1.2. Etude par histologie des lots de moules utilisés en 2017 dans certaines actions de MORBLEU 3.1.2.1. Observation d'organismes pathogènes 3.1.2.2. Observation de lésions tissulaires a. Observation de néoplasie hémocytaire b. Observation de lésions au niveau des follicules gonadiques c. Autres lésions 	pues en p26 p26 p44 p45 p46 p46 p47 p47
3.2. Anomalies cytogénétiques : suivi individuel de l'évolution du profil cytométrique et relation avec le phistologique	profil p50
3.3. Etude par histopathologie de lots de moules sentinelles utilisés en 2016 : statut physiologique, gamétogenèse et lésions tissulaires	p61
4. Objectif 3 : Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épiso	odes
de mortalité 4.1. Seconde opération de sélection massale 4.2. Suivi de la survie et croissance de 100 familles dans cinq sites 4.2.1. Populations étudiées et familles produites 4.2.2. Testage des familles 4.2.3. Suivi du statut cytogénétique 4.2.4. Paramètres génétiques de la survie des moules lors d'épisodes de mortalités 4.2.5. Etude de la sensibilité des familles de moules à une infection bactérienne expérimentale	p64 p64 p66 p66 p66 p70 p70 p70
5. Conclusions 5.1. Description du phénomène de mortalité et son contexte environnemental 5.2. Etude du lien entre la caractérisation génétique et cytogénétique de moules, la néoplasie disséminée et l'apparition de mortalités 5.3 Agents pathogènes associés aux moules étudiées 5.4. Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épisodes de mortalité	p76 p75 p75 p75 p77 p77
6. Références citées	p78
7. Annexes	p80



Unités et Réseaux partenaires

- -**Mytilob**s- Réseau d'observation mytilicole, LERN (https://wwz.ifremer.fr/lern/reseaux-d-Observatoire-Mytilicole)
- -REPHY- Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton (http://envlit.ifremer.fr/surveillance/phytoplancton phycotoxines/presentation)
- **-LGPMM** Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins de la Tremblade, (http://wwz.ifremer.fr/sg2m/Laboratoire-de-Genetique-et-Pathologie-des-Mollusques-Marins)
- **-LER-PC** Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais, l'Houmeau et La Tremblade, (https://wwz.ifremer.fr/lerpc/)
- -LER-MPL- Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire, Trinité sur mer et Nantes (https://wwz.ifremer.fr/lermpl/)
- -**LER-BN** Laboratoire Environnement Ressources Bretagne Nord de Dinard (https://wwz.ifremer.fr/bretagne.nord/)
- **-LSPC** Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture de Bouin (http://wwz.ifremer.fr/sg2m/Laboratoire-Securisation-des-Productions-en-Conchyliculture)
- -RIC- Ressources Informatiques et Communications de Brest (https://wwz.ifremer.fr/Recherche-Technologie/Departements-scientifiques/Departement-Infrastructures-de-Recherche-et-Systemes-d-Information/Activites/Bioinformatique)
- -ISEM- Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, CNRS-UM2 UMR 5244 (www.isem.univ-montp2.fr/recherche/equipes/speciation-evolution-et-adaptation-en-milieu-marin/)

Collaborations:

- -INRA-GENOTOUL, plateforme de séquençage PlaGe, Toulouse,
- -Laboratoire **LSPT** UMR **EPOC** de l'Université de Bordeaux1 (http://www.epoc.u-bordeaux.fr/index.php?lang=fr&page=eq lptc1)
- -**SMIDAP** Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire (http://www.smidap.fr/missions-conchyliculture.html)
- -Conseil Départemental de Charente Maritime
- -Conseil Départemental de Vendée

Remerciements:

DDTM/DML, 85, 17, 44

Réseaux Mytilobs, Repamo, REPHY

Direction des Phares & Balises de la Rochelle, équipages de L'ESTREE et du LAVAGON

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

Benoît et François Durivaud, mytiliculteurs à Charron

Mickaël Vérine, mytiliculteur du Pertuis Breton

Laurent Hurtaud, mytiliculteur du Pertuis Breton

M. Baudet, mytiliculteur à Boyard

Sylvain Chiquet mytiliculteur à Pénestin

Gilles Fouché mytiliculteur à Pénestin



1. Introduction générale

En 2014, dans un contexte hivernal perturbé (Polsenaere *et al.*, 2017), des épisodes de mortalité d'une ampleur anormale ont affectés les cheptels mytilicoles de Charente maritime et de Vendée avec des pourcentages de mortalité pouvant atteindre 100% dans certains secteurs (Béchemin *et al.*, 2015). Depuis, des mortalités sont observées chaque année et le phénomène s'est étendu en remontant le littoral Atlantique vers le Nord (de la Charente Maritime, Vendée, Pays de Loire, jusqu'en Bretagne Nord¹). Toutefois, une grande variabilité est observée dans le temps (saisons et années) et dans l'espace (sites mytilicoles).

A partir de 2015, une étude cofinancée par la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA) a été réalisée par l'Ifremer : MORBLEU, MORtalité des moules BLEUes. Elle a été initiée dans les pertuis charentais et la baie de Bourgneuf. Elle a pour objectifs d'explorer et d'identifier des facteurs corrélés et potentiellement impliqués dans les épisodes de mortalité de moules observés : facteurs environnementaux (biotiques, abiotiques et hydrodynamiques), facteurs intrinsèques aux animaux (traits d'histoire de vie, fond génétique, caractéristiques cytogénétiques et physiologie) en lien avec des agents infectieux potentiels. Cette action de recherche se poursuit depuis.

L'action MORBLEU a été ainsi reconduite en 2016, en 2017 puis en 2018 afin de poursuivre l'analyse des données collectées et renouveler des campagnes d'observation *in situ* pour acquérir de nouvelles données (description du phénomène, caractérisation environnementale et hôtes). Parallèlement, des hypothèses ont été formulées quant aux facteurs liés aux animaux ou à leur environnement susceptible de favoriser la transmission et la sensibilité à des maladies, dont celles dues aux organismes pathogènes présents sur le littoral. L'importance de certains de ces facteurs a été en partie évaluée par des analyses et des essais expérimentaux en lien avec les hypothèses ciblées.

Ainsi, fin 2016, les pistes majeures explorées permettent de retenir les éléments suivants :

- pour la deuxième année consécutive, à partir de neuf populations de moules *in situ (cf. rapport MORBLEU 2016, § 3.2.3)*, il est mis en évidence que de forts taux d'anomalies cytogénétiques (anomalies de la quantité d'ADN, de 3 à 23% des lots de moules testés) dans les cellules hémocytaires avant les épisodes de mortalité sont corrélés pour certains lots testés avec les niveaux de mortalité observés ensuite dans des installations expérimentales ou sur estran ;

les hypothèses ciblées.

- découverte de rares individus chimères génétiques *edulis/edulis* qui pose l'hypothèse d'un potentiel processus néoplasique transmissible chez cette espèce ;
- confirmation répétée de la « rusticité » et du potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité : des niveaux de survie différents sont obtenus selon l'historique et l'origine de lots.
- bien que d'amplitude variable selon les sites, le phénomène semble « s'installer » et affecte de nouvelles zones vers le nord (Le Fiol, Maison Blanche, La Plaine sur Mer, cf. Fig. 37) ce qui suggère un processus en cours de développement, transmissible et dont l'expression semble modulée par des conditions saisonnières et/ou site-dépendant;
- les années à forte mortalité récentes apparaissent associées à un contexte environnemental présentant des conditions hivernales plutôt chaudes et pluvieuses ;
- détection de bactéries du groupe V. splendidus lors des épisodes de mortalité de moules;

¹ Données : rapport CRC Bretagne nord –Les mortalités de moules en 2014 et 2015 vues par les professionnels- Armeria, Eureka, Ecume, février 2016 ; Journée SRC Bretagne nord –Bilan des connaissances sur les mortalités de moules, Bilan 2016- Armeria, Eureka, Ecume, 6 avril 2017, Vivier sur mer.



- absence de relation directe entre les mesures de contaminants, le matériel dissous et les niveaux de mortalités relevés sur les sites suivis.

Les données acquises à ce stade, montrent que l'environnement semble bien pouvoir moduler l'intensité des mortalités à travers des relations de type : [température – maturation – mortalités] et/ou [température – équilibre et interaction bactérienne/phytoplanctonique – mortalités]. Ces pistes restent à étudier plus précisément afin de comprendre s'il s'agit là de concomitances évènementielles ou s'il existe des facteurs déterministes (à effets directs ou indirects) en relation avec les mortalités de moules.

De plus, les éléments acquis en 2015 et 2016 sur les facteurs liés à l'animal ont justifié une approche spécifique et renforcée en 2017 ayant pour finalité d'approfondir les hypothèses relatives à la génétique des moules et aux causes possibles de la variabilité du statut cytogénétique en lien avec un possible processus néoplasique hémocytaire :

- i) Les anomalies génomiques sont-elles associées ou liées au développement d'un processus néoplasique ?
- ii) Les anomalies génomiques confèrent-elles une plus grande sensibilité aux infections bactériennes?
- iii) Les récentes anomalies génomiques décrites et/ou les néoplasies hémocytaires observées chez les moules en France constituent-elles des facteurs de risque ou plus (facteur causal) ?

L'année 2017 a été mise à profit pour caractériser la distribution géographique des anomalies cytogénétiques à partir d'un large échantillonnage au long du littoral Atlantique et de la Manche. Cet échantillonnage a permis également d'étudier la diversité génétique (espèces, hybrides, chimérisme) des populations de moules sauvages ou en élevage. Il a permis aussi de produire des lots de moules contrastés pour tester et caractériser *in situ* une certaine résistance face aux épisodes de mortalité éventuels. Ces données devraient aider à déterminer les bases génétiques de résistance au phénomène. Les travaux relatifs à ces problématiques et à ce matériel biologique ont été largement poursuivis en 2018 et les résultats complémentaires obtenus figurent dans le présent rapport, bilan de l'année d'étude 2018.

Au-delà d'une contextualisation des mortalités observées en 2018 sur le littoral, le présent rapport n'aborde pas de piste nouvelle, il a pour but d'indiquer les résultats obtenus en 2018 dans la continuité de l'étude MORBLEU.

Nota bene :

- -Les pistes étudiées en lien avec les mortalités de moules montrent qu'il n'y a pas de risque pour la santé des consommateurs.
- -Les conclusions de chaque partie du présent rapport n'engagent que leurs auteurs respectifs et n'engagent pas implicitement les différents laboratoires impliqués dans le projet MORBLEU à une caution unanime des interprétations proposées.

1.1. Rappel et contexte

Le présent rapport est réalisé dans la continuité des trois précédents (2015, 2016, 2017). 2017 a été une année avec les plus faibles niveaux de mortalités de moules sur la côte Atlantique depuis 2014. Dans ce contexte, pour 2018, le dispositif d'observation et de suivi sur le terrain a été très fortement réduit pour ne conserver en propre que le suivi des flores microbiennes planctoniques et les mesures physico-chimiques en haute fréquence dans les Pertuis Charentais. Cependant, l'étude MORBLEU 2018 a conservé le même intérêt et la même **stratégie de mutualisation** que les années précédentes, qu'il s'agisse des données partagées, des mesures, des moyens à la mer qui ont été produits ou opérés par le REPHY Observation/DCE ou le réseau Mytilobs par exemple.



Le détail des dispositifs de suivi sur le terrain mis en place, les protocoles et les « matériels et méthodes » restant identiques aux trois années précédentes, ils ne seront pas décrits dans le présent rapport et le lecteur pourra les retrouver pour partie dans les rapports 2015 et 2016 en ligne sous les liens ci-après (Travers et al., 2016. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais : description et facteurs liés – MORBLEU, http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/; Pépin et al., 2017. http://archimer.ifremer.fr/doc/00391/50288/).

En 2018 comme les deux années précédente, la coordination générale et opérationnelle du projet MORBLEU a été assurée par le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC: http://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Etudes-et-Recherche/).

1.2. Objectifs

L'action de recherche MORBLEU a permis de dégager des éléments de connaissance et des pistes relatifs aux facteurs biotiques et abiotiques qui semblent intervenir dans le phénomène de mortalité des moules depuis 2014 :

- Hypothèses concernant l'animal hôte : impact de sa génétique (appartenance à une espèce/une population/hybridation interspécifique), de la présence de niveaux de ploïdie autres que diploïdes, d'une néoplasie hémocytaire (« exotique transmissible ? » ou non), de la période de ponte, des traits de vie, des facteurs en interaction avec l'environnement et l'animal ;
- -Hypothèses concernant l'environnement : facteurs environnementaux (« effet site », température de l'eau de mer, pluviométrie, connectivité des masses d'eau, équilibre des communautés microbiennes et phytoplanctoniques),
- Hypothèses de l'implication de bactéries, appartenant à l'espèce *V. splendidus*.

Pour l'année 2018, le projet a trois objectifs principaux :

- 1 : Etudier la relation entre l'évolution des équilibres microbiens et l'apparition de mortalité de moules, en lien avec le contexte environnemental associé
- 2 : Evaluer des facteurs favorisants intrinsèques à l'hôte dont l'étude du lien entre la caractérisation cytogénétique de moules, la néoplasie disséminée et l'apparition de mortalités
- 3 : Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épisodes de mortalité

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

Bancarisation des données :

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

De fait, la stratégie de bancarisation des données est largement adossée à ces réseaux. Ainsi, de nombreuses données environnementales (mesures hydrologiques discrètes, lecture de flore du REPHY Observation-DCE) sont bancarisées dans la base QUADRIGE2 gérée et hébergée par l'Ifremer (http://www.ifremer.fr/surval2/).

De même, pour certains sites suivis dans le cadre du projet MORBLEU, des données hydrologiques collectées en haute fréquence sont également bancarisées sous QUADRIGE2 (données de température, salinité, pression du réseau Mytilobs).



Concernant les données issues de séquençage haut débit du projet MORBLEU (ex. données relatives à l'ADN environnemental analysé par métabarcoding), elles sont bancarisées sur des espaces disques dédiés et sécurisés de la plateforme DATARMOR/DATAREF de l'Ifremer de Brest, (http://wwz.ifremer.fr/pcdm/).

Mise à disposition des données :

En termes de mise à disposition de données et de l'information, elle est faite au travers de rapports annuels accessibles à tous, après accord de la DPMA pour diffusion. A ce stade du projet, les données qualifiées et les résultats produits par l'action MORBLEU sont mis à disposition sous forme de communication lorsqu'ils ont pu faire l'objet d'une analyse et d'une valorisation. Les documents produits sont consultables sur le site public institutionnel d'archivage de l'Ifremer –ARCHIMER- (http://archimer.ifremer.fr/).

Une grande partie des données sous QUADRIGE sont disponibles sur demande.

1.4. Eléments de communication autour du projet MORBLEU en 2018

Présentations orales et posters :

Renault T. (2018). **Projet MORBLEU. Point d'information auprès du Comité National de la Conchyliculture.** Présentation orale. 2 février 2018, CNC, France.

Pépin *et al.*, (2018). **Projet MORBLEU. Bilan des acquis**. Présentation orale. Invitation du département Environnement du Grand Port Autonome de la Rochelle en présence des Phares & Balises, 2 mars 2018, La Rochelle, France.

Pépin *et al.,* (2018). **Projet MORBLEU. Restitution et bilan des acquis**. Présentation orale. Restitution des actions Ifremer/DPMA. 28 mai 2018, La Tremblade, France.

Pépin Jean-Francois, Robert Stéphane, Soletchnik Patrick, Seugnet Jean-Luc, Morin Dimitri, Chabirand Jean-Michel, Costes Louis, Geairon Philippe, Grizon James (2018). **Evaluation of mussels seed survival** *Mytilus edulis* **during early period of collection, development of a new tool and method**. AQUA 2018 - World Aquaculture Society Meetings. August 25-29 2018, Montpellier, France. https://archimer.ifremer.fr/doc/00455/56620/

Rapport et publications :

Benabdelmouna Abdellah, Garcia Céline, Ledu Christophe, Lamy Pierre, Maurouard Elise, Dégremont Lionel (2018). **Mortality investigation of** *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in France: An experimental survey under laboratory conditions. *Aquaculture*, 495, 831-841. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.075

Benabdelmouna Abdellah, Saunier Alice, Ledu Christophe, Travers Marie-Agnès, Morga Benjamin (2018). **Genomic abnormalities affecting mussels (***Mytilus edulis-galloprovincialis***) in France are related to ongoing neoplastic processes, evidenced by dual flow cytometry and cell monolayer analyses**. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 157, 45-52. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.003

Pépin Jean-Francois, Benabdelmouna Abdellah, Bierne Nicolas, Bouget Jean Francois, Chabirand Jean Michel, Chollet Bruno, Costes Louis, Degremont Lionel, Garcia Céline, Genauzeau Sylvie, Geairon Philippe, Grizon James, Guesdon Stephane, Lamy Jean-Baptiste, Christophe Ledu, Le Jolivet Aurore, Le Moine, Olivier, Le Noc Sandrine, Morga Benjamin, Dimitri Morin, Normand Julien, Palvadeau Hubert, Polsenaere Pierre, Robert Stephane, Saunier Alice, Soletchnik Patrick, Tourbiez Delphine, Travers Marie-Agnès, (2018). Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles: description et facteurs lies – MORBLEU-2017. Rapport de contrat DPMA/Ifremer. R.INT.RBE/SG2M-LGPMM. http://archimer.ifremer.fr/doc/xx

Hammel Maurine, (2018). **Génétique et génomique évolutive de cancer transmissible dans le complexe d'espèces** *Mytilus edulis-galloprovincialis.* Rapport de Master2 sous la direction de Nicolas Bierne et Alexis Simon du Laboratoire ISEM.

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

2 interviews pour le magazine Culture Marine et une pour le Journal de l'Environnement.



2. Objectif 1 : Décrire le contexte environnemental associé aux épisodes de mortalité de moules : relation entre l'évolution des équilibres microbiens et l'apparition des mortalités

2.1. Observation de la dynamique des épisodes de mortalité-2018 : mortalités observées sur le lot de moules sentinelles Mytilobs

(Auteur principal : Pépin JF)

2018 : des niveaux de mortalité plus intenses qu'en 2017 et 2015

En 2018 le projet n'a pas opéré de suivi renforcé comme les années précédentes, considérant d'une part les tendances dégagées des informations déjà acquises et d'autre part la moindre intensité des épisodes de mortalité en 2017 ainsi que l'évolution des attentes de la DPMA. De fait, le projet MORBLEU n'a pas déployé de lot sentinelle spécifique et il s'est reposé au niveau national pour les aspects biométrie, survie, données hydro-climatiques haute fréquence, sur les lots et les données du suivi du réseau Mytilobs (Normand J., 2019).

Des lots de moules produits dans les installations expérimentales de la Tremblade en 2017 dans le cadre de l'action MORBLEU –**Caractérisation du potentiel adaptatif de populations de moules face aux mortalités**- ont été déployés en 2017 et 2018 pour tester leur survie. Ces lots de moules déployés et suivis sur estran (parfois avec le concours du SMIDAP) ont connu des niveaux de mortalité contrastés, particulièrement entre la baie de Bourgneuf – Pays de Loire et le Bassin de Marennes Oléron (cartes des sites *cf. annexe 1, Figures 37-38*) et les cinétiques de mortalité s'y rapportant sont décrites au chapitre 4 de ce rapport.

Le **réseau Mytilobs** participe largement à l'action MORBLEU avec ses moyens. Il dispose de neuf sites ateliers répartis le long de la façade Atlantique (*Figure 1*). Pour la campagne 2018, comme les deux années précédentes, le naissain du lot sentinelle du Mytilobs provenait de captage sur corde de bouchots de **Pénestin** (56). Mis à l'eau à l'automne 2017, le suivi des poches de jeunes moules est réalisé mensuellement par les correspondants des LER.

L'année 2018 ne correspond pas à une « année de crise » en termes de mortalité de moules. Hormis les données du secteur de la Baie de Bourgneuf (**Maison Blanche**) où la mortalité cumulée atteint encore 80%, les résultats de mortalité obtenus au cours du suivi 2018 montrent des niveaux moindres bien qu'assez soutenus, entre 20 et 50%. Pour tous les sites, ces niveaux sont supérieurs à ceux de l'année 2017 et 2015 (*cf. Tableau 1*).

Tableau 1 : évolution depuis 2014 des niveaux de mortalité cumulée (%) lors des suivis du Mytilobs en lien avec les sites ateliers MORBLEU (ND, absence de données).

Mortalité cumul. en %	2014	2015	2016	2017	2018
Filière W	100	51	85	24	44
Eperon Aig.	100	22	84	14	33
Boyard	<10	19	53	13	28
M. Blanche	ND	ND	84	73	79
Pont Mahé	ND ou 0?	18	27	31	50
Vivier /mer	ND ou 0?	ND ou 0?	14	19	20



Dynamique des mortalités

En termes de dynamique des mortalités, l'évolution des mortalités a été progressive et lente entre octobre 2017 et mars 2018 (*Figure 1*), présentant une cinétique proche de 2017 qui était l'année qui présentait les plus faibles niveaux de mortalité depuis 2014. Le site de **Pont Mahé** a connu un pic de mortalité en juillet-août associé à de fortes chaleurs et des blooms phytoplanctoniques intenses (détection de dinoflagellés, *Lepidodinium chlorophorum*, REPHY, LER-MPL) pouvant induire des épisodes hypoxiques (50%). **De manière inquiétante on constate pour ce site une progression régulière des niveaux de mortalité depuis 2015.**

En 2018, on note encore, comme depuis 2016, que le site de **Maison Blanche** présente toujours le niveau de mortalité cumulée le plus élevé mais apparait aussi comme **le plus précoce** avec un accroissement > à 5% entre deux comptages mensuels dès janvier 2018. En 2017 et en 2016, ce seuil (arbitraire) avait été franchi dès le mois de novembre de l'année N-1 et suivi de **mortalités chroniques** qui se sont étirées jusqu'en juin. Ces données révèlent une dynamique de mortalité spécifique de la baie de Bourgneuf.

Ce site ou cette zone parait présenter des facteurs ou des conditions particulières (« effet site ») qu'on ne semble pas retrouver ailleurs et qui interagissent défavorablement avec les moules bleues (*M. edulis*) élevées dans ce secteur. Ce même constat a été conforté par deux essais expérimentaux visant à tester l'interaction génotype moule x environnement avec d'autres populations de moules (cf. § 4.1).

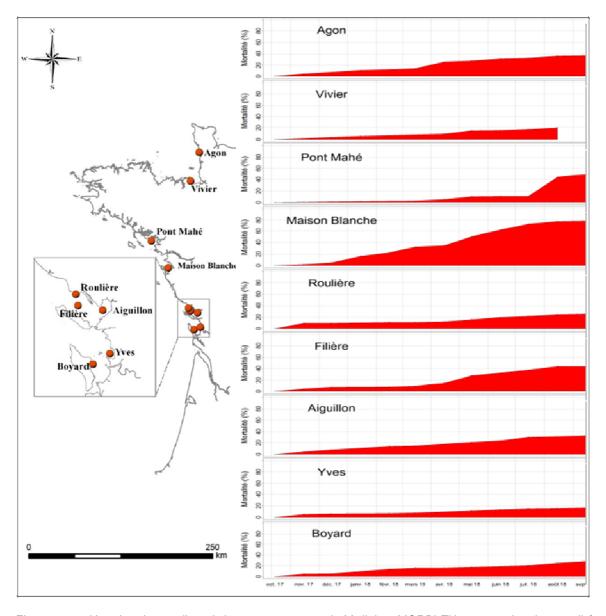


Figure 1 : position des sites ateliers de la campagne 2018 du Mytilobs –MORBLEU et proportion de mortalité exprimée en pourcentage de l'effectif initial (données Bulletin du Mytilobs 2018).



Lot sentinelle: un lot sentinelle de moules est constitué d'un ensemble homogène d'animaux issus de l'estran (animaux de même âge et de même origine) qui seront déployés au même moment et dans les mêmes conditions (densité, structure, poches, paniers sur pieux...) dans différents secteurs (parcs, estran) pour évaluer la variabilité des réponses (croissance, mortalité,...) sur une période donnée.

En résumé

- -A travers les données de suivi du lot sentinelle de moules du réseau Mytilobs, on peut considérer 2018 comme une année qui présente des niveaux de mortalité modérés à fort, avec des valeurs supérieures à celles observées habituellement avant les épisodes de surmortalité de 2014 (<20%) et, supérieures à celles constatées en 2015 et 2017.
- -Dans ce suivi 2018, les secteurs de Maison Blanche et de Pont Mahé sont les plus affectés avec 80 et 50% de mortalité respectivement.
- -Pour ce dernier site réputé « indemne » de surmortalité lors de la mise en place du projet, on observe un accroissement régulier des niveaux de mortalité depuis 2015. Le site du Vivier sur mer reste le site qui présente les niveaux les plus bas du suivi.
- -Un « effet site » lié à des facteurs non définis semble interagir avec les moules pour le secteur de la baie de Bourgneuf en particulier pour le site de Maison Blanche, site où l'expression des mortalités apparait plus précocement que sur les autres sites, avec un profil de mortalités chroniques qui s'étirent jusqu'en juin.

2.2. Caractérisation du contexte environnemental

2.2.1. Contexte hydro-biologique des élevages

(Auteurs principaux : Guesdon S., Pépin JF)

Comme précisé en introduction de ce rapport, l'action MORBLEU 2018 s'inscrit dans la poursuite de l'étude MORBLEU initiée en 2015 cependant, seuls <u>deux sites</u> dans les Pertuis Charentais -*Filière W (85-17)*; *Boyard (17)*-, ont fait l'objet d'un suivi environnemental dédié (ADN environnemental et données hydrologiques en haute fréquence) contre <u>trois sites</u> en 2015 -*Filière W (85-17)*; *Eperon-Aiguillon (85-17)*; *Boyard (17)*-, <u>quatre sites</u> en 2016 - *Filière W (85-17)*; *Eperon-Aiguillon (85-17)*; *Boyard (17)*-, reperon-Aiguillon (85-17); *Boyard (17)*-, reperon-Aiguillon (85-17)

Dans le même esprit, le projet n'a pas opéré en 2018 de suivi « renforcé » comme les années précédentes, considérant d'une part les tendances dégagées des informations déjà acquises (non réalisation de mesures de contaminants dissous, métaux ou pesticides), et d'autre part, les mesures et analyses réalisées par le REPHY-DCE sur les mêmes sites ateliers, Filière W et Saumonards/Boyard (flore totale, chloro-a, nutriments).

