

Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais

Christian Béchemin (1), Patrick Soletchnik (1), Pierre Polsenaere (1), Olivier Le Moine (1), Fabrice Pernet (2), Martin Protat (2), Marine Fuhrman (2), Claudie Quéré (2), Sophie Goultquer (2), Charlotte Corporeau (2), Sylvie Lapègue (3), Agnès Travers (3), Benjamin Morga (3), Manon Garrigues (3), Céline Garcia (3), Philippe Haffner (3), Christine Dubreuil (3), Nicole Faury (3), Laury Baillon (3), Jean-Pierre Baud (4), Tristan Renault (3) (trenault@ifremer.fr)

(1) Ifremer, Département Océanographie et dynamique des écosystèmes, Laboratoire Environnement Ressources des pertuis charentais, La Tremblade
(2) Ifremer, Département Ressources biologiques et environnement, Unité Physiologie fonctionnelle des organismes marins, Laboratoire de physiologie des invertébrés, UMR LEMAR, Brest, France
(3) Ifremer, Département Ressources biologiques et environnement, Unité Santé, génétique et microbiologie des mollusques, Laboratoire de génétique et pathologie des mollusques marins, La Tremblade, France
(4) Ifremer, Département Ressources biologiques et environnement, Nantes

Résumé

Des épisodes de mortalité massive (90-100 %) ont été observés au sein des élevages de moules touchant à la fois les animaux adultes et les juvéniles au printemps 2014, dans les Pertuis charentais. Un ensemble de travaux a été réalisé afin d'analyser et de mieux comprendre ce phénomène en recherchant la présence d'agents infectieux, en décrivant les fluctuations environnementales associées et en étudiant l'état physiologique des animaux. Des bactéries identifiées comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* ont été détectées chez les animaux moribonds et apparaissent capables d'induire des mortalités en laboratoire chez les moules bleues. De plus, des conditions environnementales particulières (apports importants d'eau douce, remise en suspension de sédiments au travers de tempêtes successives et temps de renouvellement des masses d'eau spécifiques du Pertuis breton élevé) ont été associées au déclenchement du phénomène.

Mots-clés

Mortalité, moules, Pertuis charentais, *Vibrio splendidus*, environnement

Abstract

Mass mortality outbreaks affecting blue mussels in 2014 along the French coast (Pertuis Charentais)

*Mass mortality outbreaks (90-100%) in both juvenile and adult blue mussels were reported in 2014 along the Pertuis Charentais area of the French Atlantic coast. A series of studies were carried out to learn more about the phenomenon through detecting pathogens, describing environmental conditions and establishing the physiological status of the animals. Bacteria identified as belonging to the *V. splendidus* species were detected in dying mussels and seem able to cause mortality in blue mussels in the laboratory. Unusual environmental conditions (large amounts of fresh water, re-suspension of sediments during a series of storms, and a high renewal rate of specific water masses in Brittany's Pertuis area) may be partially responsible for sparking the phenomenon.*

Keywords

Mortality, Mussels, Pertuis Charentais, Vibrio splendidus, Environment

Des épisodes de mortalité massive (90-100 %) ont été observés au sein des élevages de moules touchant à la fois les animaux adultes et les juvéniles au printemps 2014, dans les Pertuis charentais. Suite à une saisine de la Direction générale de l'alimentation (DGAL), l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) a réalisé un ensemble de travaux afin d'analyser et de mieux comprendre ce phénomène en recherchant la présence d'agents infectieux, en décrivant les fluctuations environnementales associées et en étudiant l'état physiologique des animaux.

Les premières mortalités ont été rapportées la première semaine de mars, dans un secteur « Centre-Sud » du Pertuis breton. Des mortalités ont ensuite été observées dans les différents sites mytilicoles, dans l'est du Pertuis breton et ont été constatées sur une période d'environ trois mois. Les constats de mortalités réalisés par les Directions départementales du territoire et de la mer (DDTM) de Vendée et de Charente-Maritime ont montré une spatialisation du phénomène, avec un secteur nord-ouest du Pertuis breton, très touché (88-100 %), un secteur est du Pertuis breton moins affecté (34-80 %) et le Pertuis d'Antioche considéré comme très peu touché par les mortalités de moules (3-10 %), durant la période mars-avril 2014 (Figures 1 et 2).