Par ailleurs, des données de type environnementales relatives aux contaminants dissous et issues de collaboration avec l'université de Bordeaux-1 ou bien d'un partenariat avec le Conseil départemental de Charente maritime et le laboratoire QUALYSE (anciennement nommé LASAT) seront analysées globalement (2015-2017) à l'occasion du rapport de synthèse attendu en 2019.

Enfin, en 2018, au travers d'une convention passée entre Ifremer et le Conseil départemental de Vendée (CD85), des sondes multi-paramètres à haute fréquence de mesure avec transmission automatique des données ont été acquises et déployées, par le LER-MPL en baie de Bourgneuf, par le LER-PC dans le Pertuis Breton (Filière W).

Le but des travaux développés dans cette section 2.2. est de caractériser les conditions environnementales dans lesquelles les épisodes de mortalité de moules ont eu lieu afin de



rechercher des paramètres qui seraient communs aux premiers temps d'apparition des mortalités depuis 2014 sur les sites impactés.

2.2.1.1. L'environnement abiotique : situation climatique interannuelle et en 2018

Cas des Pertuis Charentais : station Météo France Chassiron

L'analyse des températures atmosphériques et des précipitations hivernales agrégées à la semaine (respectivement moyenne et cumul) permet de distinguer des profils très singuliers pour chaque année (*Figure 2*), notamment sur la période d'étude.

On distingue ainsi des années plus ou moins chaudes/froides et plus ou moins pluvieuses (symbolisées par la position du centre de gravité des formes ovoïdes de la Figure 2, représenté par la position de l'année). Chaque année est également caractérisée par plus ou moins de variabilité lors des 3 premiers mois de l'année. Cette variabilité entre semaine sur la période hivernale est illustrée par la taille des formes ovoïdes (*Figure 2*): plus la forme est haute, plus les températures observées varient et plus la forme est large, plus les précipitations varient.

Ainsi, les hivers de 2014 et de 2016 apparaissent plutôt chauds et pluvieux, et évoluent dans une dynamique assez stable (peu de variabilité : formes ovoïdes de petite taille). Les trois autres années d'étude (2015, 2017 et 2018) révèlent des conditions thermiques et/ou pluviométriques beaucoup plus variables en période hivernale (formes ovoïdes de plus grande taille) ; l'année 2017 présentant les conditions les plus variées tant en température qu'en précipitation (*Figure 2*).

Le croisement de ces résultats avec les observations de mortalités de moules, notamment celles rencontrées en 2014 et 2016, laisse entrevoir l'importance d'un contexte climatique hivernal favorable au phénomène de surmortalité : « des températures atmosphériques plutôt chaudes et stables ainsi que des précipitations régulières ».

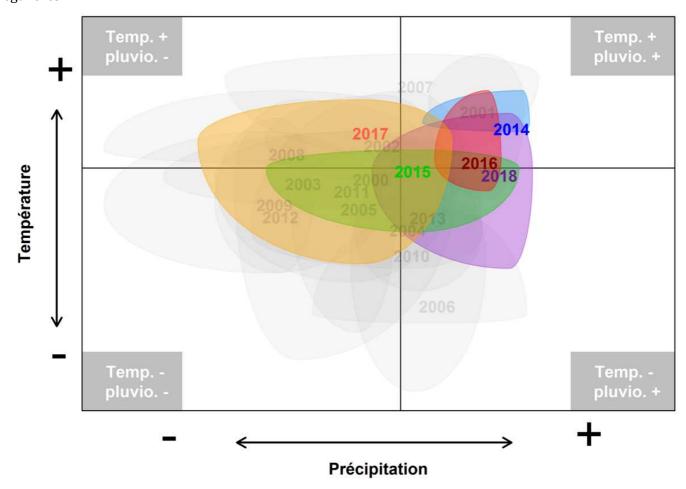




Figure 2: Positionnement interannuel des années 2000 à 2018 sur la base des températures atmosphériques (axe vertical) et précipitations hivernales (axe horizontal) mesurées à la station <u>Chassiron</u> (Météo-France); Les données résultent d'agrégations hebdomadaires de données tri-horaires. Les années 2014, 2015, 2016, 2017 et 2018 sont illustrées en couleur bleue, verte, rouge, orange et violette respectivement.

Situation hydro-climatique interannuelle (température de surface et salinité)

Cas du pertuis Breton : station Filière

Dans la masse d'eau du pertuis Breton, l'ambiance thermique rencontrée en hiver sur la période d'étude reflète les conditions atmosphériques décrites ci-avant.

Les hivers 2014 et 2016 sont caractérisés par des températures d'eau de surface évoluant dans les gammes de valeurs normales à exceptionnellement élevées contrairement aux autres 3 années, notamment 2017 (*Figure 3a*) : sans atteindre les niveaux élevés de température, ces dernières sont marquées par des périodes plus ou moins longues dans la gamme de valeurs basses (au regard des 10 dernières années de suivi). En période printanière, les températures de 2015, 2018 et en moindre mesure 2017 présentent de plus grandes variabilités, en évoluant de la gamme de valeurs basses à élevées (*Figure 3a*).

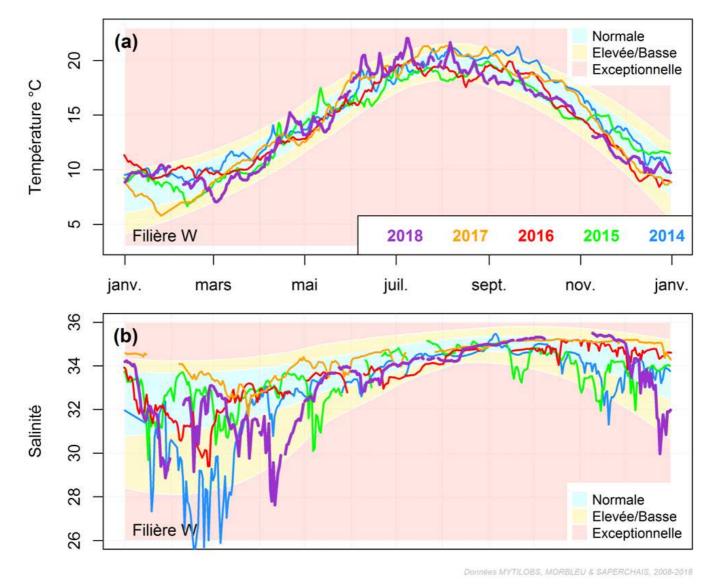


Figure 3 : Évolution des températures (a) et des salinités (b) journalières (agrégées à partir des mesures in situ à haute fréquence d'acquisition à la station Filière W) de 2014, de 2015, de 2016, de 2017 et de 2018 représentées par les lignes bleues, vertes, rouges, oranges et violettes respectivement. Lorsque ces valeurs évoluent dans la zone bleutée, elles sont qualifiées de "normales" au regard de l'historique de 2008 à 2017. Situées dans la zone jaune supérieure, les



valeurs sont qualifiées d'élevées, inversement pour la zone jaune inférieure, où les valeurs sont alors qualifiées de basses. Lorsqu'elles se situent dans la zone rosée, elles sont qualifiées d'exceptionnelles

Température: Facteur abiotique, la température de l'eau de mer constitue un paramètre clé pour la reproduction de la moule en modulant la vitesse de la maturation des géniteurs (période critique où les moules sont fragiles). Les forts contrastes thermiques agissent comme un déclencheur de l'émission des gamètes et favorisent le synchronisme des pontes sur un bassin.

Salinité: Facteur abiotique, la salinité en zone littorale est un indicateur du débit des fleuves et donc un proxy des apports de sels nutritifs entrant dans le système et régulant, en partie, le niveau de production primaire et les efflorescences phytoplanctoniques.

Au niveau halin (salinité), le contraste entre le groupe d'années [2014 et 2016] avec celui de [2015, 2017 et 2018] est moins clair, néanmoins, les salinités de 2017 se distinguent par (1) des niveaux plus élevés que les autres années (toujours dans la gamme de valeurs "normales" et ponctuellement élevées voire exceptionnelles), et (2) des dessalures de plus faibles intensités tant en hiver qu'au printemps (pas de pic de dessalure fugace) (*Figure 3b*).

Bien que le contexte salin ne permette pas de distinguer clairement les années de faible à forte mortalité de moules tant sur la période hivernale que printanière, il apparait néanmoins que les surmortalités d'intensité modérée à forte observées en 2014, 2015, 2016 et 2018 surviennent dans des périodes à fortes variations de salinité (dessalure intense et souvent fugace), contrairement à 2017 (année de très faible mortalité, proche du seuil de mortalité "habituel" dans les pertuis).

Le contexte hydro-climatique interannuel mis en perspective avec les épisodes de mortalités dans les pertuis renforce l'hypothèse d'un lien (pas nécessairement causal) entre l'environnement thermique (température hivernale plutôt élevé et stable) et l'intensité des surmortalités printanières. Ce contexte permet de constater également que les années, dont les niveaux de mortalités sont supérieurs au seuil "habituel", présentent d'intenses et fugaces dessalures tant en hiver qu'au printemps.

Comparaison spatiale du contexte hydro-climatique 2018

Cas des stations suivies dans le cadre du Mytilobs

A l'échelle nationale du projet, l'évolution globale des températures d'eau de surface apparait très synchrone en 2018 quelques soit la station suivie, comme l'illustre la chute thermique observée fin février - début mars (*Figure 4a*).

Les chroniques des températures permettent également d'observer que **la station Le Vivier sur mer présente de valeurs plus faibles d'environ 2°C que les autres stations** (Golf de Gascogne : zone côtière de Vendée et Charente-Maritime / Latitude [46-47]°N]), en raison de situation plus nord (mer de la Manche / Latitude 48.6°N).

Bien que la distance aux estuaires de proximité soit différente d'une station à l'autre, les chroniques de salinités évoluent globalement de façon similaire de janvier à mars sur les côtes de Vendée et de Charente-Maritime. Sur ce secteur, de mars à mai, la station l'Eperon se démarque avec des salinités plus faibles, probablement liées à sa plus grande proximité estuarienne (Le Lay, La Sèvre). La station Le Vivier sur mer évolue quant à elle de manière très singulière, notamment par sa plus grande stabilité.



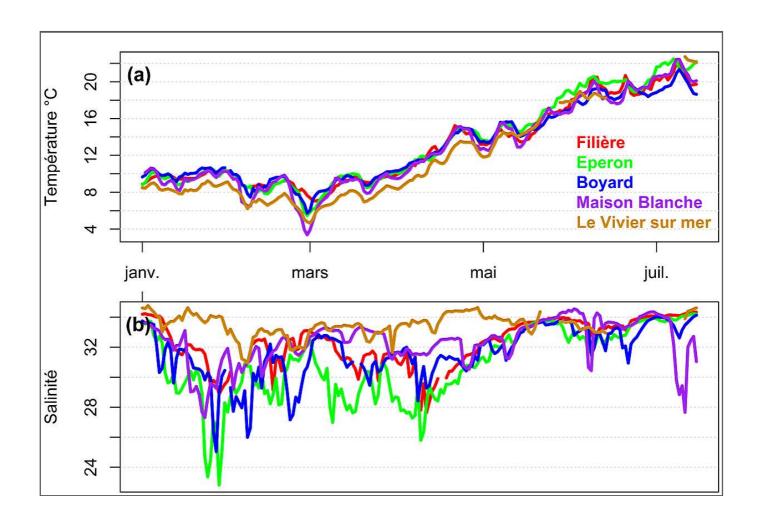


Figure 4: Chroniques de températures (a) et de salinités (b) observées sur 5 stations suivis dans le cadre du projet Mytilobs en 2018 : valeurs issues de mesures in situ enregistrées à haute fréquence d'acquisition et agrégées à la journée

2.2.1.2. L'environnement biotique : évolution des équilibres microbiens

Le but de cette étude est de créer des séries de mesures « d'indicateurs biologiques ou biotiques » pour décrire l'environnement planctonique des élevages de moules chaque année, au gré ou pas d'épisodes de mortalité. Cette approche justifie un suivi sur plusieurs années afin de permettre à termes l'évaluation de facteurs ou combinaison de facteurs tels que les équilibres microbiens et leur rôle potentiel dans la sensibilité des moules aux épisodes de mortalité.

Contexte biotique basé sur les observations microphytoplanctoniques

Cas du pertuis Breton: station Filière

Comme pour 2014, 2015 et 2016, la période estimée d'apparition des premières mortalités printanières de 2018 intervient au voisinage de la première efflorescence algale (bloom) annuelle de microphytoplancton (*Figure 5*): phénomène identifiable par l'augmentation de l'abondance totale de cellules de microphytoplancton (points noirs reliés par lignes noires) et par la baisse de l'indice de diversité de Shannon (points de couleur reliés par lignes de même couleur) (*Figure 5a à 5e*).



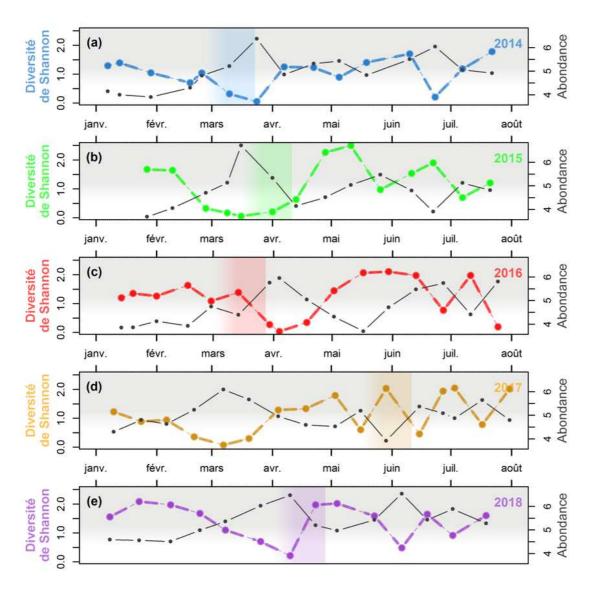


Figure 5: Dynamique des abondances totales de microphytoplancton et de l'indice de diversité de Shannon, des mois de janvier à août en 2014 (a), 2015 (b), 2016 (c), 2017 (d) et 2018 (e) à la station Rephy "Filière W" du pertuis Breton (Ifremer/Quadrige). Les bandes verticales (polygones) de couleur (bleue, verte, rouge, orange et violette pour 2014, 2015, 2016, 2017 et 2018 respectivement), illustrent la période estimée de début de mortalité de moules s'appuyant sur le base d'informations de terrain des professionnels et des suivis conchylicoles de l'Ifremer (notamment Mytilobs, MORBLEU).

Bilan

Le contexte de l'environnement biologique (ou biotique), basé sur les observations du microphytoplancton a pu être caractérisé. Pour le site des Filières situé dans le Pertuis Breton, secteur où des épisodes de mortalité importants ont été observés depuis 2014, en 2014 comme en 2016, les premières mortalités semblent se manifester en début de bloom (courant mars) contrairement à 2015 et 2018 où elles semblent apparaître plutôt en fin de bloom (fin mars et avril) (*Figure 5a, 5b,5c et 5e*). Dans tous les cas de figure, en 2017 (année de très faible mortalité de moules), la date d'augmentation significative de taux de mortalité ne survient que très tardivement (fin mai début juin), et bien après la première efflorescence algale, centrée sur mars (*Figure 5d*).

Indice de diversité de Shannon: Coefficient calculé pour traduire le degré de diversité des espèces vivant dans une communauté ou un milieu. Son expression est fonction de deux paramètres: le nombre d'espèces identifiées (richesse spécifique) et le nombre d'individus par espèce, c'est à dire la répartition en proportion des individus au sein de ces espèces (équitabilité). Cet indice donne une idée de la diversité spécifique d'un milieu, plus l'indice «H'» est élevé plus la diversité est grande.



Contexte biotique basé sur l'approche ADN environnemental (métabarcoding) pour décrire les communautés procaryotes

Cas du pertuis Breton : station Filière

L'approche ADN environnementale (ADNe) développée depuis le début du projet vient compléter significativement le contexte microbien issu des observations microphytoplanctoniques. Ce complément d'informations permet d'étudier plus en détail l'évolution des équilibres microbiens avant, pendant et après la période de mortalité printanière.

L'analyse de la dynamique bactérienne (organismes procaryotes), jusqu'à présent illustrée sous forme d'histogramme reflétant la diversité et l'abondance relative des taxons bactériens à une date donnée (vignette en rappel en haut à droite de la *Figure 6*), montre après ces quatre années d'étude un profil assez typique entre février et juillet : des cortèges microbiens² plutôt printaniers (points de couleurs vertes et jaunes) succèdent à ceux d'hivers (points de couleur bleue) pour évoluer vers ceux de fin de printemps et de début d'été (points de couleurs oranges et rouges) (*Figure 6a*).

Saisonnalité de la diversité microbienne

Bien que ces cortèges bactériens présentent de relatives similitudes saisonnières au premier semestre à l'échelle des quatre années étudiées, des singularités apparaissent lorsque l'on regarde en détail chaque année.

En 2016, seuls des cortèges bactériens de fin d'hiver-début de printemps et de début d'été sont observés, aucun cortège de type printanier n'apparait (aucun point rouge dans le cadre supérieur droit de la *Figure 6b*).

En 2017, les cortèges de fin d'hiver et début de printemps apparaissent dans la zone de ceux plus souvent observés au printemps (pas de point orange dans le cadre inférieur droit, illustrant des communautés de fin d'hiver et début de printemps, *Figure 6b*).

Néanmoins, les différents résultats de 2015 et 2018 s'inscrivent assez bien dans la dynamique saisonnière définie ci-avant : des points de couleurs vertes et violettes (respectivement pour 2015 et 2018) apparaissant pour chaque "saison" (à la seule limite de disposer d'échantillons pour chaque période) (*Figure 6b*).

Replacés dans le contexte des mortalités de moules, les résultats d'ADNe laissent transparaitre la distinction entre l'année 2016 caractérisée par d'intense mortalité, le regroupement des années [2015 et 2018], années à mortalité modérée et l'année 2017 de très faible mortalité.

L'étude de ces données vise maintenant à s'intéresser aux similitudes des cortèges bactériens observés en fin d'hiver et début de printemps, notamment aux dates de début de périodes de mortalité de 2015, 2016 et 2018 (cadre bleu de la *Figure 6b*), mais également aux différences avec ceux observés aux mêmes périodes en 2017.

Métabarcoding ou métabarcode: technique de taxonomie moléculaire permettant d'identifier des organismes présents dans un échantillon à partir du séquençage en masse du fragment d'un gène cible. Cette approche fait appel au séquençage haut débit d'ADN, puis à l'identification et l'analyse des séquences obtenues par bioinformatique.

23

² Cortège : ensemble ou liste de taxons ou d'espèces présents dans ce milieu pour la période considérée.



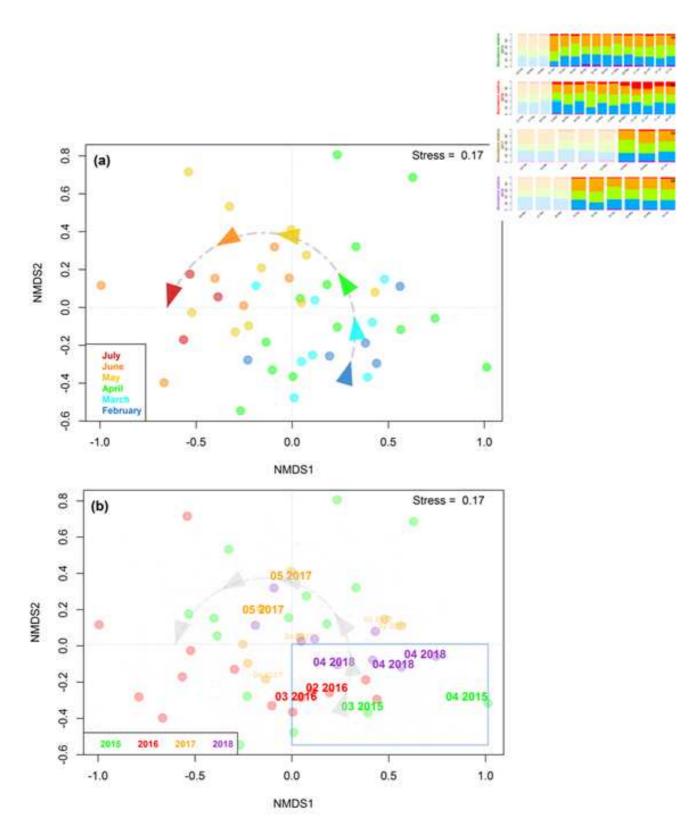


Figure 6 : Positionnement multidimensionnel (nMDS) des différentes unités taxonomiques (OTU) de bactéries identifiées par la technique du métabarcode d'ADN (dite eDNA). Le graphique (a) montre le profil saisonnier retrouvé à partir des 4 années d'étude : chaque couleur du bleu au rouge en passant par le bleu, le vert et l'orange définissant les mois de février à juillet. Sur la même base de données, le graphique (b) illustre les spécificités interannuelles (en vert, rouge, orange et violet pour 2015, 2016, 2017 et 2018 respectivement) ; le cadre bleu permet d'identifier une zone où sont retrouvés certains cortèges bactériens aux dates estimées de début de mortalités printanières (signalées suivant le même code couleur)



En résumé

- -Depuis 2015, les travaux sur les mortalités ont permis de suivre finement l'environnement de moules en élevage. L'étude des environnements physiques (météorologique et hydro-climatique) et biotiques et leur intégration commence à dessiner un contexte particulier associé à ces phénomènes de mortalité.
- -La pluviométrie (dont l'effet est visualisable au niveau des élevages par les dessalures) apparait comme un élément prépondérant : les années dont les hivers et les débuts de printemps sont marqués par d'importantes dessalures sont caractérisées par des périodes de mortalités printanières modérées à fortes : cas de 2014, 2016, 2018 voire 2015, par opposition à 2017.
- -La température (particulièrement en hiver) semble également jouer un rôle important, notamment sur l'intensité des mortalités : les hivers chauds et stables de 2014 et 2016 présentent de fortes mortalités, ceux de 2015 et 2018 plus frais et variables sont caractérisés des mortalités plus modérées.
- -L'environnement physique semble également agir sur les équilibres bactériens tant la singularité de leur évolution transparait au travers des années : opposition entre 2016 et [2015-2018] et 2017.
- -Les analyses plus fines, en cours d'étude, sur les équilibres microbiens et leur intégration dans le contexte hydro-climatique devraient permettre d'étayer un éventuel lien de ces communautés de bactéries et de phytoplancton avec les épisodes de mortalité de moules rencontrés depuis 2014 dans les Pertuis Charentais.



3. Objectif 2. Evaluer des facteurs intrinsèques à l'hôte favorisants les mortalités : Etude du lien entre la caractérisation cytogénétique et histologique de moules et la néoplasie disséminée

- 3.1. Recherche du chimérisme génétique comme traceur d'un processus néoplasique chez les moules bleues en France
- 3.1.1. Aspects génétiques et cytométriques pour l'étude de la néoplasie

(Auteurs principaux: A. Benabdelmouna, J.B. Lamy)

Préambule : fait-on face à une maladie importée ? un phénomène transmissible ?

L'espèce *Mytilus trossulus*, présente aux Etats-Unis et non en France, est affectée par des mortalités liées à un phénomène néoplasique (Moore *et al.*, 1991; Gee *et al.*, 1994). Ce type de phénomène a été identifié récemment comme étant transmissible chez cette espèce et d'autres espèces de bivalves. Dans ce contexte, le processus néoplasique observé en France par cytométrie en flux chez les moules est-il visible par d'autres outils? Les néoplasies sont-elles transmissibles et proviendraient-elles *M. trossulus*? L'hypothèse d'un processus néoplasique transmissible se vérifie par la recherche de l'existence d'un chimérisme génétique c'est-à-dire qu'un individu typé sur deux tissus³ ne présente pas le même génotype et donc héberge des cellules étrangères.

En 2017, la composition génétique des populations de moules (espèces *Mytilus edulis* ou *M. galloprovincialis* et hybrides) et la recherche d'un processus néoplasique transmissible ont ainsi été étudiées de nouveau à partir de 21 populations issues de gisements naturels échantillonnés le long du littoral français (hors Méditerranée). De fait, 1,8% des moules analysées présentaient un chimérisme génétique *trossulus* révélant la présence à très faible niveau de cellules (néoplasiques) provenant de l'espèce *Mytilus trossulus* dans les populations françaises de moules testées. Cette donnée suggère que les mortalités massives de moules observées en France ne sont pas liées à la maladie décrite chez les moules trossulus nordaméricaines. Les travaux présentés ci-après concernent d'autres aspects de la néoplasie hémocytaire de la moules bleue, maladie encore mal connue en France.

a. Introduction

_

Dans une étude sur *M. edulis*, Benabdelmouna & Ledu (2016), mettaient en évidence des anomalies cytogénétiques importantes au niveau des populations hémocytaires au sein de certains individus de moules sur le littoral français. Notamment, les individus provenant de site ayant subi des mortalités présentaient plus de 5% d'hémocytes polyploïdes (>2n). Cette observation fit sens avec une série d'articles réalisés de manière indépendante par plusieurs laboratoires à travers le monde avec une publication phare dans (Metzger et al. 2015, 2016) démontrant l'existence de maladie due au développement de cellules néoplasiques allochtones -provenant d'un autre individu malade- (donc transmissible) chez *M. trossulus* et d'autres espèces de bivalves (Paynter et al. 2017; Metzger et al. 2016; Dart 2016; Metzger and Goff 2016). En effet, il serait logique d'observer des anomalies cytogénétiques sur des populations hémocytaires chez des individus infectés par des cellules néoplasiques allochtones (*d'origine étrangère*), c'est d'ailleurs, l'une des hypothèses avancées par Benabdelmouna & Ledu (2016).

³ Tissu : en biologie un « tissu » est le niveau d'organisation intermédiaire entre la cellule et l'organe. Un tissu est un ensemble de cellules semblables et de même origine, regroupées en amas, réseau ou faisceau (fibre) ou bien libres (sang, cellules sanguines, hémolymphe, hémocytes) qui forme un ensemble fonctionnel.



Chimérisme génétique, individu chimère: des outils de génétique moléculaire permettent de rechercher de l'ADN étranger à un individu hôte dans ses cellules. Dans le cas de néoplasie transmissible ou cancer transmissible, la démonstration de la transmission d'un ADN étranger repose sur une analyse génétique qui permet de montrer que le génotype des cellules néoplasiques est différent du génotype des cellules de l'organisme hôte. Ce type d'anomalies a déjà été décrit chez des bivalves et ces anomalies étaient associées chez ces animaux à des néoplasies hémocytaires transmissibles.

Ce type de cancer transmissible encore peu étudié semble beaucoup plus répandu chez les mollusques que chez les mammifères par exemple. Chez les bivalves marins ces cancers sont apparentés à des leucémies (Carballal et al. 2015), l'hypothèse actuelle est que des cellules néoplasiques propagent le cancer d'un individu vers d'autres individus via la colonne d'eau. Cependant les mécanismes de transmission restent à démontrer et ne sont pas visés dans ce rapport.

La démonstration qu'un cancer est transmissible peut reposer sur l'analyse génétique (Metzger et al. 2016). Si un individu est atteint par un cancer (a fortiori transmissible), il doit être porteur des deux allèles de son soma plus le(s) allèle(s) de la tumeur. En d'autres termes, normalement **un individu sain doit avoir le même génotype sur les deux tissus** (aux erreurs de génotypage prêts < 1 %). En revanche, **si l'individu est atteint d'un cancer transmissible, le génotype de l'hémolymphe sera différent de celui de la branchie** pour certains locus.

Dans le rapport MORBLEU précédent, l'estimation de la prévalence d'individus cancéreux à partir de données génétiques avait été faite en regardant si des allèles d'origine *trossulus* se retrouvaient dans des individus d'autres espèces. Il avait été conclu que qu'un cancer issu de l'espèce *M. trossulus* ségrége à faible fréquence (1.8%) en France (Riquet, Simon, and Bierne 2017; Travers et al. 2016; Pépin et al. 2017). Ici l'analyse est potentiellement beaucoup plus puissante et plus robuste que précédemment. Cependant, l'analyse est complexifiée par plusieurs particularités biologiques propres à la cancérogénèse:

- i) le tissu cancéreux, ici, est l'hémolymphe qui peut être un mélange d'hémocytes normaux et anormaux (ici néoplasiques) et dont le degré de pureté d'un type cellulaire est inconnu (tumor purity). De plus le tissu « contrôle » est la branchie qui est elle-même irriguée d'hémolymphe. Par conséquent, un individu malade aura des cellules cancéreuses dans la branchie également, surtout à un stade avancé de la maladie durant lequel le corps entier est envahi de cellules cancéreuses.
- *ii)* une autre difficulté vient du fait que les cellules cancéreuses présentent au cours du processus néoplasique des ploïdies variables et difficilement prédictibles. Ces variations de ploïdies altèrent la dose d'allèles (*tumor ploidy*) au sein d'un individu et donc le génotype appelé.
- les génomes des cellules cancéreuses montrent aussi des variations du nombre de copies de certains segments génomiques (*Copy Number Alterations*) qui peuvent aussi interférer lors de l'appel d'un génotype. Aussi il est difficile de faire des inférences précises sur les attendus en termes de fréquences génotypiques sur un tissu préférentiellement atteint (hémolymphe) *versus* plus ou moins atteint (ex. branchies).

Ainsi, contrairement à l'analyse menée dans le rapport MORBLEU 2017, nous ne faisons pas ici d'hypothèse sur le nombre de lignées cancéreuses ségrégant au sein du complexe *Mytilus sp*, et nous ne tentons pas de tracer l'origine de la ou des lignées cancéreuses. Le présent travail est motivé par une étude précédente utilisant des marqueurs microsatellites (rapport MORBLEU 2016) qui montrait une différence claire (en nombre et taille) entre les génotypes issus soit d'hémolymphe soit de branchies chez les moules identifiées comme étant de basse qualité cytogénétique (**LCQ**), ceci alors qu'aucune différence entre ces deux mêmes tissus n'a été mise en évidence pour les moules de haute qualité cytogénétique (**HCQ**).

Néoplasie ou Cancer : le terme néoplasie (littéralement : nouvelle croissance) désigne une formation nouvelle (le néoplasme) qui se développe par prolifération cellulaire incontrôlée et qui présente une organisation structurale et une coordination fonctionnelle faible, voire nulle, avec le tissu environnant. Le mot « néoplasme » est le terme utilisé en médecine pour désigner une tumeur ou un cancer. La néoplasie hémocytaire correspond à un cancer des cellules sanguines du mollusque (hémocytes).



Nous souhaitons étudier avec le moins d'hypothèses possibles la présence d'individus chimériques afin de ne pas rater des évènements de grande ampleur comme des chromothripsis⁴ multiples au sein de plusieurs populations (sans forcément partager des lignées cancéreuses connues et communes). Nous faisons l'hypothèse que plus un individu est atteint (plus l'individu est chimérique) plus les cellules cancéreuses masqueront le génotype réel de l'individu (via les mécanismes expliqués ci-dessus) et donc plus les génotypes inférés sur les deux tissus seront discordants. Comme expliqué ci-dessus, il est important de garder en mémoire que cette approche a des limites dans le cas d'individus très atteints (souvent visible en histologie classique).

Les questions principales sont :

- Est-ce que les moules présentent un ou plusieurs indices de chimérisme génétique ?
- Est-ce que ces marqueurs (*sensu lato*) du chimérisme génétique sont corrélés avec des mesures de cytométrie en flux ?

b. Matériel biologique

CP_JB
30 populations,
gisements naturels
927 individus non triés
Ech. 2 tissus/moule

Génotypage
Microsat 8 locus

CP_JB
30 populations,
gisements naturels
927 individus non triés
Ech. 2 tissus/moule

Génotypage
SNP 104 locus

Figure 7 : Vue d'ensemble des deux campagnes d'échantillonnages et des mesures associées à chacune d'elles. Dans la suite de ce rapport seuls les acronymes CP_ABD et CP_JB seront utilisés.

Deux campagnes d'échantillonnages ont été menées (*cf. Figure* 7). La première campagne (CP_ABD, individus triés) avait pour objectif d'avoir une image précise de la qualité cytogénétique de populations mytilicoles sauvages ou élevées réparties sur la façade Atlantique et incluant des zones touchées par les mortalités. Les

⁴ Chromothripsis multiples : phénomène particulier qui survient lors du réarrangement génomique massif de la cellule et qui engendre de multiples cassures de l'ADN dans les chromosomes. Ce phénomène est impliqué dans les cancers.



moules prélevées dans ces zones sont en grande majorité des individus qui entament leur deuxième année et qui sont donc susceptibles de subir les mortalités (Tableau 2).

Il est important de garder en mémoire pour cette campagne que les individus de ce jeu de donnée ne correspondent pas un échantillonnage aléatoire d'individus, mais à des individus triés sur des critères de quantité d'ADN des noyaux analysés par cytométrie en flux (définis dans Benabdelmouna & Ledu, 2016) et que de fait, ce tri ne permet pas une estimation de la prévalence de la néoplasie sur ces populations. . Les individus appelés : Aig et Fiol ne sont pas directement issus de gisements naturels, ils ont été produits en installation expérimentale et proviennent de parents ayant survécu à un évènement de mortalités et à des parents témoins n'ayant pas connu d'évènement de mortalités. La population Aig se compose de 5 individus issus de géniteurs survivants d'un épisode de mortalités et de 9 individus issus de géniteurs n'ayant pas connu de mortalités. La population Fiol, se compose de 9 individus issus de géniteurs survivant un épisode de mortalités et de 7 individus issus de géniteurs n'ayant pas connu de mortalités.

Tableau 2 : Liste des sites échantillonnées (gisement naturels de moules) pour la campagne CP_ABD, code, site origine, coordonnées, nombre d'individus (soit deux échantillons) envoyé pour génotypage SNP et Microsatellites et espèce.

Nom	Nom du site	Latitude	Longitude	Nombre ind.	Espèces
Aig	Baie de l'Aiguillon	46.227790	-1.176385	14	M. edulis-
Aig	Date de l'Alguilloit	40.227790	-1.170303	14	galloprovincialis
Arc	Arcachon la Vigne	44.6715	-1.2384	30	M. edulis-
AIC	Ai caciioni la vigne	44.0713	-1.2304	30	galloprovincialis
Brv	Bréville-Donville	48.854168	-1.5868876	66	M. edulis-
DIV	Di cvine-Donvine	40.054100	-1.5000070	00	galloprovincialis
FIL	Filière Pertuis	46.2715	-1.3816	30	M. edulis-
LIL	Breton	40.2713	-1.3010	30	galloprovincialis
Fiol	Le Fiol	47.028019	-2.019540	16	M. edulis-
1 101	LC 1101	47.020017	-2.017540	10	galloprovincialis
GR	Guérinière	46.960672	-2.229642	30	M. edulis-
un	ducimiere	10.300072	2.227012		galloprovincialis
MB	Maison Blanche	46.995944	-2.156211	30	M. edulis-
MD	Maison Dianette	40.773744	-2.130211	50	galloprovincialis
Pal	Port de La Pallice	46.1604	-1.2228	30	M. edulis-
ı aı	Tort de La Fairice	40.1004	-1.2220	30	galloprovincialis
Plg	Le Pouliguen	47.2603	-2.4160	29	M. edulis-
1 15	ne i ounguen	17.2003	2.1100		galloprovincialis
Wim	Wimereux	50.7867	1.6019	30	M. edulis-
V V 1111	vv iiiici cux	30.7007	1.0017	30	galloprovincialis

La seconde campagne (CP_JB) avait pour objectifs de couvrir une large portion de la côte Atlantique française et de représenter l'ensemble des espèces appartenant au genre *Mytilus .sp* présent en France avec éventuellement des individus introgressés. Le prélèvement sur le terrain a commencé en octobre 2016 jusqu'en janvier 2017. Les prélèvements ont été faits sur des gisements naturels (*cf.* Tableau 3) sans sélection préalable.

Sur chaque individu des deux campagnes, l'**hémolymphe** a d'abord été prélevée sur le muscle adducteur postérieur (ensuite cet échantillon sera appelée **H**) puis fixé à l'éthanol à 70°. Enfin, toujours sur le même individu, un morceau de **branchie** a été prélevé et stocké dans l'éthanol à 70° (ensuite cet échantillon sera appelée **T**). Les échantillons ont été conservés au frais et à l'abri de la lumière avant mise en plaque avant l'envoi à la plateforme de génotypage (*cf. Figure 7*).



Pour les individus de la première campagne CP_ABD, l'hémolymphe a également été utilisée pour les mesures par cytométrie en flux et une partie des animaux a été fixée pour analyse en histologie (cf § 3.1.2.)

Le génotypage : c'est une discipline et une méthode de biologie moléculaire basée sur des séquences ADN pour déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique sur tout ou partie du génome, pour un individu ou un groupe d'individus appartenant à une espèce animale ou végétale. Différents marqueurs génétiques sont développés pour le génotypage dont : le génotypage sur SNP (Single Nucleotide Polymorphisms, variation sur une paire de bases), le génotypage par Microsatellites (μsatellites) ou SSR (simple sequence repeats) établi sur l'identification d'un motif de bases répété. Cette méthode est couramment utilisée pour des assignations de parenté, test de paternité, identification d'ADN en criminologie...

Tableau 3 : Liste des populations échantillonnées pour la campagne CP_JB, code, site origine, coordonnées, nombre d'individus (soit deux échantillons) envoyé pour génotypage SNP et espèce.

Name	Local Name	Latitude	Longitude	Nb	species ⁱ
CHA_OLE	Chassiron - pointe Nord Oléron	45.0504	-1.4152	25	M. galloprovincialis
ROC_VER	Rocher Vert Chaucre - Cote ouest Oléron	45.9836	-1.4056	25	M. galloprovincialis
OLE_PON	Pont ile d'oléron - Bouée de Boyard	45.8534	-1.1802	25	M. edulis
AIX_001	Ile d'Aix	46.0405	-1.2056	23	M. edulis
FWB_001	Filière Pertuis Breton	46.2715	-1.3816	25	M. edulis
AUN_001	Rocher d'Aunis (Bouée) - Pertuis Breton	46.3331	-1.4268	25	M. edulis
PAL_001	Port de La Pallice	46.1604	-1.2228	25	M. edulis
YEU_001	Ile d'Yeux	46.7065	-2.2840	25	M. edulis
YEU_002	Ile d'Yeux	46.7065	-2.2840	25	M. edulis
TRI_001	La Trinité sur mer - Port	47.5849	-3.0248	25	M. edulis
QUI_001	Baie de Quiberon - bouée	47.5458	-3.0672	25	M. edulis
HOU_001	Ile de Houat - Bouée cardinal filière	47.4197	-2.9372	25	M.edulis
PEN_001	Camaret plage-Penestin	47.4971	-2.4936	25	M.edulis
BIL_001	Le Bile - Penestin	47.4453	-2.4902	25	M.edulis
POU_001	Le Pouliguen - La Baule	47.2603	-2.4160	25	M.edulis
ARC_VIG	Arcachon	44.6715	-1.2384	24	M.edulis
BIA_001	Digue de Marbella Biarritz	43.4674	-1.5765	25	M.galloprovincialis/edulis
HOS_001	canal d'Hossegor	43.6555	-1.4392	25	M.edulis
MOG_001	Moguéric (Aber)	48.6883	-4.0708	25	M.edulis
PET_001	Port de Brest pétrolier	48.3812	-4.4715	25	M.edulis/gallo
CER_001	Port de Brest céréalier	48.3827	-4.4489	25	M.edulis/gallo
JOS_001	Baie de St Brieuc - Jospinet	48.5581	2.6003	24	M.edulis/gallo
JOS_002	Baie de St Brieuc - Jospinet	48.5581	2.6003	13	M.edulis/gallo
GRA_001	Granville	48.8250	1.5911	19	M.edulis
VEY_001	Port en Bessin - Baie des Vey	49.3832	-1.0948	19	M.edulis
CHE_001	port de Cherbourg	49.6457	-1.6234	25	M. galloprovincialis
WIM_001	Wimereux - Boulogne sur mer	50.7867	1.6019	25	M.edulis
EST_001	Le Croizic	47.3037	-2.5337	25	M.edulis
FIO_001	Le Fiol	47.0280	-2.0195	25	M.edulis/gallo
MAB _001	Maison blanche	46.995	-2.1562	25	M.edulis/gallo

c. Génotypage

Tous les individus (CP_ABD et CP_JB) ont été génotypés sur 101 SNPs nucléaires et 3 SNPs mitochondriaux via la technologie KASP. Sommairement, cette technologie de génotypage repose sur l'hybridation en compétition de deux sondes spécifiques à chaque allèle (SNP cible) avec un marqueur fluorescent spécifique par sonde. Pour un locus donné, les individus auront des signatures de fluorescences qui seront agrégées en fonction du génotype de l'individu.

Les SNP nucléaires ciblés ont été initialement destinés pour maximiser la différentiation entre les espèces du genre *Mytilus*. Pour certaines espèces, les SNPs peuvent aussi être capables de discriminer l'origine



géographique (Fraïsse et al. 2016). Par exemple, les fonds génétiques *M. edulis* européens *versus* américains seront différentiés avec une très bonne puissance, idem pour *M. galloprovincialis* Atlantique *versus* Méditerranée ou encore *M. trossulus* Amérique *versus* Pacifique. Les SNPs mitochondriaux apportent une information indépendante des SNPs nucléaires quant à l'appartenance de lignée mitochondriale à une espèce plutôt qu'à une autre (*cf.* rapport MORBLEU 2017).

Ensuite tous les individus de CP_ABD ont été aussi génotypés sur 8 marqueurs microsatellites (rapport MORBLEU 2016) et les lectures ont été faites deux fois en aveugle par la même personne en comptant tous les allèles amplifiés sans se limiter à la lecture des deux allèles les plus significatifs. Pour la suite de ce rapport, il faut garder à l'esprit qu'un échantillon désigne un prélèvement de tissu (et non un individu). De plus chaque individu a été génotypé sur deux tissus (hémolymphe et branchies).

Tableau 4 : détails du nombre d'échantillons envoyés et des comparaisons possibles sur les différents jeux de données

	Echantillons_SNP	Echantillons_ Microsatellite	Individus (H-T sur SNP)	Individus (H-T sur Microsatellite)	Cytométrie
CP_ABD	573	590	267	283	71
CP_JB	1654	NA	721	NA	NA

Cytométrie en flux des individus de la première campagne (CP_ABD)

L'ensemble des 305 individus ont été biopsiés pour l'hémolymphe, puis l'hémolymphe passée sur un cymomètre en flux selon le protocole décrit dans Benabdelmouna & Ledu (2016). Parmi ces 305 animaux, issus des 10 populations testées (*cf.* Tableau 2), 239 moules (non compris le lot de Bréville) ont fait également l'objet de prélèvements pour des analyses en histologie (*cf.* § 3.1.2)

La « qualité cytogénétique »⁵ de chaque individu (cytogramme) a été caractérisée par une moyenne arithmétique pondérée du canal de sortie FL3-590-A (dont la valeur s'étend de 0 à 1024 pour cette expérience). Cette statistique donne plus de poids à des observations élevées de ploïdie tout en permettant de comparer des séries de donnée issues du cymomètre dont les effectifs ne sont pas identiques. Sur les 305 individus génotypés dans CP_ABD seuls 71 ont une qualité cytogénétique calculée sur 2854 hémocytes en moyenne (min=1172 max= 5000 hémocytes). Les autres cytogrammes ont été écartés car des contaminations par les gamètes étaient à craindre. Le profil cytométrique des individus ont été résumés par l'utilisation d'une moyenne pondérée, c'est-à-dire que chaque noyau analysé compte d'autant plus qu'il est non diploïde. Ainsi, plus un individu a une valeur élevée plus il est anormal, un individu diploïde normal doit avoir une moyenne cytométrique inférieure à 230.

Analyses de génotypage des deux campagnes (CP ABD et CP IB)

Les analyses des données génétiques ont été réalisées en R avec des scripts adaptés à l'analyse d'individus potentiellement atteint d'un cancer allochtone. L'analyse a été faite en deux temps : Tout d'abord, l'ensemble des génotypes individus a été examiné visuellement via des heatmaps⁶ et des distances appropriées aux marqueurs et à la problématique cancer (possibilité de doses d'allèles variables). L'objectif était d'éliminer tous les individus suspectés de contaminations ou d'erreur lors de la confection des plaques afin d'éviter de « créer » des individus faussement cancéreux. Grace au jeu de données microsatellites, nous avons utilisé la distance Bruvo via le package « R poppr » (Kamvar, Tabima, and Grünwald 2014). Une inversion lors de la préparation d'une plaque a pu être détectée de la sorte et corrigée (cf. Figure 8). Ensuite, les analyses sont essentiellement des comparaisons entre les génotypes des deux tissus au sein d'individu

_

⁵ Qualité cytogénétique : par convention ce terme est employé en cohérence avec les deux publications qui ont validé des travaux du même auteur avec cette terminologie (*Elsevier, Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 2018)
⁶ Heatmap : « carte thermique », représentation graphique colorée (chaud/froid) formant une cartographie de la répartition d'un caractère ou d'une mesure au sein d'un ensemble d'échantillons, associée à une intensité de couleur selon la quantité relative du caractère dans chaque échantillon.



(« **distance H-T** », Hémolymphe-Tissu), tous les locus présentant une donnée manquante sur au moins un des tissus ne sont pas pris en compte lors de la comparaison.

Comparaison des génotypes au sein d'individu

Nous avons utilisé plusieurs distances pour comparer les échantillons issus de l'hémolymphe de la branchie d'un même individu. Ces distances dépendent des marqueurs utilisés car le contenu en information des microsatellites est supérieur à celui des SNPs.

Pour le **typage SNP**, pour chaque individu, nous avons comparé les génotypes inférés sur chaque tissu (hémolymphe et branchies) et compté le nombre de locus ayant des génotypes discordants (ici appelé LD). Cette distance est utilisée en phylogénie lorsqu'il y a besoin de relaxer un certain nombre d'hypothèses courantes en génétique des populations.

Pour le **typage microsatellite**, pour chaque individu, nous avons sommé le nombre d'allèles différents entre les tissus en écartant le locus s'il y avait des données manquantes (AD). Cette « distance » a plusieurs noms et avatars dans la littérature en génétique, elle est très proche de la distance de Hamming. Pour l'expliquer autrement, les distances H-T sont exprimées dans des unités différentes selon le type de marqueurs. La distance H-T sera en différence d'allèles dans le cas de marqueurs microsatellites ou en différence de locus dans le cas de marqueurs bi-alléliques.

d. Résultats

Détection et correction d'erreurs lors de la préparation des plaques

L'utilisation du jeu de données CP_ABD typé sur les microsatellites a permis la détection d'une erreur lors de la préparation des plaques. La carte thermique présentait (*Figure 8A*) comme attendu une diagonale (un échantillon comparé avec lui-même sera toujours identique) mais aussi certains échantillons provenant de populations différentes qui montraient des proximités trop importantes pour être possibles d'un point de vue biologique. Il a été facile de remonter à l'erreur et de la corriger. Après correction, sur la matrice triangulaire supérieure, apparait une ligne parallèle à la diagonale qui correspond à la comparaison de l'hémolymphe et de la branchie du même individu et comme attendu ces génotypes sont globalement très similaires (*Figure 8B*).

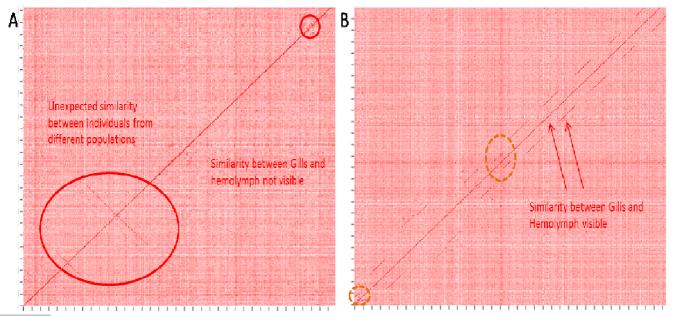


Figure 8 : Cartes thermiques (heatmap) de la campagne CP_ABD typée avec les 8 microsatellites. La distance utilisée est la distance de Bruvo adaptée à des marqueurs multi-alléliques et permettant de comparer des individus ayant des dosages alléliques différents. (A) A gauche la carte thermique avant correction et (B) à droite la carte thermique après correction. Plus la couleur est chaude (rouge) plus les deux échantillons comparés ont des génotypes proches. Les cercles rouges pointent des segments inattendus. Les cercles en tirets orange désignent les populations issues de sélections massales (Aig et Fiol, voir le matériel et méthodes pour plus d'information)



De plus, en milieu de carte thermique et sur le coin en bas à gauche (cercles en tirets rouge clair), les individus de cette population sont en moyenne plus similaires que ceux des autres populations. Il s'agit de deux populations de moules produites en écloserie et ayant fait l'objet une sélection massale. Il est attendu que les individus issus de cette population soient plus apparentés que les individus provenant des gisements naturels.

Différences alléliques entre les échantillons issus de branchies et d'hémolymphes

Individus triés issus de la campagne CP_ABD

Sur les 590 échantillons (CP_ABD) analysés sur les 8 locus microsatellites, la comparaison entre H-T a pu être conduite au sein de 283 individus ventilés sur 10 populations (avec un minimum Aig : 14 individus et un maximum Brv : 60 individus, une moyenne de 29.9 individus).

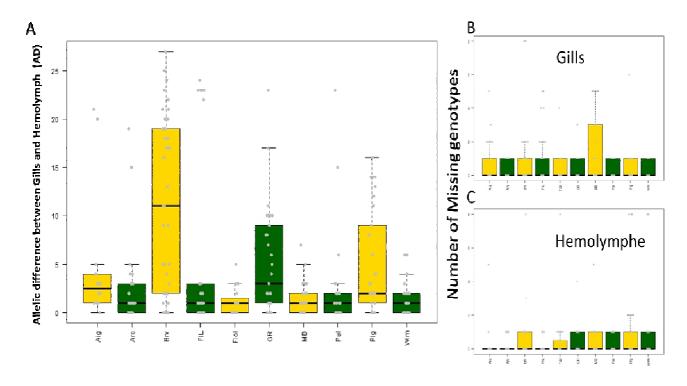


Figure 9 : (A) Boites à moustaches⁷ représentant les différences alléliques au sein des individus entre l'hémolymphe et la branchie. (B) Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe. Les données individuelles ont été reportées en gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses (jitter) pour faciliter la lecture. Le type de marqueur est le microsatellite. Les couleurs n'ont pas de signification particulière autre que celle de faciliter la lecture.

Les 8 marqueurs microsatellites montrent que la distance H-T (au sein des individus) moyenne est de 4.8 [allèles différents/nb locus] ce qui est supérieur à l'erreur technique. Cependant la *Figure 9A* montre que certaines populations concentrent des individus de certains sites qui ont un nombre important de différences alléliques (>4.8) entre les deux tissus analysés (*Kruskal-Wallis H= 58.339*, df = 9, p-value < 0.0001). D'ailleurs, pour les populations les plus atteintes Brv , GR et Plg les données brutes (gris clair) montrent un continuum (cf. *Figure 9A*, sites : GR et Plg) ou bien une masse d'individus ayant un nombre important de différences alléliques entre l'hémolymphe et la branchie (cf. *Figure 9A*, populations : Brv). Lors des comparaisons H-T, les locus avec données

_

⁷ Boite à moustaches ou Box-plot : dans les représentations graphiques de données statistiques, la boîte à moustaches est un moyen rapide de figurer le profil essentiel d'une série statistique quantitative avec au centre la médiane et les 2 quartiles Q1 et Q3 de part et d'autre.



manquantes ont été écartés, le détail de la répartition des données manquantes est donné par les *Figures 9B et 9C*.