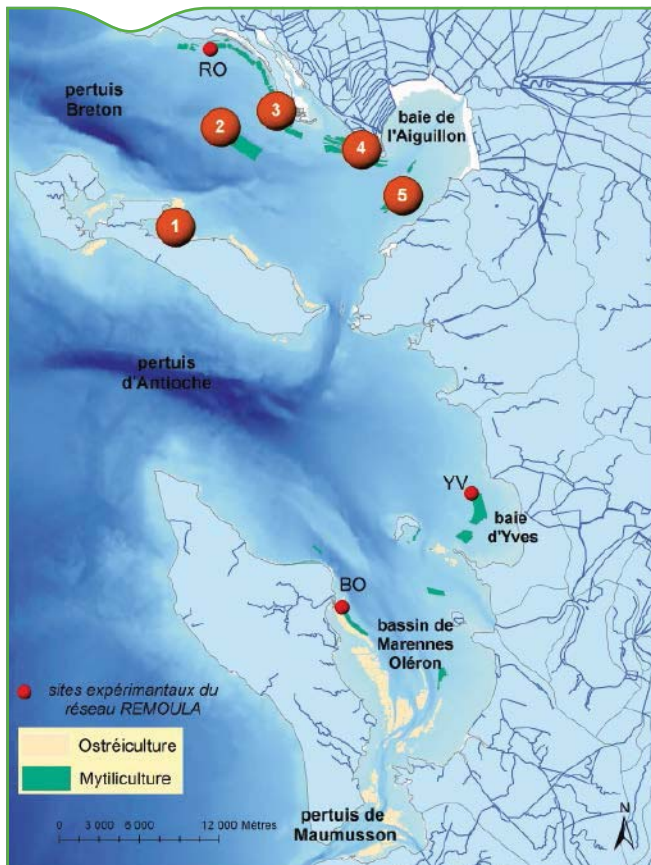
Caractérisation environnementale, hydrologique et hydrodynamique des zones d'élevage

Au cours de l'hiver/printemps 2014, les débits ont été exceptionnels pour la quasi-totalité des fleuves débouchant dans les Pertuis charentais. Ils ont été en nette augmentation par rapport à la série des hivers 2008-2012, et encore supérieurs aux forts débits de l'hiver 2013. La température de l'eau a été supérieure de 1 à 2 °C par rapport

à la médiane interannuelle (comprise entre 8,6 et 9,7 °C selon les sites). Ces températures caractérisent un hiver « chaud ».

Le point suivi dans le Pertuis breton a été caractérisé par plusieurs baisses successives de salinité et des pics importants de turbidité en relation avec les apports marins (panache des fleuves externes aux Pertuis) et terrigènes (fleuves internes au Pertuis breton), dont les effets se conjuguent dans ce secteur. Dans les Pertuis, les salinités observées se classent parmi les plus faibles depuis 24 ans (1994, 1995, 2001, 2007, 2014). La turbidité a été supérieure (de 1 à 6 mg/L) à la médiane au niveau de tous les sites de production de moules. Elle était proche de celles rencontrées au cours des hivers 2001, 2007, 2008 et 2009 à l'ouest du Pertuis breton. Au cours de l'hiver 2014, le littoral de la façade atlantique a présenté une turbidité très forte, supérieure de 10 mg/L à la normale saisonnière. Elle a été observée de façon très prononcée, en particulier, de la Gironde à la pointe Sud Bretagne. Cette forte turbidité est la conséquence probable de l'effet conjoint des forts régimes hydriques hivernaux (débits de fleuves), et surtout, des coups de vent et tempêtes de l'hiver 2014.

La concentration en chlorophylle (estimation des ressources trophiques) a été observée comme légèrement supérieure à la médiane dans les Pertuis charentais au cours de l'hiver 2014. Les blooms de diatomées (*Skeletonema costatum*) sont apparus dans le Pertuis breton au cours du mois de mars après les premiers constats de mortalité. Le réchauffement des masses d'eau et les conditions anticycloniques ensoleillées de la deuxième quinzaine de mars ont probablement favorisé ce développement. Les ressources trophiques (estimées par la chlorophylle *a*) sont dans la gamme des valeurs saisonnières rencontrées à l'échelle de la façade atlantique. Sur la base de cette expertise environnementale, aucune différence marquée n'a pu être notée entre les deux Pertuis, sachant que seules les moules du Pertuis breton ont subi des épisodes de mortalité massive en mars 2014.