Nombre de locus différents entre les échantillons issus de branchies et d'hémolymphes

Sur les 577 échantillons (CP_ABD) qui ont été envoyés à la plateforme de génotypage sur 101 SNP, une partie a dû être écartée pour des soupçons de contaminations et/ou des erreurs qui n'ont pas pu être corrigées. En tout, 267 individus ont pu être analysés sur deux tissus, l'aspect sur les hybridations entre individus est déjà discuté dans MORBLEU 2017 et ne sera pas rediscuté ici. Les effectifs sont répartis sur 10 populations (avec un minimum Aig: 13 individus et un maximum Brv: 57 individus, une moyenne de 26.7 individus).

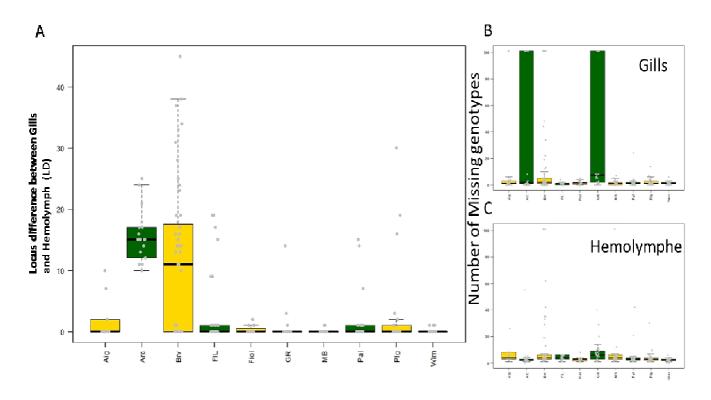


Figure 10 : (A) Boites à moustaches représentant pour l'analyse d'individus de la campagne CP_ABD, le nombre de locus différents (SNP) par individu entre un échantillon provenant de son hémolymphe et de sa branchie-Gills-. (B) Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe. Les données individuelles ont été reportées en gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses pour faciliter la lecture.

Les 101 marqueurs SNP montrent que la distance H-T (au sein des individus) moyenne est de 4.1 [génotypes différents/nombre totale locus] ce qui est bien supérieur à l'erreur technique. Cependant la *Figure 10A* montre que des individus de certains sites ont un nombre important de locus différents (> 5 en terme de LD cf axe des y figure 10A) entre les deux tissus analysés (Kruskal-Wallis H=95.717, df=9, p-value < 0.0001). Comme pour la *Figure 9*, il existe quelques individus dans certains sites ayant un nombre important de locus différents entre les branchies et les hémolymphes (≥ 10 locus), il s'agit des sites Brv, FIL, GR, Pal et Plg. Il est noté que la *Figure 10* n'est pas complètement superposable avec la *Figure 9*, bien que les échantillons analysés soient identiques. Lors des comparaisons H-T, les locus avec données manquantes ont été écartés, le détail de la répartition des données manquantes est donné par les *Figures 10B et 10C*.

Individus issus de populations non triées issus de la campagne CP_JB

Il est intéressant de comparer les résultats de typage SNP à l'autre campagne d'échantillonnage CP_JB où 1654 échantillons ont été analysés, ce qui permet de comparer les génotypes issus des branchies et de



l'hémolymphe sur 721 individus. Ces individus sont ventilés sur 30 points de prélèvements (gisements sauvages et élevages) avec une moyenne de 24 individus avec un minimum de 13 pour JOS_002 et un maximum de 25 pour la grande majorité des populations.

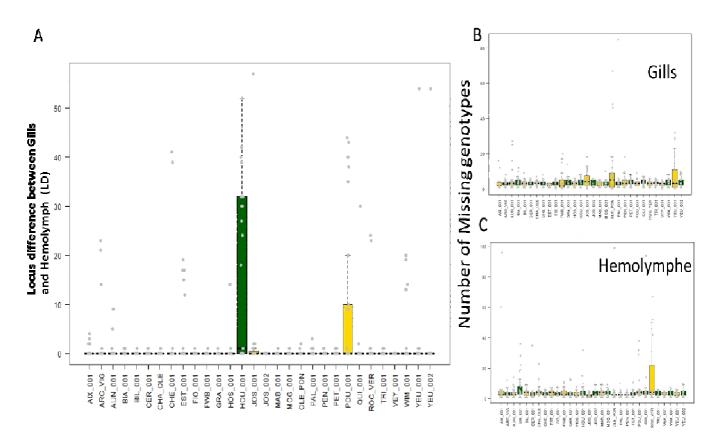


Figure 11 : (A) Boites à moustaches représentant pour l'analyse d'individus de la campagne CP_JB le nombre de locus différents par individu entre un échantillon provenant de son hémolymphe et de sa branchie. (B) Nombre de locus avec des données manquantes sur les branchies et (C) sur l'hémolymphe. Les données individuelles ont été reportées en gris clair et avec une déviation aléatoire sur l'axe d'abscisses pour faciliter la lecture.

Les 101 marqueurs SNP montrent que la distance H-T moyenne (au sein des individus) est de 1.9 [génotypes différents/nombre totale locus] ce qui est juste supérieur à l'erreur technique. Mais de la même manière que pour la *Figure 10*, la *Figure 11* montre qu'il existe des disparités fortes entre les populations étudiées (Kruskal-Wallis H = 77.786, df = 29, p-value < 0.0001) et au sein des populations (Brown-Forsythe F = 5.747, df-num = 29, df-denom = 178.44, p-value < 0.0001). En admettant qu'une distance LD de 5 est un bon seuil de discrimination entre les individus sains et atteints, il est possible d'estimer une prévalence instantanée pour les sites CP_B .

Dans les aires d'échantillonnages communes entre les jeux de données CP_JB et CP_ABD, la population POU_001 montre la même tendance que les individus Plg (moules triées de la campagne CP_ABD). Bien que les cohortes soient différentes, ce site montre une quantité non négligeable d'individus (8 individus ayant plus de 5 génotypes différents entre les deux tissus) présentant un grand nombre de locus différents entre la branchie et l'hémolymphe. Ceci d'autant plus que les individus de la population POU_001 n'ont pas été sélectionnés à priori sur le critère « qualité cytométrique ». De façon plus discrète, il y a aussi quelques individus chimériques (fortes distance H-T) à ARC_001, WIM_001 qui correspondent aux populations Arc et Wim. Cependant, il existe des sites de prélèvements où les tendances ne sont pas similaires, par exemple le site de Wimereux sur la campagne CP_JB montre 5 individus ayant une distance H-T anormalement élevée et 0 pour la campagne CP_ABB et inversement pour le site de la Pallice par exemple.



Tableau 5 : détails du nombre d'individus de la campagne CP_JB (moules non triées) par site de prélèvement et génotypés (SNP), du nombre d'individus supposés atteints en prenant le seuil de LD > 5 et la prévalence instantanée.

site	total	atteint(SNP)	%prévalence
AIX_001	23	0	0.0
ARC_VIG	24	3	12.5
AUN_001	25	2	8.0
BIA_001	25	0	0.0
BIL_001	25	0	0.0
CER_001	25	0	0.0
CHA_OLE	25	0	0.0
CHE_001	25	2	8.0
EST_001	25	5	20.0
FIO_001	25	0	0.0
FWB_001	25	0	0.0
GRA_001	19	0	0.0
HOS_001	25	2	8.0
HOU_001	25	12	48.0
JOS_001	24	1	4.2
JOS_002	13	0	0.0
MAB_001	25	0	0.0
MOG_001	25	0	0.0
OLE_PON	25	0	0.0
PAL_001	25	0	0.0
PEN_001	25	0	0.0
PET_001	25	0	0.0
POU_001	25	8	32.0
QUI_001	25	2	8.0
ROC_VER	25	3	12.0
TRI_001	25	0	0.0
VEY_001	19	0	0.0
WIM_001	25	5	20.0
YEU_001	25	1	4.0
YEU_002	25	2	8.0
	∑=703	∑=48	moy.=6.8%

Comparaison entre données de génotypage microsatellites et SNP

Le jeu de données CP_ABD a été génotypé avec deux types de marqueurs différents. La comparaison révèle que 39 individus montrent à la fois un nombre de locus différents (>5 LD) et un nombre d'allèles différents (>5 AD) entre branchies et hémolymphe (*Figure 12*).

A noter que 22 individus montrent des distances H-T importantes que sur les marqueurs SNP (pas sur les microsatellites, *Figure 12*) et 31 individus montrent des distances H-T importantes que sur les marqueurs microsatellites (et pas sur les SNP, *Figure 12*). Globalement, comparativement aux SNP, le génotypage avec les microsatellites semble mettre en évidence plus d'individus présentant une distance H-T importante.



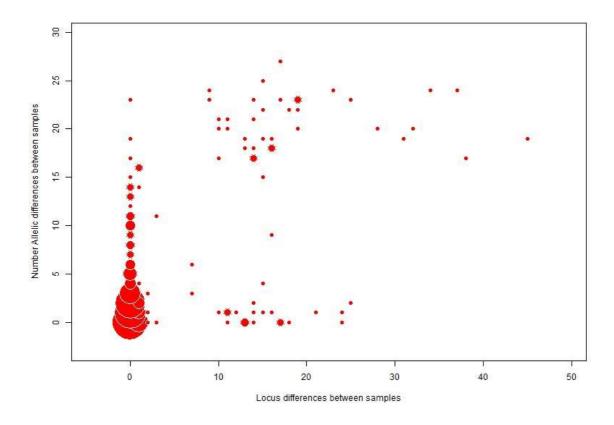


Figure 12 : Graphique à bulles représentant le nombre d'individus (rayons du cercle) en fonction du nombre de différences alléliques en y (AD, issu des 8 microsatellites) et du nombre de locus différents en x (LD, issu des 101 SNP) entre les deux échantillons intra-individu (comparaison H-T sur moules CP_ABD).

Comparaison entre les profils cytométriques et génétiques

Le jeu de données CP_ABD permet de comparer les signaux génétiques et cytométriques pour 71 individus. Bien souvent, les individus ayant des profils cytométriques anormaux (montrant une portion non négligeable de cellules hémiques non diploïdes et avec des niveaux de ploïdie les plus élevés) présentent aussi un nombre important de différences génétiques entre leurs tissus analysés et cela pour les deux types de marqueurs génétiques utilisés ici (*Figure 13*). Cependant, certains cas semblent discordants. C'est le cas par exemple de l'individu (Pal30) qui, bien qu'il apparaisse comme étant le plus atteint du point de vue cytométrique (moyenne cytométrique de 882), dans le sens où il possède une majorité de noyaux au-delà de 9-10 n, il n'est pas celui qui présente des distances H-T les plus importantes.

Similairement, des individus ayant d'autres profils cytométriques anormaux ne présentent pas (ou peu) de différences entre H-T. Ceci pourrait suggérer que les anomalies cytogénétiques (aneu-polyploïdies) identifiées par la cytométrie en flux s'accompagnent, à des degrés divers qu'il reste à identifier, de modifications génétiques identifiées de façon globalement concordantes par les deux approches de génotypage utilisées (microsatellites et SNP).



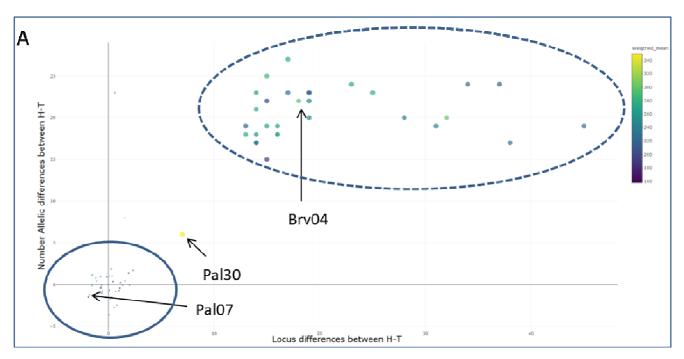


Figure 13: Graphique de la qualité cytométrique des individus (couleur, plus la couleur est chaude plus les individus sont anormaux) en fonction du nombre de locus différents (LD, issu des 101 SNP) en abscisse et du nombre de différences alléliques (AD, issu des 8 microsatellites) en ordonnée entre les deux échantillons intra-individu (comparaison H-T). Les petits points correspondent à des points qui se superposent sur l'axe des x et/ou des y, pour lesquels, afin de faciliter la visualisation, une valeur aléatoire (jitter-déviation) a été ajoutée sur les coordonnées. Seuls les échantillons avec de la donnée sur les marqueurs génétiques et en cytométrie en flux sont représentés. Plusieurs individus sont pointés car le cryptogramme est présenté plus en détail ci-après. L'individu le plus atteint Pal30 a une valeur cytométrique moindre (rapportée à 350 ici, valeur la plus forte pour ne pas écraser l'échelle de couleur). Le cercle en trait plein figure les individus dont les distance HT sont faibles voire nulles mais dont les moyennes cytométriques montrent une certaine atteinte. En tiret, les individus dont les moyennes cytométriques et les distances HT concordent sur le fait d'une cancérisation en cours d'évolution

e. Discussion

Le croisement du génotypage réalisé avec des microsatellites et SNP sur des individus triés par cytométrie en flux (*cf. rapport MORBLEU 2017, § 3.1.2*) apporte des informations complémentaires sur l'atteinte des individus ou pas.

Premièrement, si l'on choisit un seuil bien supérieur à l'erreur technique des appareils employés pour du génotypage pour déclarer des individus atteints, par exemple 5 (en unité de différence allélique ou de loci, cf. Figures 11 et 12), alors les jeux de données de génotypage (Microsat et SNP) sur les populations triées au préalable (CP_ABD) pointent conjointement 39 individus potentiellement atteints sur les 267 individus avec des données non-manquantes (soit 14.6% des moules triées du jeu de données CP_ABD). Dans le détail, le génotypage microsatellite pointe 71 individus potentiellement atteints et le génotypage SNP en pointe 61 (Tableau 6). Les discordances entre les deux jeux de génotypage proviennent de plusieurs effets qu'il est difficile de distinguer :

- *i)* La nature des marqueurs utilisés (Microsatellites et SNP) est très différente et intègre des informations complémentaire, l'un est un marqueur de taille (type répétitions) et l'autre apportant une information complémentaire sur un nucléotide dans le génome,
- *ii*) ces marqueurs apportent une information ponctuelle sur l'état du génome que l'on ne peut pas croiser dans le cas des Microsat et SNP (les locus génotypes proviennent de région différentes).
- iii) la mesure de cytométrie en flux, à l'époque n'avait pas encore permis d'observer des ploïdies supérieures à 10n (*cf. Figure 16*). Il est possible qu'un certain nombre d'individus classés avec des ploïdies faibles soient sous-estimés (individus dans le cercle plein de la *Figure 13*).



Deuxièmement, lorsqu'on croise les informations du génotypage et celles issues de la cytométrie en flux, les individus désignés par l'approche génétique comme étant atteints (cf. paragraphe du dessus) ont effectivement des profils cytométriques anormaux, avec des proportions de noyaux non diploïdes dans un continuum de ploïdie allant de 3N à >10N (Figure 14).

Troisièmement, en admettant que le seuil de 5 en termes de distance H-T sur les marqueurs SNP est un bon seuil pour discriminer les animaux atteints des animaux non atteints (*cf.* remarques ci-dessus sur les discordances entre les marqueurs génétiques sur la campagne CP_ABD), il est possible d'estimer une prévalence instantanée dans la campagne CP_JB, elles sont comprises entre 0 et 48% (tableau 5). Malheureusement, il n'a pas été possible de vérifier en histologie et en cytométrie en flux ces individus ayant des fortes distances H-T.

Tableau 6 : Bilan du nombre d'individus désignés comme atteints en fonction des différents outils.

	SNP	MicroSat	SNP+Microsat	Cytométrie	Cytométrie+SNP+Microsat
CP_JB	47	NA	NA	NA	NA
CP_ABD	61	71	39	36	20

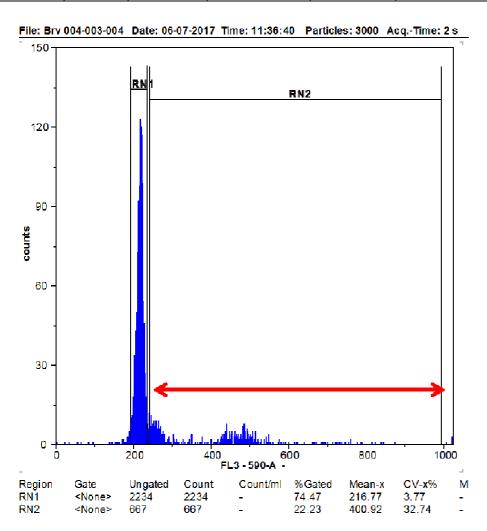


Figure 14 : Profil cytométrique de la moule Brv04 avec une basse qualité cytogénétique. En plus des noyaux diploïdes normaux (RN1), les autres noyaux sont aneuplo-polyploïdes compris dans une vaste gamme de ploïdie (double flèche rouge, RN2).



L'exception à cette concordance entre différences génétiques et profil cytométrique anormal est représentée par l'individu Pal07 (*Figure 13, Figure 15*). En effet, bien que l'analyse cytométrique de cet individu permet de le classer parmi les moules de basse qualité cytogénétique, il y a néanmoins peu de différences génétiques entre ces deux tissus analysés. Toutefois, l'examen plus précis de son profil cytométrique permet de montrer que la majorité (sinon la totalité) des noyaux non diploïdes se trouve dans une gamme légèrement hyper-diploïde (estimée à 2n, 3n) très proche de l'état diploïde normal de 2n (*Figure 15*). Ceci suggèrerait pour cet individu que l'aneuploïdie constatée (légère hyperdiploïdie à 2n,3n) n'est pas encore accompagnée par des anomalies (mutations) génétiques qui s'installeraient probablement au fur et à mesure des mitoses anormales qui conduisent à l'apparition du continuum de noyaux non diploïdes décrit pour les autres individus de ce groupe.

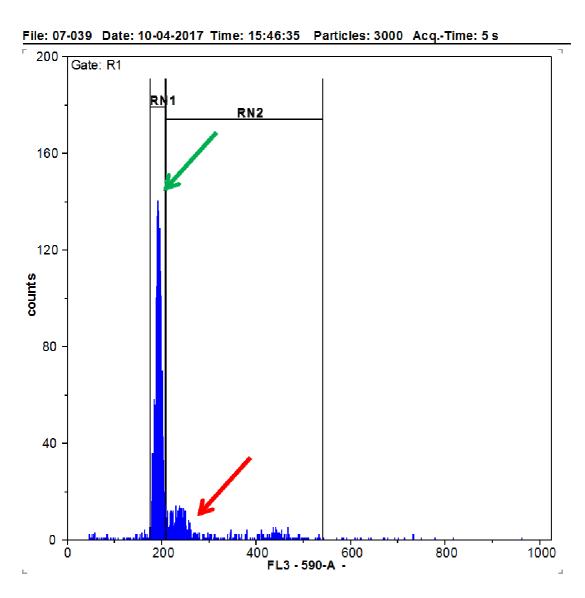


Figure 15 : Profil cytométrique de l'individu Pal07. En plus des noyaux diploïdes normaux (flèche verte), les autres noyaux nondiploïdes sont légèrement hyperdiploïdes (2n,3n, flèche rouge).

Au-delà du cas de cet individu Pal07, 12 autres individus semblables qui apparaissent après analyse par les marqueurs génétiques comme étant non/peu atteints, présentent néanmoins des anomalies cytogénétiques comparables détectées par cytométrie en flux (et hémocytologie). Comme pour l'individu Pal07, ceci plaiderait pour l'explication probable selon laquelle ces individus présentent des anomalies cytogénétiques qui touchent leur propre génome et qui restent donc indétectables via les marqueurs génétiques tant que les aneu-polyploïdies ne se sont pas accumulées suites aux multiples mitoses anormales



génératrices de diversité tout le long du processus néoplasique. Ces individus ne sont pas néoplasiques au sens strict du terme, mais plutôt dysplasique, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un trouble du développement des cellules de l'individu et non de l'implantation (et développement) de cellules néoplasique allochtone (d'autre individu).

En définitive, la cause des profils cytogénétiques anormaux n'obéit pas forcement à un seul processus exclusif :

- i) il semble que le fait que des individus atteints (profil cytométrique anormal) ont peu de différence H-T supporte **l'hypothèse d'une origine endogène à l'animal (dysplasie)** et qui est détectable par la cytométrie en flux. Autrement dit, des individus (plutôt *M. edulis*, dans certaines conditions) vont accumuler des modifications cytométriques avant de connaître des mutations et peut être une transformation vers un stade transmissible.
- ii) Superposé à cela, il est possible d'imaginer un cancer (avec une ou plusieurs lignées) allogène (origine externe, étrangère) dû à la **transmission d'un cancer à partir de cellules allochtones** (cellules d'autres individus) qui viendraient coloniser l'animal. Ces animaux seraient atteints de la néoplasie hémocytaire transmissible bien décrite chez d'autres espèces de bivalves.

L'autre individu marquant de ces analyses est Pal30 dont les distances H-T sont proches du seuil ceci bien que le profil cytométrique est le plus atteint et parlant du jeu de donnée CP_ADB montrant une nette majorité de noyaux néoplasiques caractérisés par de haut niveau de ploïdie (9n-10n), (Figure 16).

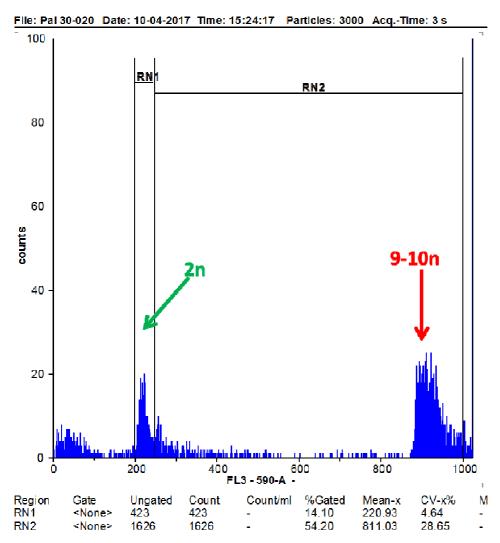


Figure 16 : Profil cytométrique de l'individu Pal30. En plus des noyaux diploïdes normaux (flèche verte), les autres noyaux nondiploïdes les plus représentés sont des noyaux néoplasiques à très haut niveau de ploïdie, 9-10n (flèche rouge).



De façon concordante à son profil cytométrique, l'analyse du profil histo-hémocytologique (par examen cytologique et histologie) de cet individu Pal30 montre que ses cellules hémiques sont pratiquement exclusivement de type néoplasique classique, avec la présence très dominante de grandes cellules prolifératives, indifférenciées et pourvues de très grands noyaux pléomorphes. Il apparait donc évident que cet individu est atteint de néoplasie disséminée au stade terminal, stade durant lequel tout le soma de l'animal est envahi/remplacé par les cellules néoplasique (*tumor purity* à son extrême) rendant ainsi la discrimination génétique entre hémolymphe et branchies très peu faisable et expliquant la quasi similitude du profil génétique pour ces deux tissus. Il est possible d'envisager le cas, d'un « individu-tumeur » ne présentant pratiquement pas de distance H-T.



En résumé

-A partir de moules **triées** au préalable par **cytométrie en flux** sur la base du niveau d'anomalies génomiques de leur hémolymphe, on a pu classer les individus en deux catégories, sains et anormaux. Pour ceux qui présentent le statut anormal, on soupçonne qu'ils soient affectés par une maladie de leurs cellules circulantes (hémocytes) appelée **néoplasie hémocytaire**.

- -Pour vérifier cette **hypothèse**, une des techniques de choix face à ce type de maladie consiste à étudier s'il existe une différence de génotype (**génotypage** de séquences ADN) entre le tissu malade (les cellules hémocytaires de l'hémolymphe) et un tissu non affecté du même individu (branchie par exemple). Si une différence de séquences ADN apparaît entre les deux tissus (H-T) de cette même moule cela confirmerait la présence d'un **processus néoplasique** en cours dans ses cellules hémocytaires. Cette différence entre les séquences ADN des deux tissus s'exprime en termes de « **distance** ».
- Afin de vérifier cette hypothèse, un travail spécifique a été réalisé pour évaluer par deux méthodes de génotypage différentes, microsatellites et SNP, s'il existait une différence de génotype entre les deux tissus d'un même individu. Cette démarche été mise en œuvre sur différents sites d'élevage ou de gisements de moules, chaque individu étant analysé pour son hémolymphe et sa branchie de manière croisée par les deux techniques microsatellites et SNP. Le cas échéant, si les deux techniques produisaient un résultat concordant de « forte distance » entre les deux tissus pour un individu donné cela confirmerait l'atteinte de l'animal par un processus néoplasique.
- -Au bilan, le **génotypage** croisé avec des **microsatellites** et des **SNP** pointe conjointement 39 individus atteints par un processus néoplasique sur 267 testés, (animaux triés avec profils cytométriques anormaux et distance H-T importante), cependant une fraction non négligeable d'individus, pour lesquels les profils cytométriques sont anormaux, ne sont pas détectés par les outils génétiques (processus de type dysplasique à l'œuvre peu compris). L'analyse basée sur l'utilisation seule du génotypage par **microsatellites** des tissus H-T de ces mêmes 267 animaux a discriminé 71 individus présentant du chimérisme.
- -Sur les moules non triées au préalable et issues de gisements, les outils génétiques permettent une estimation grossière des « prévalences instantanées » en 2017 (via les données SNP obtenues sur 30 populations hors cheptels) avec 13 populations affectées et des valeurs allant de 0 à 48% dans certains sites de prélèvements et une moyenne de 6.8% pour les 703 moules analysées. Ces données sont des « instantanés » et aucune donnée antérieure chez la moule en France pour cette approche sur deux tissus n'est disponible afin d'interpréter ces valeurs. Entre 2014 et 2018, l'année 2017 a présenté les plus faibles niveaux de mortalité de moules.
- Concordance: lorsqu'on croise les informations obtenues par génotypage et celles issues de la cytométrie en flux, les individus désignés par l'approche génétique comme étant atteints ont effectivement des profils cytométriques anormaux, avec de grandes proportions de noyaux non diploïdes dans un continuum de ploïdie allant de 3N à 10N. L'analyse inverse présente moins de concordance.

Cette étude a permis de confirmer :

- -que la méthode de génotypage avec 8 microsatellites employée précédemment (rapport MORBLEU 2016) est pertinente pour caractériser des différences génétiques entre deux tissus (hémolymphe et branchie) d'une même moule, signature d'une néoplasie en cours. Ceci est également vrai pour le génotypage SNP;
- -que dans les populations de moules échantillonnées en 2016 et en 2017 en France, la détection de cas de néoplasie hémocytaire est possible et confirmée par une approche de double génotypage (39 individus sur 267 pré-triés et testés) et qu'un autre processus de type dysplasique semble toucher un nombre plus important d'individus. Le caractère -origine transmissible- des néoplasies observées est possible et suspecté dans certains cas mais pas majoritaire;
- -que les données de **cytométrie** obtenues sur l'hémolymphe des moules sont globalement cohérentes avec celles des génotypages effectués sur de lots triés. La capacité de cette méthode à pouvoir détecter et caractériser précocement des processus néoplasiques hémocytaires chez la moule bleue est confortée par cette étude mais une comparaison complémentaire génotypage/cytométrie sur des populations variées, à différentes périodes, renforcerait la pertinence de l'utilisation de cet « outils ».

Cette étude interroge sur les origines diverses et possibles, non pas de la néoplasie mais —des néoplasies et de leur processus-, ceci notamment au regard des données particulières chez des cas /individus analysés par : cytométrie en flux, hémocytologie, histologie (cf. § 3.1.2) et génotypage sur deux tissus.

Facteur causal ou facteur de risque, ou les deux ? La néoplasie hémocytaire est bien détectée. Son « poids » dans les mortalités de moules reste à approfondir en lien avec d'autres facteurs et nécessite des investigations complémentaires.



3.1.2. Etude par histologie des lots de moules utilisés en 2017 dans certaines actions de MORBLEU

Afin d'approfondir la caractérisation des liens entre anomalies cytogénétiques et la néoplasie (*cf. § 3.1.1*), les lots de moules utilisés en 2017 dans le cadre de MORBLEU ont été aussi analysés par histologie afin de rechercher la présence d'agents pathogènes et/ou de lésions tissulaires/cellulaires. Ce travail a été réalisé par le LNR de la Tremblade accrédité pour l'histologie. Les données présentées ci-après correspondent au bilan global de l'analyse histo-pathologique qui intègre à la fois les résultats des sept lots analysés en 2017 ainsi que les huit lots analysés en 2018 qui n'avaient pu être traités pour le rapport MORBLEU bilan 2017.

15 lots de moules ont été reçus en mars – avril 2017, excepté pour les lots T0 reçus en novembre 2016 et le lot Le Pouliguen reçu en juillet 2017 (Tableau 7). Ces lots étaient issus :

- soient de populations situées en zone d'élevage ou au sein de gisements naturels exploités ou non exploités,
- soient de populations produites dans des installations expérimentales composées d'un lot témoin et d'un lot « sélectionné »⁸ (lot de moules issus de géniteurs collectés dans une zone fortement impactée par les mortalités, obtenu par sélection massale dans le but d'améliorer la survie des moules lors des épisodes de mortalités *in situ, cf. § 4.1.*).

Un tri préalable de ces individus a été réalisé en cytométrie en flux et donc ces lots ainsi constitués ne sont pas représentatifs des populations. Il s'agit des individus issus de la campagne CP_ABD (cf. § 3.1.1)

Tableau 7 : Origine des lots de moules reçus pour analyses histologiques

Populations prélevées dans des a sein de gisements	Populations produites dans des installations expérimentales			
Site	Site Nombre d'individus		Nombre d'individus	Caractéristique du lot
Maison Blanche (Vendée)	30		40	Témoin
La Guérinière (Vendée)	30	sur site	40	« Sélectionné»
Filières (Charente Maritime)	30	Aiguillon (Charente	30	Témoin
La Pallice (Charente Maritime)	30	Maritime)	30	« Sélectionné»
Pointe aux Oies (Pas de Calais)	30	Le Fiol	29	Témoin
Bassin d'Arcachon, La Vigne (Gironde)	30	(Vendée)	28	« Sélectionné »
Le Pouliguen	20	Ecloserie La Tremblade	28	Témoin
(Loire Atlantique)	29	(Charente Maritime)	29	« Sélectionné »

⁸ Moules sélectionnées, sélection : dans ce rapport, le terme « lot sélectionné » désigne un lot de moules obtenu à partir de géniteurs du milieu collectés dans une zone ayant subi des épisodes de mortalité (ces animaux survivants pouvant être considérés comme des individus ayant subi une pression de sélection naturelle forte).

_



Histologie: c'est l'étude de la structure microscopique des tissus animaux et végétaux et des cellules qui les composent. Elle se situe au carrefour de la biologie cellulaire, de l'anatomie, de la biochimie et de la physiologie. Elle a pour objectif d'explorer la structure des organismes vivants, les rapports constitutifs et fonctionnels entre leurs organes. Elle peut rechercher des processus pathologiques et leurs effets, rechercher des parasites (**Histopathologie**). Classiquement, la base de l'observation se fait au moyen d'un microscope à partir de coupes de tissus fixés montées sur lame de verre.

L'ensemble des lots analysés en histologie était composé d'animaux vivants dont le « statut cytogénétique » avait été déterminé au préalable par des analyses en cytométrie en flux (*cf. rapport MORBLEU bilan 2017, § 3.1.2*). Sept lots avaient été analysés en histologie en 2017 ; l'ensemble des analyses histologiques a été achevé pour les quinze lots en 2018.

3.1.2.1. Observation d'organismes pathogènes

Sur les différents lots analysés, peu d'organismes pathogènes ont été détectés (Tableau 8).

Les quelques organismes pathogènes observés tels que des ciliés, des spores de grégarines, des turbellariés ou des copépodes sont classiquement observés chez les moules et ne présentent pas de réel impact. De même, sur les sites de La Vigne, Le Pouliguen et La Pointe aux Oies, des trématodes au stade métacercaire ont été notés. Généralement, les trématodes observés à ce stade présentent peu d'impact sur les coquillages car ils ne profilèrent pas dans les individus. Aucun trématode au stade sporocyste (multiplication importante des trématodes dans les individus infectés pouvant fortement altérer l'état de santé des coquillages) n'a été observé chez les différents individus analysés.

Le seul organisme pathogène notable observé est l'agent réglementé *Marteilia refringens* (type M) sur le gisement naturel de La Pointe aux Oies. La présence de cet agent est associée à une forte réaction inflammatoire accentuée par sa localisation atypique. En effet, l'espèce *Marteilia refringens* est un parasite de la glande digestive; or, dans ce lot, ces parasites sont principalement retrouvés dans les branchies et le manteau. Une telle localisation de ce parasite a déjà été observée sur différents sites en Normandie et peut avoir un impact sur la santé des coquillages. Cette détection avait fait l'objet d'une déclaration auprès de la DGAL en 2017.



Tableau 8 : Organismes pathogènes observés sur les différents sites au cours de l'étude

	Organismes pathogènes										
Sites	Grégarines (spores)	Bactéries indéterminées	Ciliés indéterminés	Copépode	Métazoaire indéterminé	Marteilia refringens	Trématode (métacercaire)	Bactérie de type rickettsien	Turbellarié		
Maison Blanche	12 (40%)	7 (23%)	1 (3%)	-	-	-	-	-	-		
La Guérinière	1 (3%)	-	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)	-	-	-	-		
Filières	-	3 (10%)	-	-	-	-	-	-	1 (3%)		
La Pallice	-	5 (17%)	-	5 (17%)	-	-	-	-	1 (3%)		
Pointe aux Oies	1 (3%)	3 (10%)	1 (3%)	-	-	8 (27%)	23 (77%)	-	2 (7%)		
La Vigne	-	-	-	1 (3%)	-	-	3 (10%)	-	2 (7%)		
Le Pouliguen	-	-	-	-	-	-	6 (21%)	-	-		
T0 Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
T0 « sélectionné »	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Aiguillon Témoin		2 (7%)	3 (10%)	-	1 (3%)	-	-	1 (3%)	-		
Aiguillon « sélectionné »	-	-	3 (10%)	-	-	-	-	-	-		
Le Fiol Témoin	-	1 (3%)	7 (24%)	-	-	-	-	1 (3%)	-		
Le Fiol « sélectionné »	-	1 (4%)	-	3 (11%)	1 (4%)	-	-	-	-		
Inst. exp ^{tales} La Tremblade Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Inst. exp ^{tales} La Tremblade « sélectionné » ⁹	-	1 (3%)	-	-	-	-	-	-	-		

Dans les colonnes, le premier chiffre correspond au nombre d'individus détectés infectés et celui entre parenthèses à la proportion d'individus détectés infectés.

3.1.2.2. Observation de lésions tissulaires

Différents types de lésions tissulaires ont été observés sur les lots analysés.

_

⁹ Moules sélectionnées, sélection : dans ce rapport, le terme « lot sélectionné » désigne un lot de moules obtenu à partir de géniteurs du milieu collectés dans une zone ayant subi des épisodes de mortalité (ces animaux survivants pouvant être considérés comme des individus ayant subi une pression de sélection naturelle forte).



a. Observation de néoplasie hémocytaire

Sur les quinze lots analysés, soient 463 individus, seuls sept individus (1,5%) ont présenté une néoplasie hémocytaire. Ces individus provenaient de deux secteurs :

- La Vigne dans le bassin d'Arcachon (6 individus)
- La Pallice en Charente Maritime (1 individu)

Sur les autres sites, aucune néoplasie hémocytaire n'a été observée.

Cette néoplasie hémocytaire se caractérisait par une prolifération anarchique des hémocytes présentant des propriétés cellulaires modifiées telles qu'une anisocaryose (inégalité de taille des noyaux d'une population de cellules homogènes, caractéristique de cellules cancéreuses), des anomalies des nucléoles (augmentation de taille, multiplicité), un rapport nucléocytoplasmique élevé (rapport du volume du noyau à celui du cytoplasme de la cellule) et de nombreuses figures de mitoses.

Les individus présentant de la néoplasie hémocytaire avaient un statut cytogénétique « anormal » (>10% de noyaux non diploïdes dans leur hémolymphe) mais n'étaient pas ceux qui présentaient le pourcentage le plus élevé de noyaux non diploïdes dans leur hémolymphe.

b. Observation de lésions au niveau des follicules gonadiques

Sur la majorité des lots analysés, des lésions particulières ont été notées au niveau des follicules gonadiques principalement chez les individus mâles. Ces lésions se caractérisent par la présence de cellules plurinucléées et de cellules hypertrophiées dans les follicules gonadiques.

De telles lésions ont déjà été décrites dans la littérature par Alonso *et al.* (2001) et les auteurs suggéraient qu'elles étaient évocatrices d'un potentiel cancer des cellules germinales mais qui restait à confirmer. Ces lésions avaient également été observées majoritairement chez les mâles et essentiellement au printemps.

Dans l'étude, ces lésions ont été observées sur les lots prélevés au printemps, période de développement de la gonade. Ainsi, pour le lot prélevé sur le secteur de Le Pouliguen en juillet, ces lésions sont quasi-absentes car la majorité des individus étaient en phase de repos sexuel. Il en est de même pour les animaux prélevés en novembre 2016.

Seuls deux lots présentant des individus avec un développement gonadique en cours n'ont quasiment pas présenté ces lésions. Il s'agit des lots maintenus dans des installations expérimentales avec une eau filtrée et traitée aux UV.

c. Autres lésions

Des lésions inflammatoires ont été notées sur la majorité des lots analysés (Tableau 9). Elles sont caractérisées par des infiltrations hémocytaires et de nécroses tissulaires.

La majorité de ces lésions sont de faible intensité et ne présentent pas de caractère exceptionnel car elles sont classiquement observées chez les moules en dehors de période de mortalité. Les lésions les plus intenses ont été observées sur le site de La pointe aux Oies et sont notamment liées à la présence du parasite *Marteilia refringens*.

Une forte hypersécrétion au niveau des cellules épithéliales des diverticules digestifs a également été notée sur la majorité des lots analysés ainsi que des lésions des hémocytes : ils présentaient des anomalies cytoplasmiques (coloration basophile) entrainant une délimitation confuse entre le noyau et le cytoplasme.

La présence de granulomes a été observée chez 58 individus (soit 13% de l'ensemble des individus analysés). Les granulomes (ou granulocytomes) correspondent à une réaction inflammatoire chronique de l'individu face à un agent infectieux ou non infectieux (substance toxique, corps étranger...). La présence de granulome est très fréquente chez les moules et leur cause diverse. Certains auteurs ont noté une présence



plus conséquente de granulomes chez les moules dans des zones où l'activité anthropique est plus importante (Svardh et Johanesson, 2002).

Dans notre étude, la présence de granulome a été notée sur tous les secteurs exceptés sur certains sites en Charente Maritime et Vendée et leur fréquence de détection est très variable selon les sites.

Des suivis plus fréquents dans le temps seraient nécessaires pour pouvoir estimer si cette lésion peut être un marqueur de l'activité anthropique comme le signalent Svardh et Johanesson (2002), d'autant plus qu'un des sites où cette lésion n'a pas été observée au cours de l'étude 2017 correspond à un port.

Des suivis complémentaires seraient nécessaires pour définir en fonction des sites géographiques ou des types de population étudiés (gisements, élevages ou produites dans des installations expérimentales) l'existence ou non de différences en termes de fréquence de lésions tissulaires ou d'organismes pathogènes détectés. Cependant, il semblerait que les lots de moules issus de géniteurs collectés dans une zone fortement impactée par les mortalités présenteraient d'une manière générale moins de lésions tissulaires que les lots issus des populations témoins.

Tableau 9: Lésions tissulaires observées sur les différents sites au cours de l'étude 2017

	Lésions tissulaires							
Site	Infiltrations hémocytaires	Granulomes	Nécroses tissulaires	Hypersécrétion (diverticules digestifs)				
Maison Blanche	11 (37%)	6 (20%)	18 (60%)	16 (53%)				
La Guérinière	8 (27%)	9 (30%)	14 (47%)	2 (7%)				
Filières	9 (30%)	-	11 (37%)	27 (90%)				
La Pallice	8 (27%)	-	12 (40%)	26 (87%)				
Pointe aux Oies	21 (70%)	9 (30%)	20 (67%)	7 (23%)				
La Vigne	23 (77%)	5 (17%)	19 (63%)	20 (67%)				
Le Pouliguen	17 (59%)	10 (34%)	1 (3%)	-				
T0 Témoin	12 (30%)	2 (5%)	4 (10%)	-				
T0 « Sélectionné »	21 (52%)	2 (5%)	5 (12%)	4 (10%)				
Aiguillon Témoin	7 (23%)	1 (3%)	18 (60%)	15 (50%)				
Aiguillon « Sélectionné»	3 (10%)	-	15 (50%)	11 (37%)				
Le Fiol Témoin	17 (59%)	8 (28%)	15 (52%)	23 (79%)				
Le Fiol « Sélectionné»	9 (32%)	4 (14%)	8 (29%)	19 (68%)				
Ecloserie La Tremblade Témoin	18 (64%)	1 (4%)	9 (32%)	9 (32%)				
Ecloserie La Tremblade « Sélectionné » ¹⁰	9 (31%)	1 (3%)	2 (7%)	7 (24%)				

Moules sélectionnées, sélection : dans ce rapport, le terme « lot sélectionné » désigne un lot de moules obtenu à partir de géniteurs du milieu collectés dans une zone ayant subi des épisodes de mortalité (ces animaux survivants pouvant être considérés comme des individus ayant subi une pression de sélection naturelle forte).

_



Dans les colonnes, le premier chiffre correspond au nombre d'individus détectés infectés et celui entre parenthèses à la proportion d'individus détectés infectés.



En résumé

- En dehors des épisodes de mortalités et dans le cadre des expérimentations et études menées au cours du projet MORLEU en 2017, 15 lots de moules de diverses origines, triées selon leur statut cytogénétique (majoritairement de mauvais statut cytogénétique) ont été analysés par histologie afin de rechercher la présence d'agents pathogènes et/ou de lésions tissulaires/cellulaires.
- -Aucun organisme pathogène d'importance n'a été noté excepté sur le secteur de la Pointe aux Oies (Pas de Calais) où le parasite à déclaration obligatoire *Marteilia refringens* a été détecté.
- -Concernant les lésions tissulaires, la plupart étaient de faible intensité et classiquement observée chez les moules et d'autres mollusques bivalves. Aucun lien n'a été mis en évidence entre le statut cytogénétique des moules de ces 15 lots (données non montrées, voir rapport MORBLEU-2017 § 3.1.2) et les lésions observées en histologie. L'analyse comparée des données d'hémocytologie de ces lots devrait compléter cette étude.
- -De la néoplasie hémocytaire a été uniquement observée sur deux sites et concernait au total 7 individus (un seul individu sur le site de La Pallice (Charente Maritime) et 6 individus sur le site de La Vigne dans le bassin d'Arcachon.



3- Hypothèse d'une sensibilité des moules selon leur statut cytogénétique : anomalies génomiques, processus néoplasique, une maladie en lien avec les épisodes de mortalité ?

3.2. Anomalies cytogénétiques : Suivi individuel de l'évolution du profil cytométrique et relation avec le profil histologique

(Auteur principal: Benabdelmouna A.)

Dans le cadre général des épisodes de mortalité récurrents affectant les cheptels mytilicoles depuis 2014, des travaux menés au cours du projet MORBLEU ont pu démontrer grâce à des analyses de ploïdie par cytométrie en flux que la « qualité cytogénétique »¹¹ des moules (LCQ : niveau bas, statut anormal vs HCQ : niveau haut, statut normal), déterminée par la quantification des anomalies cytogénétiques affectant leur hémocytes, était très significativement corrélée avec les performances de survie de ces mêmes moules (Benabdelmouna & Ledu 2016). Par la suite, des travaux complémentaires combinant la cytométrie en flux et l'hémocytologie ont permis de montrer que des anomalies cytogénétiques détectées par cytométrie en flux peuvent être liées à un processus néoplasique affectant les cellules circulantes de l'hémolymphe des moules malades (Benabdelmouna et al. 2018; rapport MORBLEU 2017). Au terme de ces travaux de nouveaux questionnements se sont imposés, notamment :

- Le profil cytométrique définissant le statut cytogénétique (HCQ versus LCQ) d'un animal donné évolue-t-il ou pas au cours de sa vie, notamment au cours de la deuxième année durant laquelle survient généralement la mortalité?
- L'évolution du profil cytométrique d'un animal donné se traduit-elle par un effet sur la structure histo-cytologique des tissus de cet animal?

Pour répondre à ces questions, dans la continuité des trayaux réalisés en 2017 avec des moules issues des principaux sites mytilicoles le long de la façade maritime atlantique-Manche, un total de 12 lots différents de moules a été sélectionné. Ainsi, fin 2017, 600 moules ont été triées et chacune de ces moules a été individuellement marquée par une étiquette collée sur la coquille (Figure 17) nous permettant ainsi d'identifier facilement et à tout moment l'individu analysé ainsi que son site d'origine. Ces 12 lots de moules marquées ont été ensuite élevés jusqu'à la fin de l'année 2018 dans les structures sécurisées des installations expérimentales du LGPMM de la Tremblade à raison d'un lot par bac alimenté en eau de mer traitée aux UV.

Dans un premier temps, afin de qualifier la « qualité cytogénétique initiale » de chaque moule, les analyses ont été entreprises, par cytométrie en flux utilisant le marquage à l'iodure de propidium, en prélevant individuellement et de façon non létale un échantillon d'hémolymphe sur chaque moule et ceci en utilisant la méthode décrite par Benabdelmouna et Ledu (2016).

Par la suite, dans le but de suivre l'évolution de la qualité cytogénétique tout le long de la vie des moules, les mêmes analyses cytométriques ont été réalisées sur les mêmes moules marquées à intervalles réguliers tout au long de l'année 2018 et ceci jusqu'à la mort ou le sacrifice de l'animal. Enfin, juste après cette mort constatée ou le sacrifice, les tissus frais ont été prélevés afin de pouvoir réaliser les analyses histologiques permettant d'étudier la relation entre « qualité cytogénétique » et lésions tissulaires observées.

Dans la présente étude, les préparations et les analyses histologiques n'ont pas été réalisées par l'unité technique du LNR de la Tremblade.

¹¹ Qualité cytogénétique : par convention, ce terme est employé en cohérence avec les deux publications qui ont validé des travaux du même auteur avec cette terminologie (Elsevier, Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 2018)



La préparation, la réalisation des coupes et une partie de l'analyse histologique de cette étude a été confiée à un laboratoire agréé pour l'histo-cytopathologie des maladies des mollusques marins (Histalim, Montpellier).



Figure 17 : moules identifiées par une étiquette collée sur la coquille permettant de déterminer le lot (Filières) et l'individu (Fil H/L XX) tout le long de la période du suivi jusqu'à sa mort

Résultats:

Des suivis de cytométrie réalisés de façon non létale et non invasive (ponction d'hémolymphe) et à intervalles réguliers sur les moules marquées ont été entrepris de septembre 2017 jusqu'à l'arrêt en septembre 2018 pour cause de travaux sur les installations expérimentales de la Tremblade. Au terme de ces analyses, **quatre types de moules** peuvent être distinguées :

a) Type a : les moules dont le statut cytogénétique HCQ ne change pas au cours du suivi

Globalement, ces moules constituent environ 15-20% des moules analysées pendant ce suivi. Toutefois, en fonction des lots, ce pourcentage peut varier grandement avec un minimum observé pour les lots présentant une mauvaise qualité cytogénétique initiale.

Ce type de moules correspond à des individus qui ont été initialement identifiés en 2017 comme HCQ (hémolymphe avec moins de 5% de noyaux non diploïdes) et qui lors des différentes analyses réalisées en 2018 sont restés HCQ. Ces moules peuvent être considérées comme étant « saines » vis-à-vis du statut cytogénétique et ne subissent pas de mortalité lors de leur élevage dans nos installations en 2018.

Un exemple est illustré par la *Figure 18* montrant un cas typique, cas de la moule Yeu35 (individu 35 du lot « Ile d'Yeu ») dont le profil cytométrique reste HCQ tout au long de la série d'analyses réalisées successivement en octobre 2017, février, avril, et juillet 2018.

A la fin du suivi, des moules de ce type ont été sacrifiées, fixées et analysées par histologie. Les profils histologiques (examen des coupes) correspondants à ces moules sont parfaitement « normaux », sans lésion



identifiable ou anomalie hémocytaire suspecte (pas d'infiltration hémocytaire, pas de granulomes¹²...etc.). Un exemple de ce profil histologique est illustré par la *Figure 19*.

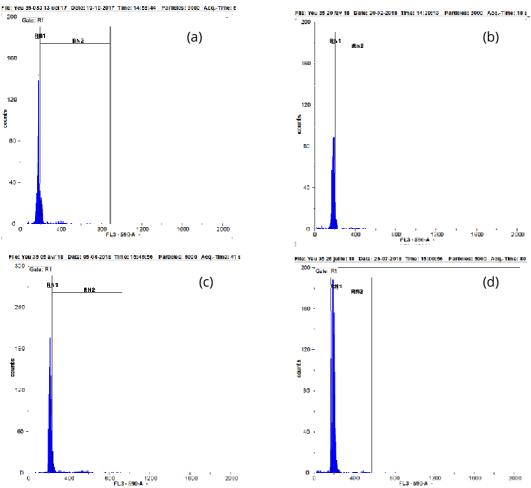


Figure 18 : Profils cytométriques HCQ (type a) obtenus pour la moule Yeu35 lors des différentes dates d'analyses (a : octobre 2017, b : février 2018, c : avril 2018, d : juillet 2018)

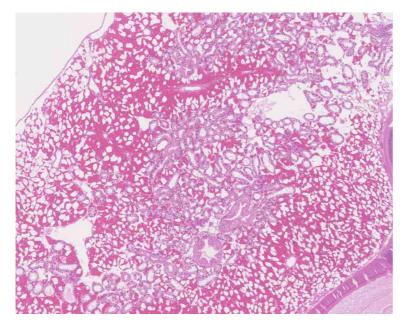


Figure 19 : Coupe histologique d'une moule HCQ ne montrant aucune anomalie notable

1

¹² Les granulomes ou granulocytomes : correspondent à une réaction inflammatoire chronique de l'individu face à un agent infectieux ou non infectieux (substance toxique, corps étranger...), lésion tissulaire non spécifique, elle peut se rencontrer dans certains cancers.



b) Type b : les moules dont le statut cytogénétique devient LCQ

Ce type de moules a constitué la majorité (environ 70%) des moules analysées durant le suivi. Au sein de ces moules classées LCQ (plus de 5% de noyaux non diploïdes dans l'hémolymphe), deux sous types ont été identifiés et cela en fonction de leur vitesse de progression vers un statut LCQ de plus en plus établi (avec un pourcentage de noyaux non diploïdes de plus en plus élevé) :

b1) les moules LCQ précoces (LCQ-p)

Ce type b1 correspond à des moules initialement HCQ ou légèrement LCQ et qui progressent de façon précoce dans le suivi (fin 2017 et début 2018) vers un statut LCQ de plus en plus marqué. Ces moules **LCQ-p** se sont révélées être très « sensibles à la mortalité » et meurent massivement dès le début de la période de mortalité printanière (de février à mars). Lors du suivi 2018, ce type de moules **LCQ-p** a représenté environ 40% des moules suivies avec une occurrence plus marquée pour les moules issues de sites où des lots ont été plusieurs fois identifiés comme ayant une mauvaise qualité cytogénétique initiale (voir rapports MORBLEU 2015, 2016, 2017).

Un exemple est illustré par la *Figure 20* montrant un cas typique, cas de la moule Pen12 (individu 12 du lot « Pénestin ») dont le profil cytométrique initialement HCQ lors de l'analyse réalisée en septembre 2017, devient de plus en plus LCQ lors des analyses de janvier et surtout de mars 2018, date juste après laquelle survient la mort de l'animal.

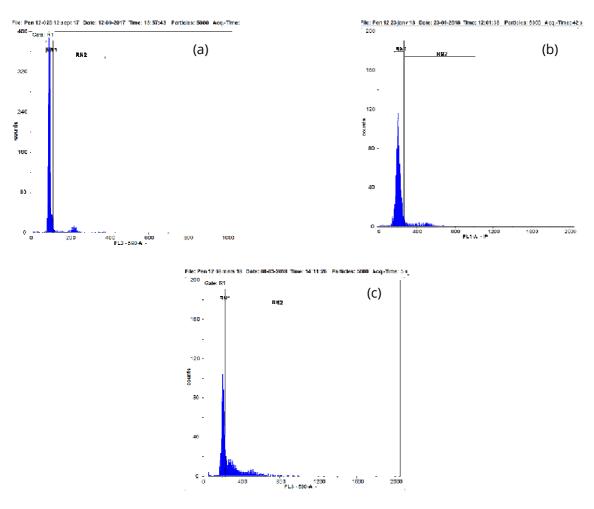


Figure 20 : Profils cytométriques **LCQ-p** (type b1) obtenus pour la moule Pen12 lors des différentes dates d'analyses (a : septembre 2017, b : janvier 2018, c : mars 2018)



Les animaux LCQ-p qui ont été fixés juste après leur mort pour examen histologique montrent tous un profil histologique caractéristique avec essentiellement des infiltrations hémocytaires et des granulomes. Un exemple de ce profil histologique est illustré par la *Figure 21*.

Pour chaque animal **LCQ-p** suivi, la mise en parallèle du dernier profil cytométrique (obtenu juste avant la mort) et du profil histologique (obtenu juste après la mort) nous a permis de montrer que la sévérité des anomalies histologiques observées est étroitement liée au degré de complexité du profil cytométrique correspondant. Ainsi, des animaux faiblement LCQ présentent des infiltrations hémocytaires localisées et peu étendues alors que les animaux fortement LCQ présentent des infiltrations beaucoup plus intenses et généralisées. Plus précisément, pour un animal **LCQ-p** donné, plus le profil cytométrique est complexe (différentes ploïdies détectées) et plus le pourcentage de noyaux non diploïdes est élevé juste avant la mort, plus les lésions tissulaires détectées à la mort de l'animal sont étendues, avec dans les cas extrêmes, une désorganisation complète des principaux tissus infiltrés.

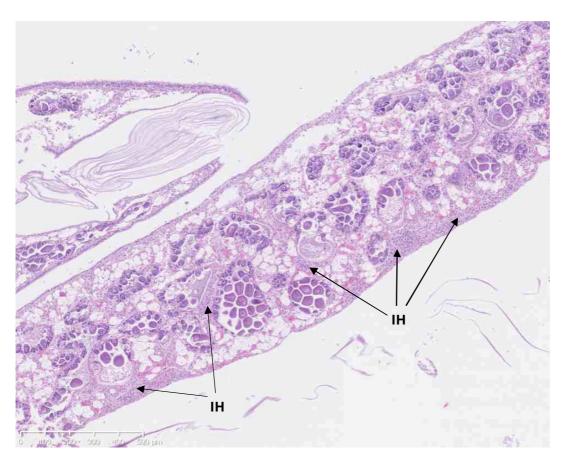


Figure 21 : Coupe histologique d'une moule LCQ-p montrant des infiltrations hémocytaires (IH) très étendues

b2) les moules LCQ tardives (LCQ-t)

Ce type b2 correspond à des moules initialement HCQ ou légèrement LCQ et qui gardent ce statut relativement inchangé tout le long du printemps et du début de l'été. Ces moules n'évoluent vers un statut fortement et clairement LCQ que tardivement dans la saison, à la moitié-fin de l'été. Dans notre étude, ces moules LCQ-t sont plus faiblement affectées par la « mortalité printanière » que les moules LCQ-p et cela vraisemblablement parce que ces moules présentent une meilleure résistance à l'épisode de mortalité en relation avec leur meilleure qualité cytogénétique durant cette même période. Leurs hémocytes apparemment moins altérés par les anomalies cytogénétiques permettent à l'animal d'avoir entre autres fonctions, une meilleure réponse immunitaire qui est principalement portée par ces cellules (Mitta *et al.*, 2000; Roch, 2002). Toutefois, ces moules présentent une mortalité chronique et tardive (mi-fin de l'été) qui coïncide avec l'évolution de leur statut cytogénétique vers un état LCQ plus avancé. Durant notre suivi, ces moules ont constitué environ 30-35% des moules analysées.



Un exemple est illustré par la *Figure 22* montrant un cas typique, cas de la moule Fil32 (individu 32 du lot « Filières ») dont le profil cytométrique est resté clairement HCQ jusqu'à février 2018 et a ensuite évolué relativement lentement (mai et juillet 2018) vers un statut LCQ qu'il n'atteint qu'à la fin du suivi fin août 2018.

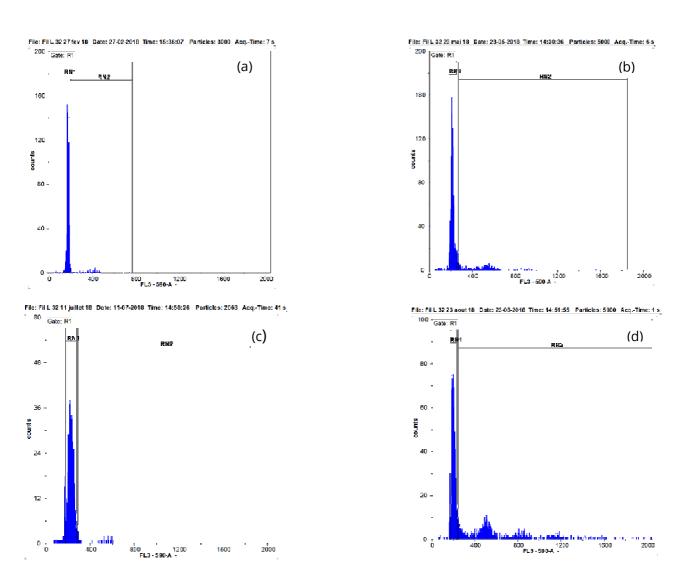


Figure 22 : Profils cytométriques **LCQ-t** (type b2) obtenus pour la moule Fil 32 lors des différentes dates d'analyses (a : février 2018, b : mai 2018, c : juillet 2018, d : août 2018)

Les moules **LCQ-t** qui ont été fixées juste après leur mort (ou à l'arrêt du suivi) montrent toutes les mêmes lésions que celles trouvées pour les moules **LCQ-p**, avec essentiellement des infiltrations hémocytaires et des granulomes. Un exemple de ce cas est illustré par la *Figure 23*. De même que pour les moules **LCQ-p**, la mise en parallèle du dernier profil cytométrique (obtenu juste avant la mort) et du profil histologique (obtenu juste après la mort) nous a permis de montrer que, chez les moules **LCQ-t**, la des lésions tissulaires observées est étroitement liée au degré de complexité du profil cytométrique correspondant.



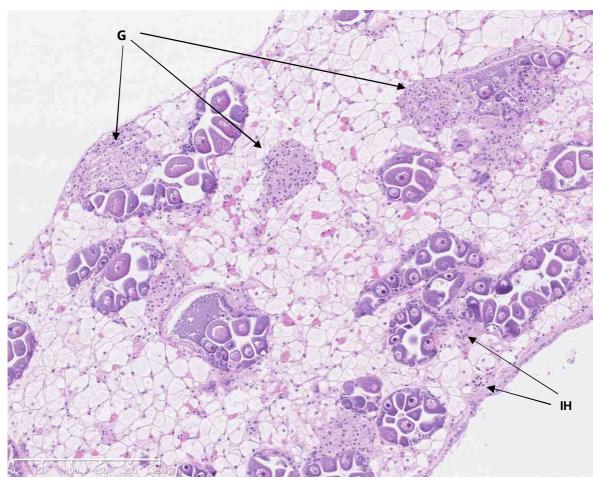


Figure 23: Profil histologique d'une moule LCQ-t montrant (**IH**) et des granulomes (**G**)

c) Type c : les moules qui atteignent le stade néoplasique terminal (Néo)

Globalement, en fonction des lots, ces moules constituent environ 5-10% des moules analysées et ce pourcentage varie grandement avec un maximum observé pour les lots présentant une mauvaise qualité cytogénétique initiale.

Ces moules correspondent à des animaux qui ont été initialement identifiés en 2017 comme HCQ ou légèrement LCQ et qui lors des différentes analyses réalisées en 2018 présentent des évolutions plus ou moins rapide vers un statut néoplasique (Néo) caractérisé par l'apparition d'une population de noyaux ayant un très haut niveau de ploïdie allant de 12-16n. Cet état néoplasique terminal est toujours suivi par la mort de l'animal quelle que soit la période de l'année.

Un exemple de ce type de moules, qui illustre cette évolution d'un statut HCQ vers un statut néoplasique en passant par une étape intermédiaire LCQ, est présenté *Figure 24*. Il montre l'évolution du profil cytométrique de la moule Brev14 (individu 14 du lot « Bréville »). Initialement HCQ en octobre 2017, cette moule Brev14 devient LCQ au mois de mai 2018 et, dès le début du mois de juillet 2018 elle montre l'apparition d'une population encore très minoritaire de noyaux à très haut niveau de ploïdie. Après l'analyse réalisée fin juillet 2018 sur la moule Brev14, cette population de noyaux à très haut niveau de ploïdie s'enrichit encore plus pour au final devenir très significative fin août 2018 avec une population très nette de noyaux autour de 16n. La dernière analyse a été suivie par la mort de cette moule.



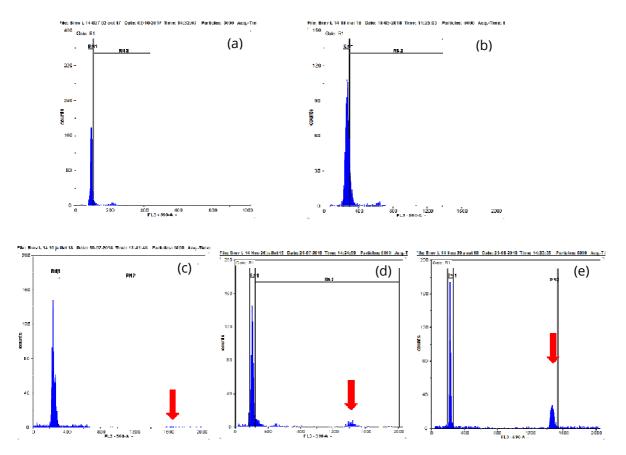


Figure 24 : Profils cytométriques **Néo** (type c) obtenus pour la moule Brev14 lors des différentes dates d'analyses (a : octobre 2017, b : mai 2018, c : juillet 2018, d : juillet 2018, e : août 2018). La flèche rouge indique la population de noyaux néoplasiques

Les moules du type **Néo** qui ont été fixées juste après leur mort montrent toutes les mêmes lésions caractéristique des moules classiquement identifiées par la littérature comme atteintes par la néoplasie disséminée (Carballal *et al.*, 2015 ; Carella *et al.*, 2017). Ainsi, en fonction du stade de la maladie, les tissus normaux de ces moules sont progressivement envahis par des cellules néoplasiques ayant des noyaux pléomorphes de très grande taille et un rapport nucléo-cytoplasmique très réduit (*Figure 25*).

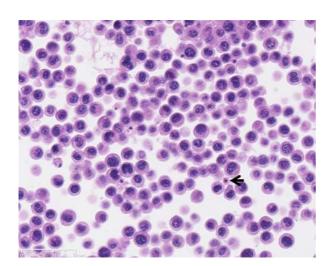


Figure 25 : Préparation histologique issue d'une moule néoplasique (**Néo**) montrant le remplacement pratiquement total des hémocytes normaux (flèche noire) par des cellules néoplasiques de très grande taille ayant un rapport nucléocytoplasmique réduit et des noyaux pléomorphes et hypertrophiés



De façon très éclairante, la mise en parallèle du dernier profil cytométrique, obtenu juste avant la mort, et du, obtenu juste après la mort, nous a permis de montrer que, **chez les moules de type Néo, la sévérité des lésions observées sur une moule donnée (stade de la maladie) est étroitement liée à son profil cytométrique correspondant.** Ainsi, les moules qui présentent une faible infiltration par les cellules néoplasiques présentent aussi sur leurs cytogrammes une population minoritaire de noyaux à très hauts niveaux de ploïdie. Inversement, les moules très lourdement infiltrées par les cellules néoplasiques montrent aussi sur leur cytogrammes une population majoritaire de noyaux à très hauts niveaux de ploïdie.

L'observation histologique des moules présentant un profil cytométrique intermédiaire où les différentes populations de noyaux (2n, 12-16n et intermédiaires) sont significativement représentées nous a permis de mettre en évidence, chez la même moule, la **présence simultanée des deux types d'infiltrations** décrites dans ce suivi (*Figure 26*) :

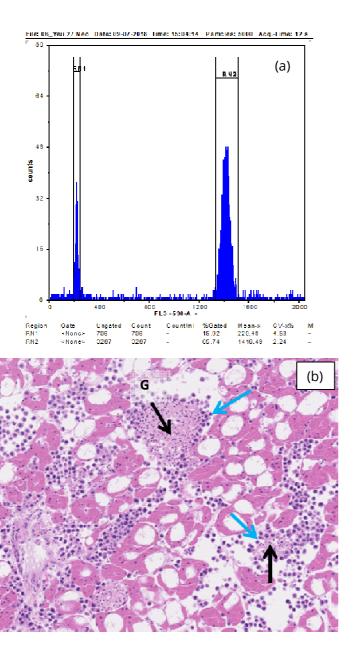


Figure 26 : (a) profil cytométrique de moules avec les différents types cellulaires, aneu-polyploïdes caractéristiques du statut LCQ et polyploïdes de très haut niveau de ploïdie caractéristiques du statut **Néo** (ex. RN2, noyaux entre 12-16n). (b) Préparation histologique d'une moule au profil cytométrique intermédiaire présentant à la fois : des granulomes (flèches noires), des hémocytes néoplasiques à noyaux pléomorphes (flèches bleues)



- la première infiltration est identique à celles trouvées chez les moules **LCQ-p** et **LCQ-t** qualifiées d'«infiltrations hémocytaires/granulomes ». En histologie, ces lésions habituellement identifiées comme une réponse non spécifique des granulomes sont constituées de cellules normales. Toutefois, en cytométrie en flux, ces mêmes « infiltrations et granulomes » paraissent correspondre à un mélange, variable en proportion, de noyaux normaux (diploïdes) et aneupolyploïdes de bas niveaux de ploïdie (moins de 5-6 n),
- la infiltration correspond à une **néoplasie hémocytaire** avec, en histologie, une prolifération plus ou moins intense de grandes cellules indifférenciées ayant des noyaux pléomorphes. A cette prolifération correspond en cytométrie une population de noyaux à très haut niveau de ploïdie (12-16n, et au-delà) plus ou moins représentée en fonction du stade de la maladie.

La présence concomitante de ces deux types de lésions dont celles associées à de la prolifération chez les mêmes moules permet l'observation fréquente d'une organisation très intéressante où une couche de cellules néoplasiques entoure souvent les granulomes (*Figure 26, G*). Ceci indiquerait une relation directe entre les cellules aneu-polyploïdes caractérisant les moules LCQ et les cellules néoplasiques caractéristiques des moules Néo. Ce lien direct se ferait par une évolution centrifuge partant du centre du granulome qui serait formé par des cellules initialement normales (diploïdes) qui, une fois devenues aneuploïdes (hypohyperdiploïdes), évoluent par accumulation du génome de base *via* des mitoses anormales telles que décrites précédemment chez les moules LCQ (Benabdelmouna *et al.* 2018) et deviennent aneu-polyploïdes de bas niveaux de ploïdie (ex. >2n et < 6n). Par la suite, continuant les cycles des mitoses anormales, ces cellules aneu-polyploïdes de bas niveaux de ploïdie subissent au même temps une amplification graduelle de leur génome pour aboutir au final à la couche externe de cellules néoplasiques dont le niveau de ploïdie est extrême (12-16n, et au-delà).

Ainsi, une fois déclenché, vraisemblablement par une mutation chromosomique induisant une aneuploïdie originelle, nous formulons l'hypothèse que le processus néoplasique apparait comme une évolution progressive vers des niveaux de ploïdie de plus en plus grands et au fur et à mesure des mitoses anormales qui se déclenchent de façon anarchique. Ce processus cytogénétique est accompagné par des changements cyto-histologiques avec la disparition graduelle des hémocytes normaux et leur remplacement par des cellules indifférenciées, proliférantes, de grandes taille et ayant un ou des noyaux pléomorphes et hypertrophiés. Selon ce schéma, la néoplasie telle que décrite par la bibliographie devrait être considérée comme étant le stade terminal (statut Néo) d'un processus néoplasique progressif qui démarre dès que les noyaux normaux (statut HCQ) commencent à perdre leur état diploïde normal (statut LCQ).

Dans le milieu naturel, nous formulons l'hypothèse que ce processus néoplasique est le plus souvent stoppé par la mort des moules ayant un statut LCQ avancé, lesquelles sont particulièrement affaiblies et « sensibles à la mortalité » durant les périodes à risque (stress physiologique et environnemental début printemps et automne, cf. § 2.3, § 3.3). Le processus néoplasique proprement dit, n'arrive donc que relativement peu fréquemment à son terme (néoplasie disséminée), probablement chez des moules LCQ présentes dans des « sites préservés des épisodes de mortalité » (sites pouvant présenter des conditions particulières toujours à l'étude) ou chez des moules affectées par un processus néoplasique à progression très accélérée.

Enfin, d'un point de vue méthodologique nous montrons dans cette étude que l'évolution des profils cytométriques est bien en concordance avec l'évolution des profils histologiques. Cependant, il apparait nettement que la cytométrie permet de détecter de façon plus précoce et plus sure le démarrage précoce du processus néoplasique (statut LCQ débutant) qui à ce stade n'est identifié que comme une simple réaction inflammatoire non spécifique par l'histologie. Les données des rapports MORBLEU précédents, 2016, 2017, vont dans le même sens, les données cytométriques des hémocytes peuvent permettre de détecter des anomalies cytogénétiques très en amont du processus qui pourra être parfois caractérisé de manière complémentaire par des données d'hémocytologie (2017) ou par des données de génotypage (cf. présent rapport 2018, § «3.1.1). Combiné à son coût réduit et à sa rapidité d'analyse, ces éléments factuels plaident pour l'utilisation systématique de cette approche de cytométrie pour la détection précoce des anomalies cytogénétiques et des processus néoplasiques, ouvrant potentiellement la voie à une gestion raisonnée des sites et des cheptels.



En résumé

- -Dans le cadre général des épisodes de mortalité récurrents affectant les cheptels mytilicoles depuis 2014, des travaux menés sur des moules triées au préalable au cours du projet MORBLEU ont pu démontrer grâce à des analyses de ploïdie par cytométrie en flux que la « qualité cytogénétique » des moules déterminée par la quantification des anomalies cytogénétiques affectant leurs hémocytes, était significativement corrélée avec les performances de survie de ces mêmes moules. Par la suite, des travaux complémentaires combinant la cytométrie en flux et l'hémocytologie ont permis de montrer que des anomalies cytogénétiques détectées par cytométrie en flux peuvent être associées à un processus néoplasique affectant des cellules circulantes de l'hémolymphe des moules malades.
- -En 2018, une étude méthodologique a été réalisée en combinant deux approches, la cytométrie en flux méthode non létale permettant un suivi individuel de chaque moule et l'histologie, afin de déterminer :
- i) si le statut cytogénétique d'un animal donné évoluait ou pas dans le temps?
- ii) si l'évolution du profil cytométrique d'un animal donné se traduit par des effets sur la structure histocytologique des tissus de cet animal ?
- -A partir de moules issues des principaux sites mytilicoles le long de la façade maritime atlantique-Manche, un total de 12 lots différents de moules ont été échantillonnés. 600 moules ont été triées et chacune de ces moules a été marquée par une étiquette pour permettre un suivi individuel. Les résultats acquis au cours de ce travail préliminaire ont permis d'établir quatre catégories de moules selon l'évolution de leur statut cytogénétique au cours d'un suivi sur une année :
- -des moules testées et identifiées comme ayant un statut cytogénétique initial normal (HCQ) et qui sont restées «saines » au cours du suivi, sans présenter de mortalité ni d'hémocytes anormaux par histologie ;
- -des moules dont le statut cytogénétique devient anormal (LCQ), avec deux sous-types :
- des moules qualifiées LCQ-p qui évoluent précocement vers le statut anormal et qui meurent massivement entre février et mars ;
- des moules qualifiées LCQ-t qui évoluent tardivement vers le statut anormal et qui sont faiblement affectées par la « mortalité printanière », mais qui présentent une mortalité chronique et tardive (été). A la mort, ces deux types de moules présentent des lésions tissulaires (infiltrations hémocytaires et granulomes) dont l'intensité semble liée à la complexité du profil cytogénétique.
- -enfin, des moules qualifiées Néo qui évoluent plus ou moins rapidement vers un statut LCQ, puis vers un statut néoplasique avec des niveaux de ploïdie très élevés (12-16n). Cet état néoplasique terminal est toujours suivi par la mort de l'animal quelle que soit la période de l'année. Chez ces animaux, l'histologie révèle des lésions tissulaires classiques de la néoplasie hémocytaire.

Cette étude méthodologique montre grâce à des suivis individuels de moules que l'évolution des profils cytométriques peut être en concordance avec l'évolution des profils histologiques.



3.3. Etude par histopathologie de lots de moules sentinelles utilisés en 2016 : état physiologique, gamétogenèse et lésions tissulaires

(Auteurs principaux : Pépin J.F., Robert S.)

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

En 2015, les données du réseau Mytilobs (Robert et Soletchnik, 2016) ont montré que les pics de mortalité dans les Pertuis Charentais survenaient durant la période de gamétogénèse et vitellogenèse avancée (stade 3A et 3B – d'après Lubet, 1959, cf. Annexe 2, *Tableau 14*), période pendant laquelle la moule transforme ses réserves de glycogène en lipide de constitution des gamètes. Cette observation avait été particulièrement notée dans le Pertuis Breton au site des Filières (Filière W) (*Figure 27a*).

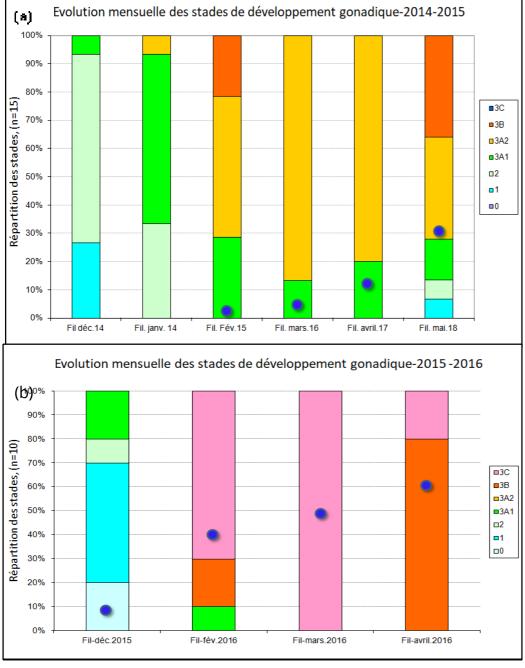


Figure 27 : Evolution mensuelle des stades de développement gonadique des moules du lot sentinelle Mytilobs au site des Filières dans le Pertuis Breton. Le premier pic de mortalité apparait aux stades 3A, 3B précurseurs des pontes. (a) Campagne 2014-2015 à mortalité modérée, (b) Campagne 2015-2016 à forte mortalité. Les spots bleus indiquent le niveau des mortalités cumulées du lot.



Les mortalités printanières observées sur le site des filières marquent un arrêt entre mai et juin qui est concomitant avec la fin des pontes et une température qui s'élève au-delà de 16°C.

Ces résultats ont déjà été présentés dans le rapport MORBLEU bilan 2016. Ils avaient été établis grâce aux prélèvements mensuels sur le lot sentinelle Mytilobs d'animaux vivants fixés pour analyse histologique. L'analyse pour la détermination des stades de maturation et la recherche de lésions tissulaires avait été confiée à un laboratoire agréé pour l'histo-cytopathologie des maladies des mollusques marins. Dans cette étude, 28 lots avaient été échantillonnés et analysés entre février et juillet 2015, à partir de six sites ateliers du Mytilobs. Les analyses histopathologiques avaient permis d'observer des granulomes dans les tissus en proportion supérieure pour le site des filières dans le Pertuis Breton (Tableau 10) par rapport aux données de sites du Pertuis d'Antioche (données non présentées ici). Par ailleurs, pour les sites du littoral atlantique, ces auteurs avaient observé une « saisonnalité » apparente de la fréquence de détection des granulomes : 3% en février-mars, 17 % en avril-mai, 43% en mai-juin et 21% en juin-juillet.

En 2018, nous avons souhaité poursuivre cette étude du lien possible entre la fragilisation des moules en période de ponte, l'occurrence de granulomes détectés en histologie et l'apparition d'épisodes de mortalité. Un travail d'analyse histologique a été mené à nouveau en ayant recours au même laboratoire agréé, à partir des lots de moules archivés par le Mytilobs. A ce stade et compte tenu du coût de ce type d'analyses, seuls dix lots provenant de quatre sites ont pu être analysés sur la collection 2016 constituée de 80 lots (neuf sites ateliers x 9 mois, octobre-15 – juin 2016). Les lots retenus correspondent à des animaux prélevés avant et pendant la période des mortalités (10 lots x 10 individus) –années 2015-2016. Lors de cette campagne 2016, des mortalités de niveaux exceptionnels ont été observées dans les Pertuis Charentais (50 à 80% sur le lot sentinelle).

Tableau 10 : Données des campagnes 2015 et 2016 du Mytilobs pour la recherche de granulomes avant et pendant la période de ponte des moules au site Filière.

Suivi 2015	Déc.14	Janv. 15	Fév. 15	Mar. 15	Avr. 15	Mai. 15
Granulomes	0/15	0/15	0/15	0/15	3/15	6/15
Larves (CREAA)	•	•	0	+	+++	++
Mortalité cum.	0	0	2%	4%	12%	30%
Suivi 2016	Déc.15	Janv. 16	Fév. 16	Mar. 16	Avr. 16	ND
Granulomes	0/10	ND	4/10	3/10	2/10	ND
Larves (CREAA)	•	-	+	++	+++	ND
Mortalité cum.	7%	30%	40%	48%	60%	-

Granulomes: nombre d'individu détectés positifs sur nombre analysés;

Résultats

Sur l'ensemble des 100 individus testés à ce jour sur l'échantillonnage 2016, ces résultats partiels montrent en moyenne que 16% des moules présentent des granulomes pour les sites : Pont Mahé, Maison Blanche, Filière et Boyard et pour les mois concernés : février, mars et avril, mois qui correspondent à la période de reproduction.

Les échantillons qui proviennent de sites à niveau de mortalité faible à modéré (Pont Mahé -7%, Boyard 25%) n'ont pas permis d'observer de granulomes sur cette période (4x10 individus testés). De même, on constate que les animaux prélevés sur le site Filière avant le pic de mortalité dans le Pertuis Breton ne présentent pas de granulome (Tableau 10, décembre 2015). Cette même observation est faite pour la campagne 2015 en décembre 2014, janvier, février, mars 2015. Par contre, au site Filière en 2016, comme

[&]quot; -" ou ND, pas de données ; abondance larves : +>100 id/15m3 , ++ >1000 id , +++ > 10000 id



en 2015, à partir du pic de mortalité, des granulomes sont détectés et leur fréquence tend à augmenter sur les trois mois qui suivent.

A nouveau en 2016 comme en 2015, on observe que le pic initial de mortalité est concomitant des stades de gamétogénèse et de vitellogenèse avancées 3A et 3B (*Figure 27 (b) et (a*)) et de la période des pontes, confirmée par le suivi des larves réalisé par le CREAA (CREAA, 2015, 2016) dès le mois de février (Tableau10).

Les indications apportées par ces deux études partielles sur les campagnes d'échantillonnages 2015 et 2016 justifieraient d'être complétées par des travaux approfondis (autres sites, autres périodes) sur les collections disponibles pour caractériser le lien entre les phases de maturation-reproduction, détection de granulomes et l'apparition des mortalités de moules.

En résumé

- -En 2015, des données du réseau Mytilobs (Robert et Soletchnik, 2016) ont montré que les premiers pics de mortalité de moules dans les Pertuis Charentais survenaient durant la période de gamétogénèse et vitellogenèse.
- -En 2018, nous avons souhaité poursuivre l'étude du lien éventuel entre le début des mortalités et les premières pontes de larves à partir des moules prélevées en 2015-2016 afin de caractériser la possible fragilisation des moules en période de ponte, l'occurrence de granulomes détectés en histologie (marqueur non spécifique de lésions inflammatoires) et l'apparition éventuelle d'épisodes de mortalité.
- -D'un point de vue descriptif, nos résultats sur les moules de 2016 présentent la même tendance que celle observée sur les moules en 2015 : pour ces années-là, les données suggèrent que sur le secteur des filières du Pertuis Breton la période de ponte a pu agir comme un facteur qui a favorisé l'occurrence des épisodes de mortalité au travers d'une fragilisation des animaux durant cette période physiologique critique. Cependant, d'autres facteurs ou causes participent aux déclenchements de ces épisodes de mortalités depuis 2014.



4. Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules face aux épisodes de mortalité

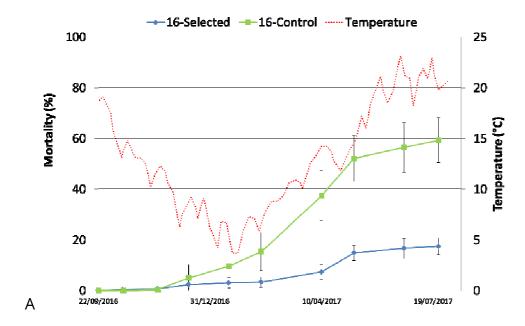
(Auteur principal : L. Dégremont)

4.1. Seconde génération de sélection massale

Sur la base de résultats obtenus en 2015 et 2016, des productions de lots de moules contrastés en termes de survie ont été réalisées dans les installations expérimentales du LGPMM (*cf. Annexe 3*).

En 2017, la première génération de sélection massale a été testée dans deux sites des Pays de Loire (**Le Fiol** et **La Plaine-sur-Mer**). Pour chaque site, testage avec : un lot désigné sous le terme « <u>sélectionné</u> », lot de moules produit à partir de géniteurs collectés dans une zone ayant subi des épisodes de mortalité massive (les animaux survivants pouvant être <u>désignés</u> comme des individus ayant subi une pression de sélection naturelle forte et ayant des capacités de résistance accrues vis-à-vis des épisodes de mortalité massive) et un lot dit « <u>témoin</u> » produit à partir de géniteurs prélevés dans une zone peu impactée (ces animaux pouvant être considérés comme n'ayant pas subi une pression de sélection naturelle forte et n'ayant pas de ce fait des capacités de résistance particulièrement accrues vis- à-vis des épisodes de mortalité massive).

Dans les deux sites, le lot «sélectionné» a présenté une réduction significative de la mortalité (17% et 25%) par rapport au lot témoin (61% et 74%) (*Figure 28*).





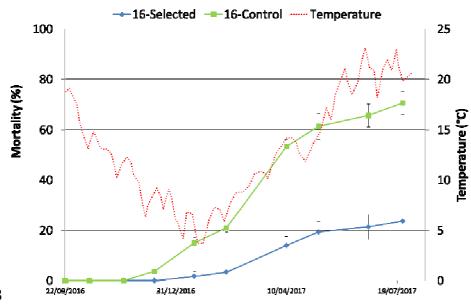


Figure 28 : Evolution des mortalités (% ± écart-type entre les réplicas) du lot témoin (Control) et du lot «sélectionné» (Selected) en première génération de sélection massale, et température de l'eau de mer (°C) sur les sites Le Fiol (panel A) et La Plaine-sur-Mer de septembre 2016 à Juillet 2017

Sélection massale : la sélection massale consiste à choisir et à prélever dans le milieu naturel où s'exerce la **sélection naturelle**, les individus d'une espèce donnée (animaux ou plantes) qui présentent ou expriment le plus un caractère d'intérêt, puis à les utiliser pour produire la génération suivante, et ainsi de suite...

Dans le contexte du projet MORBLEU, la sélection massale consiste à utiliser comme géniteurs des moules survivantes collectées dans une zone ayant subi des épisodes de mortalité massive afin d'obtenir par reproduction une nouvelle génération. Les animaux survivants sont considérés ici comme des individus ayant subi une pression de sélection naturelle et qualifiés comme ayant des capacités de résistance accrues vis-à-vis des épisodes de mortalité rencontrés sur nos côtes.

Suite à ces résultats encourageants, les moules survivantes à la fin de ces suivis ont été reproduites dans les installations expérimentales de la station Ifremer de La Tremblade en janvier 2018, produisant ainsi deux nouveaux lots «sélectionnés». Le premier issu du lot témoin correspond à la première génération de sélection massale, et le second, issu du lot «sélectionné», correspond à la seconde génération de sélection massale. Afin d'évaluer le gain de survie de ces deux lots, deux lots témoins ont également été produits en utilisant des moules n'ayant jamais connu d'épisode de mortalités.

Ces lots auraient dû être testés dans des sites mytilicoles à partir de l'automne 2018 afin de les confronter à d'éventuels épisodes de mortalités. Cependant, suite au contexte tendu entre une partie de la profession et l'Ifremer, l'Ifremer a préféré ne pas mettre ces lots sur estran et a décidé de ne pas tester ces lots. Les quatre lots d'intérêt sont actuellement stockés à la station Ifremer de Bouin dans l'attente d'une décision qui permettrait de les tester.

4.2. Suivi de la survie et croissance de 100 familles dans cinq sites

En 2017-2018, l'expérimentation menée a été imaginée avec une approche plus globale pour comparer et comprendre la variabilité de réponse de moules de plusieurs gisements naturels, ce qui a été nommé comme la « capacité d'adaptation » de ces animaux. Ainsi, 100 familles de moules ont été produites en janvier/février 2017 par croisement entre des parents issus de gisements de moules de plusieurs origines françaises et des deux espèces présentes en France (*Mytilus edulis et M. galloprovincialis*).



4.2.1. Populations étudiées et familles produites

Six populations de moules ont été utilisées (Figure 29) :

- Wimereux, nommée ensuite WIM_001 : captage local en zone intertidale (principalement zone type *M. edulis*),
- Moguéric, nommée ensuite MOG_001 : captage local (principalement zone type *M. galloprovincialis*)
- Ile d'Yeu pop_1, nommée ensuite YEU_001: moules captées dans les Pertuis Bretons et élevées en filière (principalement zone type *M. edulis*),
- Ile d'Yeu pop_2, nommée ensuite YEU_002: captage naturel local (principalement zone type *M. galloprovincialis*),
- Ile d'Oléron, nommée ensuite OLE_PON : captage local sur une bouée de l'île d'Aix (principalement zone type *M. edulis*),
- Biarritz, nommée ensuite BIA_001 : captage local sur la digue de Marbella (principalement zone type *M. galloprovincialis*),

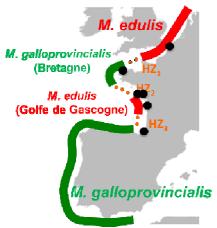


Figure 29 : Localisation des populations de moules échantillonnées pour la production des 100 familles (du nord au sud : Wim_001, Mog_001, Yeu_001 & Yeu_002, Ole_Pon, Bia_001), carte d'après Bierne et al.

Les croisements ont été réalisés en intra-population afin d'identifier le potentiel adaptatif de chaque population/espèce. Tous les parents utilisés ont été génotypés afin de déterminer l'espèce (et le niveau d'introgression) à laquelle ils appartiennent (Tableau 11).

Tableau 11 : Nombres de familles produites par espèce et population

Espèce	Populations	Nombre de familles produites
		par population
Mytilus edulis	Wim_001, Yeu_001, Ole_Pon	18, 22, 8
Mytilus galloprovincialis	Mog_001, Bia_001	12, 20
Hybride <i>M. edulis/ galloprovincialis</i>	Yeu_002	20

4.2.2. Testage des familles

Les familles ont été déployées sur des sites d'élevage en Charente-Maritime (un site), Vendée (un site), Loire Atlantique (un site) et Normandie (un site) en octobre 2017 (*Figure 30, Annexe 1, Figures 37-38*). En étudiant les réponses de ces moules lors d'un éventuel épisode de mortalité survenant en 2018 (la mortalité étant difficilement prédictible), il s'agit de comparer la sensibilité des deux espèces de moules et la variabilité de réponse d'animaux issus de différents gisements dans différents environnements.





Figure 30 : Localisation des quatre sites de testages des 100 familles de moules * (du nord au sud : Baie des Veys, La Plainesur-Mer, Maison Blanche et La Floride) carte d'après Bierne et al.

Toutes les familles ont été testées séparément dans les sites de La Floride (Charente-Maritime), Maison Blanche (Vendée) et en Baie des Veys (Normandie). Pour les sites de La Floride et la Baie des Veys, les mortalités ont été suivies à partir de 4 réplicats de 50 moules par famille. Trois comptages des mortalités ont été programmés en février, avril et juin 2018, en enlevant des sites de testage un réplicat en février, un réplicat en avril et les deux derniers réplicats en juin. A chaque comptage, les moules mortes et vivantes devaient être comptées, puis une partie des moules vivantes ont été analysées pour la croissance. Pour le site de Maison-Blanche, 5 réplicats de 20 moules chacun ont été testés par famille. Les comptages de mortalités ont été réalisés en enlevant du site un réplicat par famille en février, un autre en avril et les trois derniers en juin 2018. Pour le site localisé en Loire Atlantique, La Plaine-sur-Mer, 50 moules de chaque famille ont été mélangées afin de former un lot de 5000 moules. Un suivi mensuel des mortalités a été effectué par le SMIDAP à partir de 3 réplicats de 200 moules, puis toutes les moules survivantes ont été expédiées à la station Ifremer de La Tremblade pour assignation de parenté.

Tableau 12 : Protocole du testage des 100 familles de moules

Sites	Testage des	Nombre de	Nombre	Date de comptage	Nombre de	Nombre
	familles	réplicats	de moules	en 2018	réplicats par	totales de
		par famille	par		famille et date	moules
			réplicat		de comptage	suivies
Baie des Veys	Séparée	4	50	Février/avril/juin	1/1/2	20 000
Maison	Séparée	5	20	Février/avril/juin	1/1/3	10 000
Blanche						
La Plaine-sur-	Mélangée	1	50	Tous les mois	200 x 3*	5 000
Mer						
La Floride	Séparée	4	50	Février/avril/juin	1/1/2	20 000

^{*}Toutes les familles sont mélangées. Les comptages sont réalisés sur les trois mêmes réplicats.

Le suivi en Baie des Veys n'a pu être effectué suite à la destruction des lots en décembre 2017 face à des pressions exercées par certains professionnels de Normandie.

Pour le suivi réalisé à **La Plaine-sur-Mer** par le SMIDAP, les mortalités ont débuté le mois suivant la mise sur site, atteignant même 15% dès décembre 2017 (*Figure 31*). La mortalité moyenne augmente régulièrement atteignant 24% en février, puis 39% en avril, 53% en mai et 63% en juin. A la fin du suivi en juillet 2018, la mortalité cumulée atteint 66%. **Le colis contenant les moules à analyser a été perdu par le transporteur, et donc, il n'est pas possible de connaître les taux de mortalités par famille et par population pour ce suivi.**



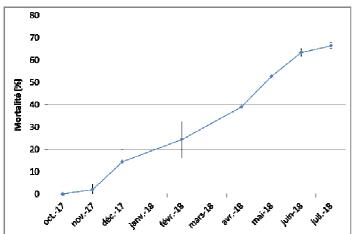


Figure 31 : Evolution des mortalités (moyenne et intervalle de confiance à 95%) du lot de moules constitués d'un mélange de 50 moules par famille sur le site de La Plaine-sur-Mer d'octobre 2017 à juillet 2018. Suivi réalisé par le SMIDAP

Pour le site de **Maison Blanche**, la mortalité moyenne était de 11% en février 2018, 38% en avril et 60% à la fin du suivi en juin 2018. Le taux de mortalité finale à la Maison Blanche est similaire à celui observé dans le site de **La Plaine-sur-Mer**.

Au point final, les mortalités étaient significativement différentes entre les populations variant de 43% pour la population Bia_001 à 74% pour la population Wim_001 (F=13,66; P<0,0001)(Figure 32a). Des différences significatives de survie ont également été observées entre les espèces au point final avec les mortalités les plus élevées pour *M. edulis* (70%), intermédiaire pour les moules hybrides (64%) et les plus faibles pour *M. galloprovincialis* (43%) (F=31,14; P<0,0001)(Figure 32b). Cependant, le facteur population n'est plus significatif en intra-spécifique (F=1,04; P=0.38), c'est-à-dire que les trois populations de *M. edulis* présentent des mortalités non significativement différentes (67%, 73% et 74%), de même que les deux populations de *M. galloprovincialis* (43% et 44%).

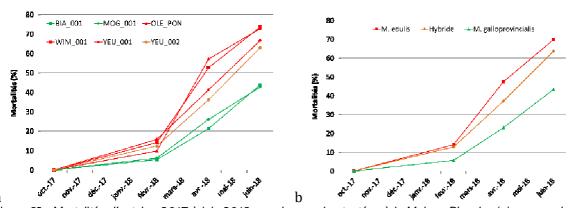


Figure 32 : Mortalités d'octobre 2017 à juin 2018 pour les moules testées à la Maison Blanche (a) par population (b) par espèce



Dans le site présentant des mortalités anormales chez les moules bleues :

- > Les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités significatives (de 43 à 70%),
- M. edulis (70%) présente des mortalités plus importantes que M. galloprovincialis (43%),
- Absence de différences de mortalités entre les populations pour M. edulis (67% à 74%) Absence de différences de mortalités entre les populations pour M. galloprovincialis (43% à 44%),

Pour le site de **La Floride**, la mortalité moyenne était de 3% en février 2018, 13% en avril et 20% à la fin du suivi en juin 2018. Au point final, les mortalités étaient significativement différentes entre les populations variant de 10% pour la population Wim_001 à 31% pour la population Mog_001 (F=20,71; P<0,0001)(*Figure 33a*). Des différences significatives de survie ont également été observées entre les espèces au point final avec les mortalités les plus élevées pour *M. galloprovincialis* (30%), intermédiaire pour les moules hybrides (23%) et les plus faibles pour *M. edulis* (11%) (F=53,75; P<0,0001)(*Figure 32b*). De nouveau, les trois populations de *M. edulis* ont présenté des mortalités non significativement différentes (10%, 12% et 13%) ainsi que les deux populations de *M. galloprovincialis* (29% et 31%) (F=0,32; P=0,80).

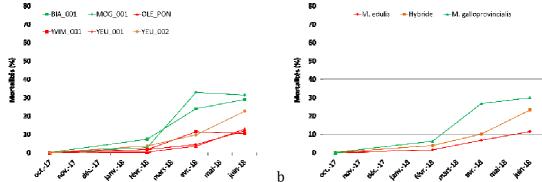


Figure 33 : Mortalités d'octobre 2017 à juin 2018 pour les moules testées à La Floride (a) par population (b) par espèce

Dans le site ne présentant pas des mortalités anormales chez les moules bleues :

- Les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités faibles (de 10 à 30%),
- Mais l'espèce M. galloprovincialis (30%) présente des mortalités plus importantes que M. edulis (10%)

Les testages des 100 familles de moules à la **Maison Blanche** et à **La Floride** ont permis de mettre en évidence des interactions sites x espèces (F=351,09; P<0,0001) (*Figure 34*), c'est-à-dire que le classement des espèces diffère entre les sites. Cette interaction suppose alors des causes de mortalités différentes entre les sites. Ce résultat est en accord avec le testage des lots de *M. edulis* de la première génération de sélection massale en 2016 et 2017. Ces lots avaient été testés dans plusieurs sites en Pays de Loire et Charente-Maritime, et des interactions significatives avaient été observées uniquement entre les sites à faibles mortalités (<10%) et ceux à fortes mortalités. Dès lors que deux sites présentaient de fortes mortalités, l'interaction site x lot n'était plus significative.



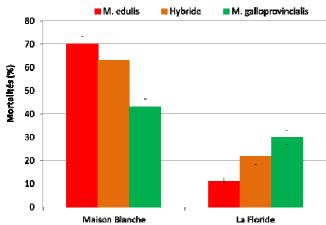


Figure 34 : Mortalités moyennes (intervalle de confiance à 95%) au point final en juin 2018 par espèce et par site

Lors d'épisodes de mortalités anormales, *M. edulis* est donc très sensible, et cette espèce pourrait être remplacée par *M. galloprovincialis* dans les élevages mytilicoles. Cependant, en l'absence de mortalités anormales, *M. galloprovincialis* semble moins adaptée aux conditions environnementales du littoral Charentais par rapport à *M. edulis*. Ce résultat pourrait en partie expliquer la répartition géographique de ces deux espèces, avec un ilot de *M. edulis* sur le littoral Charentais, encerclé par des *M. galloprovincialis* au nord et au sud (*Figure 29*).

4.2.3. Suivi du statut cytogénétique

Pour le suivi effectué à la **Maison Blanche**, les moules prélevées en avril 2018 ont été transférées puis conservées à l'écloserie du LGPMM afin de déterminer leur statut cytogénétique. Les données seront présentées ultérieurement.

4.2.4. Paramètres génétiques de la survie des moules lors d'épisodes de mortalités

Les paramètres génétiques de la résistance aux phénomènes des mortalités anormales des moules bleues en intra- et inter- populations/espèce seront calculées ultérieurement. Cependant, les données descriptives par espèce et populations sont indiquées en Tableau 13. Ainsi, les mortalités intra-spécifiques varient de 30% à 95% pour *M. edulis*, de 22% à 88% pour les hybrides et de 20% à 67% pour *M. galloprovincialis* pour le site de la **Maison Blanche**. A La **Floride**, les mortalités intra-spécifiques varient de 1% à 26% pour *M. edulis*, de 9% à 35% pour les hybrides et de 15% à 53% pour *M. galloprovincialis*. Pour chaque espèce, ce résultat suggère des différences de résistance entre les familles aux mortalités observées dans chaque site.

Concernant la croissance (poids total, poids coquille, poids chair humide, poids chair sec, longueur, largeur et épaisseur de la coquille), les données sont en cours d'acquisitions, et l'ensemble des données pourraient être disponible à partir de 2020.



Tableau 13 : Statistiques descriptives des mortalités observées (%) au point final en juin 2018 à Maison Blanche et à La Floride

						Erreur			Coefficient
Site	Espèce	Population	NObs	Moyenne	Ecart-type	standard	Min	Max	de variation
Maison									
Blanche	M. edulis	OLE_PON	8	73	13	5	57	92	18
	M. edulis	WIM_001	18	74	15	4	45	92	20
	M. edulis	YEU_001	22	67	16	4	30	95	25
	Hybride	YEU_002	20	63	15	3	22	88	23
	M. galloprovincialis	BIA_001	20	44	12	3	20	67	28
	M. galloprovincialis	MOG_001	12	43	13	4	25	65	32
La Floride	M. edulis	OLE_PON	8	11	8	3	1	22	72
	M. edulis	WIM_001	18	10	6	1	2	22	59
	M. edulis	YEU_001	22	11	6	1	3	26	49
	Hybride	YEU_002	20	22	9	2	9	35	42
	M. galloprovincialis	BIA_001	20	29	11	2	15	53	37
	M. galloprovincialis	MOG_001	12	31	8	2	17	42	25

4.2.5. Etude de la sensibilité des familles de moules à une infection bactérienne expérimentale

Les performances de survie des familles dans le site de **Maison Blanche** ont été comparées à celles obtenues en infection expérimentale contrôlée en laboratoire afin d'infirmer ou confirmer le rôle d'organismes pathogènes identifiés comme potentiellement responsables des mortalités *in situ*. Une souche virulente de *Vibrio splendidus* (14/053 2T1) isolée lors des épisodes de mortalités en 2014 a ainsi été testée. Chaque famille était représentée par 3 réplicats de 10 moules, et chaque moule a été injectée par la suspension bactérienne, représentant un total de 3000 moules injectées. Les mortalités ont été enregistrées 24h, 30h, 48h, 54h et 72h post-injection.

Les mortalités à 72h post-injection étaient de 52% pour M. edulis, 30% pour les hybrides et 23% pour les M. galloprovincialis. L'analyse de la corrélation entre les mortalités observées à 72h post injection et les mortalités observées à la **Maison Blanche** en juin 2018 pour les 100 familles indique une corrélation positive (r=0,43) et significative (P<0,0001) (*Figure 35*).

Cependant, lorsque ces données sont analysées en intra-spécifiques, les coefficients de corrélations sont non significatifs avec 0.22 (P = 0.12) pour M. edulis, 0.07 pour les hybrides (P = 0.77) et 0.05 (P = 0.77) pour M. galloprovincialis (Figure 9 a, b, c, respectivement).

A titre d'exemple, des familles *M. edulis* ont présenté des mortalités faibles en infection expérimentale (20%), mais élevée sur le site de la **Maison Blanche** (>90%), alors que d'autres ont présenté des mortalités élevées en infection expérimentale (80%), mais plus faible sur le site de la **Maison Blanche** (50%).



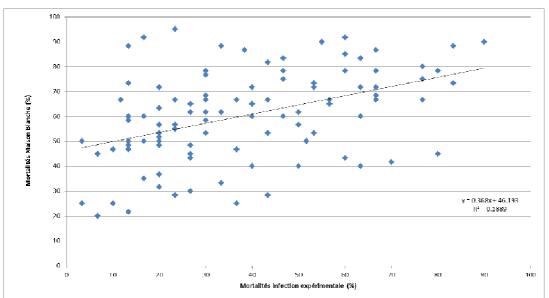


Figure 35 : Comparaison entre les mortalités observées en infection expérimentale pour des moules injectées avec une souche virulente de Vibrio splendidus (14/053 2T1) et les mortalités observées à la Maison Blanche en juin 2018

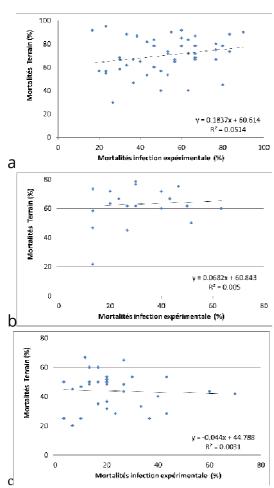


Figure 36 : Comparaison entre les mortalités observées en infection expérimentale pour des moules injectées avec une souche virulente de Vibrio splendidus (14/053 2T1) et les mortalités observées à la Maison Blanche en juin 2018. a: M. edulis, b : Hybride, c : M. galloprovincialis



Bilan

La souche de *Vibrio splendidus* isolée en 2014 et testée au cours de nos essais d'infection expérimentale n'est probablement pas la cause majeure des mortalités anormales rencontrées dans les sites mytilicoles. Cependant des tests complémentaires seront nécessaires afin de connaître le rôle de cette souche dans le phénomène des mortalités anormales rencontrées chez les moules bleues, spécialement pour *M. edulis*.

Remarques du coordinateur sur le contexte de ces travaux

Les travaux engagés en génétique dans cette action visant à améliorer nos connaissances sur les bases génétiques de la survie de la moule dans le cadre du projet MORBLEU représentent un travail conséquent (dans la durée, sur le terrain) et un lourd investissement des personnes (constitution des familles, biométries, analyses génétiques, suivis sur estran, infections expérimentales,...). Ces approches sont indispensables sur le plan scientifique au moins. Il faut trouver les conditions qui doivent permettre que ces travaux puissent continuer dans de bonnes conditions et faire en sorte de ne pas voir détruire ou « condamner » les lots de moules expérimentaux par manque d'information, manque d'explication. De fait, il faudra trouver des espaces d'échanges et de communication qui permettront de mieux se comprendre entre tous les acteurs. On ne pourra que regretter que les conditions faites à cette action et à « ses animaux » n'aient pas permis d'aller au bout de la problématique. Les résultats et le matériel biologique déjà obtenus sont prometteurs et riches d'informations qu'il ne faudrait pas laisser perdre, faute de décision à temps (perte de gain génétique).

En résumé

Testage de la survie de 100 familles de moules sur estran

En 2017-2018, une expérimentation a été menée dans la continuité des travaux initiés en 2016, pour comparer et comprendre la variabilité de réponse de moules de plusieurs gisements naturels aux épisodes de mortalité. Ainsi, 100 familles de moules ont été produites en janvier/février 2017 par croisement entre des parents issus de populations provenant de gisements de moules de plusieurs origines françaises et des deux espèces présentes en France (*Mytilus edulis et M. galloprovincialis*). Ces familles ont fait l'objet d'un testage sur différents sites réputés pour avoir depuis les épisodes de 2014 des niveaux de mortalité de moules contrastés.

- -Dans le site présentant des mortalités anormales chez les moules bleues :
 - -Les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités significatives (de 43 à 70%),
 - -M. edulis (70%) présente des mortalités plus importantes que M. galloprovincialis (43%),
 - -Absence de différences de mortalités entre les populations pour M. edulis (67% à 74%)
 - -Absence de différences de mortalités entre les populations pour M. galloprovincialis (43% à 44%).
- -Dans le site ne présentant pas des mortalités anormales chez les moules bleues :

Les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités faibles (de 10 à 30%), mais l'espèce *M. galloprovincialis* (30%) présente des mortalités plus importantes que *M. edulis* (10%).

Les paramètres génétiques de la résistance aux phénomènes des mortalités anormales des moules bleues en intra- et inter- populations/espèce ont permis d'obtenir les données descriptives par espèce et populations suivantes :

- -les mortalités intra-spécifiques varient de 30% à 95% pour *M. edulis*, de 22% à 88% pour les hybrides et de 20% à 67% pour *M. galloprovincialis* pour le site de la Maison Blanche (Noirmoutier, 85), site réputé à forts niveaux de mortalités depuis 2015.
- -à La Floride (Ronce les Bains, 17), site réputé à faible niveau de mortalité, les mortalités intra-spécifiques varient de 1% à 26% pour M. edulis, de 9% à 35% pour les hybrides et de 15% à 53% pour M. galloprovincialis.

Pour chaque espèce, ce résultat suggère des différences de résistance entre les familles face aux mortalités observées dans chaque site.



Etude de la sensibilité des familles de moules à une infection bactérienne expérimentale

- -Les performances de survie des familles dans le site de **Maison Blanche** ont été comparées à celles obtenues en infection expérimentale contrôlée en laboratoire afin d'infirmer ou confirmer le rôle d'agents pathogènes identifiés comme potentiellement responsable des mortalités *in situ*. Une souche virulente de *Vibrio splendidus* isolée lors des épisodes de mortalités en 2014 a ainsi été testée.
- -Les données de ces tests infectieux montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux de survie observés sur l'estran à Maison Blanche et ceux obtenus expérimentalement suite aux injections de la bactérie.
- -La souche de *Vibrio splendidus* isolée en 2014 et testée au cours de nos essais d'infection expérimentale n'est probablement pas la cause majeure des mortalités anormales rencontrées dans les sites mytilicoles. Cependant des tests complémentaires seront nécessaires afin de connaître le rôle de cette souche dans le phénomène des mortalités anormales rencontrées chez les moules bleues, spécialement pour *M. edulis*.



5. Conclusions

Depuis sa mise en place en 2015, l'action de recherche MORBLEU a permis de dégager des éléments de connaissance et des pistes relatifs aux facteurs biotiques et abiotiques qui semblent intervenir dans le phénomène de hausse de mortalité des moules depuis 2014. Pour l'année 2018, dans la continuité des travaux initiés en 2017, les trois objectifs principaux étaient de : i) étudier la relation entre l'évolution des équilibres microbiens et l'apparition de mortalité de moules, en lien avec le contexte environnemental associé, ii) évaluer des facteurs favorisants intrinsèques à l'hôte dont, l'étude du lien entre la caractérisation génétique et cytogénétique de moules, la néoplasie disséminée et l'apparition de mortalités, iii) caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épisodes de mortalité.

5.1. Description du phénomène de mortalité et son contexte environnemental

Mortalités des lots suivis

A travers les données de suivi du lot sentinelle de moules du réseau Mytilobs, on peut considérer 2018 comme une année qui présente des niveaux de mortalité modérés à fort, avec des valeurs supérieures à celles observées habituellement avant les épisodes de surmortalité de 2014 et, supérieures à celles constatées en 2015 et 2017.

Dans le suivi 2018, les secteurs de Maison Blanche et de Pont Mahé sont les plus affectés avec 80 et 50% de mortalité respectivement. Pour ce dernier site réputé « indemne » de surmortalité, on observe un accroissement régulier des niveaux de mortalité depuis 2015.

Un « effet site » lié à des facteurs non définis est encore observé en 2018 et semble interagir avec les moules de toutes origines (lots sentinelles *cf.* § 2.1, lots expérimentaux *cf.* § 4.1, *M. edulis ou M. galloprovincialis*) pour le secteur de la baie de Bourgneuf et le site de Maison Blanche comparativement aux autres sites ateliers suivis. Pour ce site l'expression des mortalités apparait plus précocement que sur les autres sites, avec un profil de mortalités chroniques qui s'étirent jusqu'en juin et un niveau de mortalité final plus élevé.

Contexte hydro-biologique dans les Pertuis Charentais

Depuis 2015, les travaux sur les surmortalités de moules ont permis de suivre finement l'environnement de moules en élevage. La caractérisation du contexte hydrologique permet de constater que les surmortalités d'intensité modérée à forte observées en 2014, 2015, 2016 et 2018 surviennent dans des périodes à fortes variations de salinité, contrairement à 2017 (année à faible niveau de mortalité, proche du seuil de mortalité "habituel" dans les pertuis). La température (particulièrement en hiver) semble également jouer un rôle important, notamment sur l'intensité des mortalités : les hivers chauds et stables de 2014 et 2016 présentent de fortes mortalités, ceux de 2015 et 2018 plus frais et variables sont caractérisés des mortalités plus modérées.

L'environnement physique semble également agir sur les équilibres bactériens tant la singularité de leur évolution transparait au travers des années : opposition entre 2016 et [2015-2018] et 2017.

Les analyses plus fines, en cours d'étude, sur les équilibres microbiens et leur intégration dans le contexte hydro-climatique devraient permettre d'étayer un éventuel lien de ces communautés de bactéries et du phytoplancton avec les épisodes de mortalité de moules rencontrés depuis 2014 dans les Pertuis Charentais.

5.2. Etude du lien entre la caractérisation génétique, histologique et cytogénétique de moules, la néoplasie disséminée et l'apparition de mortalités

a-Recherche du chimérisme génétique chez les moules bleues en France

Des travaux de **génotypage** associés à des analyses du statut cytogénétique par **cytométrie en flux** et histologiques sur des individus triés issus de populations de moules ont été menés en 2017-2018. En 2017, des travaux de génotypage ont également été menés sur des individus sans tri préalable issus de populations naturelles. L'objectif de ces analyses étaient de vérifier en croisant plusieurs techniques si des moules



étaient affectées par un cancer de leurs cellules circulantes (hémocytes) appelé néoplasie hémocytaire et s'il existait une éventuelle concordance entre les résultats de ces deux approches indépendantes.

Un travail méthodologique spécifique sur des individus triés a été réalisé pour évaluer par **deux méthodes de génotypages différentes, microsatellites et SNP,** s'il existait une différence de génotype entre deux tissus, hémolymphe et branchie, d'un même individu. Une « forte distance » entre les deux tissus confirmerait l'atteinte de l'animal par un processus néoplasique.

Au bilan, cette étude a permis de confirmer :

- -que dans les 30 populations naturelles de moules échantillonnées en 2017, année à faible niveau de mortalité, et à partir de moules non triées, le génotypage par SNP a permis la **détection de néoplasies hémocytaires pour environ 7% des moules testées** ;
- -que la détection de néoplasie par un double génotypage microsatellites et SNP est possible et validée pour caractériser des différences génétiques entre les deux tissus d'une même moule, signature d'un processus néoplasique en cours ;
- -que la méthode de génotypage avec huit microsatellites employée précédemment (rapport MORBLEU 2016) est relativement concordante avec résultats comparés de la méthode basée sur le génotypage SNP.
- -que lorsqu'on croise les informations obtenues par génotypage microsatellites et celles issues de la cytométrie en flux (données 2017, 10 lots/populations, mêmes individus triés par cytométrie), il y a concordance, les individus désignés par l'approche génétique comme étant atteints (**individus chimères**) ont effectivement des profils cytométriques anormaux.

Les données de cytométrie obtenues sur l'hémolymphe des moules croisées avec celles des génotypages démontrent la capacité de cette technique à pouvoir détecter et caractériser précocement des anomalies cytogénétiques qui peuvent évoluer vers des processus néoplasiques hémocytaires chez la moule bleue.

Cette étude a mis en lumière des «cas» qui interroge sur les origines diverses et possibles, non pas de la néoplasie mais –des néoplasies-, ceci notamment au regard des données chez des cas/individus analysés par : cytométrie en flux, hémocytologie, histologie et génotypage sur deux tissus.

b-Organismes pathogènes et lésions observées associés aux moules de statut cytogénétique défini

En dehors des épisodes de mortalités et dans le cadre des expérimentations de l'étude de la distribution géographique des anomalies cytogénétiques sur le littoral, caractérisation génétique des populations de moules, étude des anomalies cytogénétiques, potentiel adaptatif,... des lots de moules triés pour leur statut cytogénétique (majoritairement mauvais) provenant, des installations expérimentales de la Tremblade, de populations en élevage ou sur gisements, ont été échantillonnés pour des analyses par histologie. En 2018, un ensemble de 15 lots a été fini d'être analysé et les résultats ne révèlent aucun organisme pathogène d'importance (distinguable en histologie) excepté sur un lot du Pas de Calais, où le parasite à déclaration obligatoire Marteilia refringens a été détecté pour la première fois dans ce secteur.

De même, aucun lien n'a été mis en évidence entre le statut cytogénétique des moules et les lésions observées en histologie. Deux lots ont présenté 7 individus affectés par des lésions de néoplasie hémocytaire.

c-Suivi individuel de l'évolution du profil cytométrique et relation avec le profil histologique

-En 2018, une étude méthodologique a été réalisée sur des individus préalablement triés en combinant **deux approches**, **la cytométrie en flux** –méthode non létale permettant un suivi de chaque moule et l'**histologie**, afin de déterminer : i) si le statut cytogénétique d'un animal donné évoluait ou pas dans le temps ? ii) si l'évolution du profil cytométrique d'un animal donné se traduit par des effets sur la structure histo-cytologique des tissus de cet animal ?



Les résultats acquis au cours d'un suivi sur une année ont permis d'établir quatre catégories de moules selon l'évolution de leur statut cytogénétique hémocytaire par cytométrie et l'analyse finale par histologie: 1-des moules testées et identifiées comme ayant un statut cytogénétique normal (HCQ) restaient indemnes d'affection de leurs hémocytes au cours du suivi, sans présenter de mortalité; -des moules dont le statut cytogénétique devient anormal (LCQ), avec deux sous-types : 2- des moules qualifiées LCQ-p qui évoluent précocement vers le statut anormal et qui meurent massivement entre février et mars; 3- des moules qualifiées LCQ-t qui évoluent tardivement vers le statut anormal et qui sont faiblement affectées par la « mortalité printanière », mais qui présentent une mortalité chronique et tardive (été); 4-des moules qualifiées Néo qui évoluent plus ou moins rapidement vers un statut LCQ, puis vers un statut néoplasique avec des niveaux de ploïdie très élevés (12-16n). Cet état néoplasique terminal est toujours suivi par la mort de l'animal.

A la mort, les moules présentent des lésions tissulaires (infiltrations hémocytaires et granulomes) dont l'intensité semble liée à la complexité du profil cytogénétique. Cette étude a permis de monter à l'échelle de l'individu et grâce aux profils cytométriques, l'évolution dans le temps des anomalies cytogénétiques et des processus néoplasiques.

5.3. Caractériser le potentiel adaptatif de populations de moules faisant face aux épisodes de mortalité

Testage de la survie de 100 familles de moules sur estran

En 2017-2018, une expérimentation a été menée dans la continuité des travaux initiés en 2016, pour comparer et comprendre la variabilité de réponse de moules de plusieurs gisements naturels face aux épisodes de mortalité. 100 familles de moules ont été produites en janvier/février 2017 par croisement entre des parents issus de populations provenant de gisements de moules de plusieurs origines françaises et des deux espèces présentes en France (*Mytilus edulis et M. galloprovincialis*). Ces familles ont fait l'objet d'un testage sur différents sites réputés pour avoir depuis les épisodes de 2014 des niveaux de mortalité de moules contrastés. Dans le site présentant des mortalités anormales chez les moules bleues : -les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités significatives, *M. edulis* (70%) présente des mortalités plus importantes que *M. galloprovincialis* (43%) et absence de différences de mortalités entre les populations pour *M. edulis* et entre les populations pour *M. galloprovincialis*. Dans le site ne présentant pas des mortalités anormales les deux espèces et leurs hybrides présentent des mortalités faibles mais l'espèce *M. galloprovincialis* (30%) présente des mortalités plus importantes que *M. edulis* (10%). Par ailleurs, les paramètres génétiques de la résistance aux phénomènes des mortalités anormales des moules en intra- et inter- populations et par espèce ont permis d'obtenir des données par espèce et populations qui suggèrent des différences de résistance entre les familles aux mortalités observées dans chaque site.

Etude de la sensibilité des familles de moules à une infection bactérienne expérimentale

-Les performances de survie des familles dans le site de **Maison Blanche** ont été comparées à celles obtenues en infection expérimentale contrôlée en laboratoire afin d'infirmer ou confirmer le rôle d'organismes pathogènes identifiés comme potentiellement responsables des mortalités *in situ*. Une souche virulente de *Vibrio splendidus* isolée lors d'un épisode de mortalité en 2014 a ainsi été testée. Les données de ces tests infectieux montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux de survie observés sur l'estran à Maison Blanche et ceux obtenus expérimentalement suite aux injections de la bactérie. La souche de *Vibrio splendidus* isolée en 2014 et testée au cours de nos essais d'infection expérimentale n'est probablement pas la cause majeure des mortalités anormales rencontrées dans les sites mytilicoles. Cependant des tests complémentaires seront nécessaires afin de connaître le rôle de cette espèce dans le phénomène des mortalités anormales rencontrées chez les moules bleues, spécialement pour *M. edulis*.

Au-delà de la compréhension du phénomène des mortalités de moules et des données scientifiques acquises par l'ensemble des recherches conduites depuis 2015, les résultats et les précisions apportées sur les facteurs associés aux mortalités de moules dans le cadre de l'action MORBLEU devraient concourir à établir un lien entre ces connaissances et les actions à mettre en œuvre pour éviter, réduire ou compenser l'impact des mortalités sur les cheptels de moules. Une synthèse de l'ensemble des données sera produite en 2019.



6. Références citées

- Alonso A., Suarez P., Alvarez C., San Juan F., Molist P. (2001). Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ria of Vigo (NW Spain). Dis Aquat Org 47: 73-79.
- Benabdelmouna, Abdellah, and Christophe Ledu. (2016). "The Mass Mortality of Blue Mussels (Mytilus Spp.) from the Atlantic Coast of France Is Associated with Heavy Genomic Abnormalities as Evidenced by Flow Cytometry." *Journal of Invertebrate Pathology* 138 (Supplement C): 30–38. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001.
- Benabdelmouna Abdellah, Saunier Alice, Ledu Christophe, Travers Marie-Agnes, Morga Benjamin (2018a). Genomic abnormalities affecting mussels (Mytilus edulis-galloprovincialis) in France are related to ongoing neoplastic processes, evidenced by dual flow cytometry and cell monolayer analyses. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 157, 45-52. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.003
- Benabdelmouna Abdellah, Garcia Celine, Ledu Christophe, Lamy Pierre, Maurouard Elise, Degremont Lionel (2018b).

 Mortality investigation of Mytilus edulis and Mytilus galloprovincialis in France: An experimental survey under laboratory conditions. *Aquaculture*, 495, 831-841. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.075
- Carballal, María J., Bruce J. Barber, David Iglesias, and Antonio Villalba. (2015). "Neoplastic Diseases of Marine Bivalves." Pathogens and Disease Processes in Marine Molluscs 131 (October): 83–106. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.004.
- CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole), 2015 et 2016. Suivi de la Reproduction et du Captage de la moule Mytilus edulis en Charente maritime. http://creaa.pagesperso-orange.fr/doc
- Dart, Anna. 2016. "Cancer Mussels In." Nature Reviews Cancer 16 (July): 480.
- Fraïsse, Christelle, Khalid Belkhir, John J. Welch, and Nicolas Bierne. 2016. "Local Interspecies Introgression Is the Main Cause of Extreme Levels of Intraspecific Differentiation in Mussels." *Molecular Ecology* 25 (1): 269–86. ://doi.org/10.1111/mec.13299.
- Gee, A., Specht, J. M., Kerk, D., Moore, J. D., Drum, A. S. and Elston, R. A. 1994. Disseminated neoplastic cells in *Mytilus* trossulus: verification of host species origin by (16 S-like) rRNA sequence comparison. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 7–12
- Kamvar, Zhian N., Javier F. Tabima, and Niklaus J. Grünwald. 2014. "Poppr: An R Package for Genetic Analysis of Populations with Clonal, Partially Clonal, and/or Sexual Reproduction." PeerJ 2: e281. https://doi.org/10.7717/peerj.281
- Lubet P., 1959. Recherche sur le cycle sexuel et l'émission de gamète chez les mytilidés. Thèse 159 pp.
- Metzger, Michael J., and Stephen P. Goff. 2016. "A Sixth Modality of Infectious Disease: Contagious Cancer from Devils to Clams and Beyond." *PLOS Pathogens* 12 (10): e1005904. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005904.
- Metzger, Michael J., Antonio Villalba, María J. Carballal, David Iglesias, James Sherry, Carol Reinisch, Annette F. Muttray, Susan A. Baldwin, and Stephen P. Goff. 2016. "Widespread Transmission of Independent Cancer Lineages within Multiple Bivalve Species." *Nature* 534 (June): 705.
- Metzger, Michael J., Carol Reinisch, James Sherry, and Stephen P. Goff. 2015. "Horizontal Transmission of Clonal Cancer Cells Causes Leukemia in Soft-Shell Clams." *Cell* 161 (2): 255–63. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042.
- Moore, J.D., Elston, R.A., Drum, A.S., and Wilkinson, M.T. (1991). Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus* .J. Invertebr. Pathol. 58, 231–243.
- Normand Julien (2019). MYTILOBS Campagne 2018 : Réseau d'observation des moules d'elevage sur la côte atlantique et dans la Manche. RST LERN 19-05. http://archimer.ifremer.fr/doc/



- Paynter AN, Metzger MJ, Sessa JA, and Siddall ME. 2017. "Evidence of Horizontal Transmission of the Cancer-Associated Steamer Retrotransposon among Ecological Cohort Bivalve Species." *Diseases of Aquatic Organisms* 124 (2): 165–68.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès (2016a). Projet «MORBLEU» année 2015. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais : de l'expertise aux actions de recherche, description et étude des conditions associées aux épisodes de mortalité ou susceptibles de les favoriser. Colloque LITEAU "Observation et recherche en appui aux politiques du littoral et de la mer". 14 et 15 janvier 2016, Brest, France.
- Pepin Jean-Francois, Travers Marie-Agnès, Bechemin Christian, Soletchnik Patrick, Le Moine Olivier, Guesdon Stéphane, Lapegue Sylvie, Benabdelmouna Abdellah, Hervio Heath Dominique, Bierne Nicolas (2016b). Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais et Vendée 2014-2015 : de l'expertise aux actions de recherche. Description des conditions associées aux épisodes de mortalité. Point d'information sur l'étude en cours. Journée de la Sante des mollusques marins et Journées de l'Observation conchylicole. 02 au 04 février 2016, Ifremer, Nantes, France.
- Pepin Jean-Francois, Benabdelmouna Abdellah, Dégremont Lionel, Guesdon Stéphane, Le Moine Olivier, Morga Benjamin, Bierne Nicolas, Travers Marie-Agnès, Robert Stéphane, Soletchnik Patrick (2017). Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens : description et facteurs lies MORBLEU-2016. R.INT.RBE/SG2M-LGPMM. http://archimer.ifremer.fr/doc/00391/50288/
- Riquet, Florentine, Alexis Simon, and Nicolas Bierne. 2017. "Weird Genotypes? Don't Discard Them, Transmissible Cancer Could Be an Explanation." *Evolutionary Applications* 10 (2): 140–45. https://doi.org/10.1111/eva.12439.
- Robert Stéphane, Soletchnik Patrick (2016). Réseau national d'observation de la moule bleue Mytilus edulis, MYTILOBS/ Campagne 2015. http://archimer.ifremer.fr/doc/00334/44494/
- Roch Philippe (2002). Behaviour of defense peptides in environmentally stressed mussels. *Revue De Medecine Veterinaire*, 153(7), 517-520
- Svardh L., Johanesson K., 2002. Incidence of hemocytes and parasites in coastal populations of blue mussels (*Mytilus edulis*) testing correlations with area, season, and distance to industrial plants. J Invertebrate Pathology, 80 (1): 22-28.
- Travers Marie-Agnès, Pepin Jean-Francois, Soletchnik Patrick, Guesdon Stéphane, Le Moine Olivier (2016). Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés MORBLEU-2015. http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/



7. Annexes

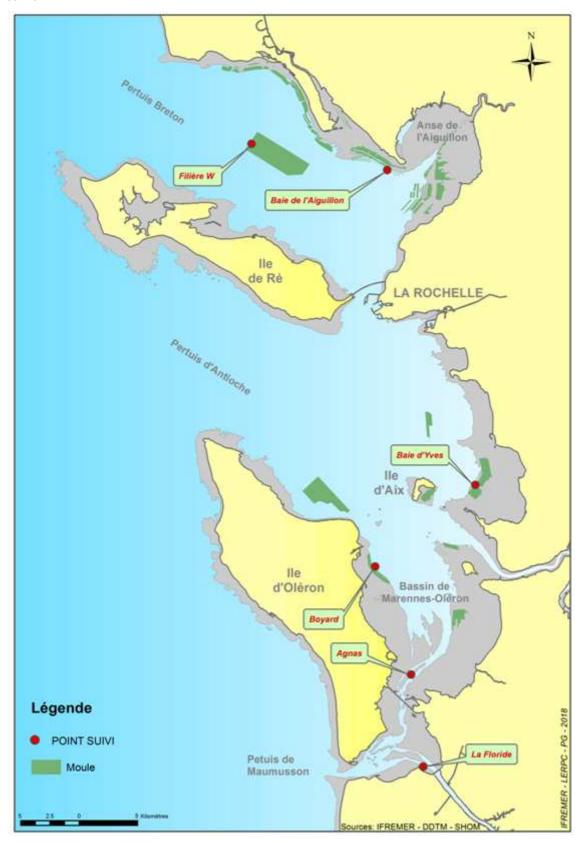
Annexe 1:

Figure 37 : Carte présentant pour les secteurs Morbihan, Loire Atlantique et Vendée les sites de prélèvements et de suivis de moules relatifs aux actions de -Spatialisation du critère « qualité cytogénétique » - et -Caractérisation des bases génétiques de la survie-





Figure 38 : Carte présentant pour les secteurs Vendée et Charente Maritime, les sites de prélèvements et de suivis de moules relatifs aux actions de -Spatialisation du critère « qualité cytogénétique » - et —Caractérisation des bases génétiques de la survie-





Annexe 2:

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

Tableau 14 : Liste des différents stades sexuels gonadiques chez la moules d'après Lubet, 1959.

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



Annexe 3 : Figure 39 : obtention de lots de moules contrastés pour la survie

Comment a t'on obtenu des lots de moules contrastés pour la survie ?

Situation après épisodes de mortalité Situation avant épisodes de mortalité (obs. in situ, année N, mortes en rouge) (2 pop. moules sauvages, obs. in situ, année N) A- Secteur à fortes mortalités (> 50%) moules pour Repro-A au Labo de Ré A ROCHELLE A ROCHELLE B- Secteur à faibles mortalités (< 20%) collecte moules pour Repro-B Labo d'Oléron Test de la survie des lots pré-qualifiés (A1) et Reproduction (X): pontenaturelle en installations des lots témoins (B1) sur l'estran (année N+1) expérimentales des moules survivantes collectées sur estran Naissain issu de parents de Ré survivants à de fortes mortalités (prélevés en secteur A), dit -lot A1 Naissain issu de parents prélevés en secteur à faible mortalité (secteur d'Aix B), dit -lot B1 Bassin de lirennes-Oldron

d'Oléron