Dates	Sites
5 mars 2014	1 Moules sauvages sur tables ostréicoles de l'île de Ré
10 mars 2014	2 Filières du Pertuis Breton
17 mars 2014	3 Bouchots de la pointe d'Arçay
27 mars 2014	4 Bouchots de l'Aiguillon (site de l'Eperon)
28 mars 2014	5 Bouchots de Marsilly

Figure 1. Spatialisation des déclarations de mortalités de moules dans les sites mytilicoles des Pertuis charentais au printemps 2014

Les résultats apportés par des essais de simulation avec le modèle « courantologique » en trois dimensions (MARS3D-PC) montrent que la chronologie, la spatialisation et les niveaux de mortalités observés dans les différents sites mytilicoles du Pertuis breton au cours du mois de mars 2014 sont cohérents avec un transport hydrodynamique simulé au travers des deux traceurs implémentés dans le modèle. Certaines zones (centre-sud) du Pertuis breton apparaissent fortement liées d'un point de vue hydrodynamique au travers des courants alors que d'autres secteurs (Aiguillon, Marsilly, La Rochelle...) semblent présenter moins de liens. Ces résultats sont en adéquation d'un point de vue spatial et quantitatif avec les épisodes de mortalité observés sur les différents secteurs mytilicoles.

Les conditions environnementales, bien que particulières pour l'hiver 2014, ne peuvent pas expliquer à elles seules les épisodes de mortalité massives de moules rapportées dans le Pertuis breton.

Recherche d'agents infectieux

L'Ifremer a reçu neuf lots collectés dans les Pertuis charentais en mars et avril 2014 pour analyses en pathologie dans le cadre de saisines du Réseau de pathologie des mollusques marins (Repamo; ce réseau de l'Ifremer assure pour le compte de la DGAL, une surveillance des maladies affectant les mollusques marins en France). L'ensemble des lots prélevés correspond à des animaux présentant des mortalités (de 10 à 32 %) au moment de la collecte (Pertuis breton, Baie de l'Aiguillon et Pertuis d'Antioche). Deux types d'analyses ont été mis en œuvre pour rechercher des agents pathogènes. D'une part, des

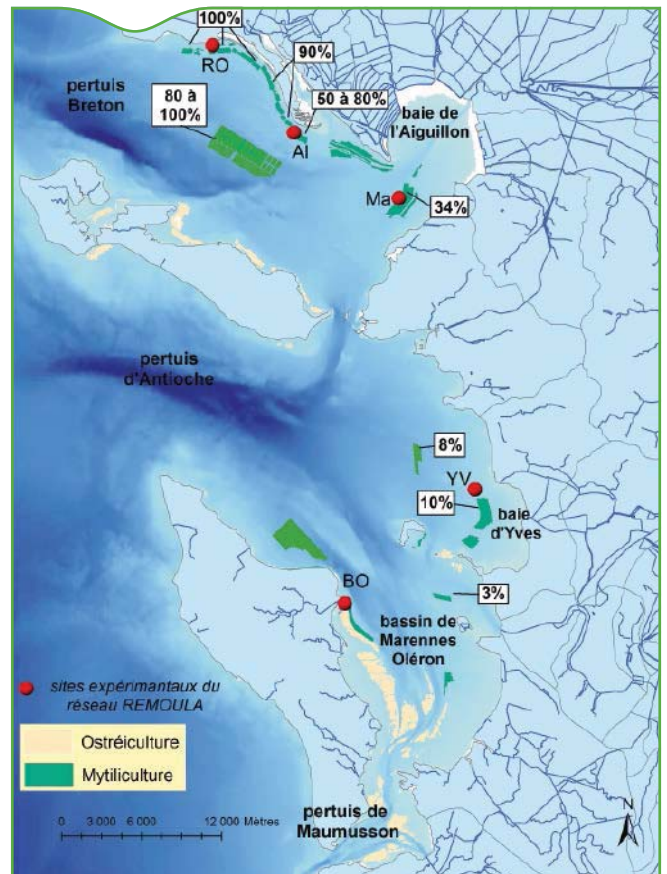


Figure 2. Bilan fin avril 2014 des mortalités de moules dans les Pertuis charentais: 80 à 100 % sur les filières⁽¹⁾; 100 % sur les Ecluseaux, les Roulières (RO), et la Belle Henriette (Sud Vendée); 90 % sur le Pas de Tranchais et la pointe de la Roche (Sud de l'estuaire du Lay); 50 à 80 % sur la pointe de l'Aiguillon (AI), 34 % sur Marsilly (MA), 8 % sur les filières d'Yves, 10 % sur les bouchots d'Yves (YV) et 3 % sur les bouchots d'Aix (d'après les constats de mortalités de moules des missions d'enquête des DDTM de Vendée et Charente-Maritime)

analyses moléculaires en PCR en temps réel ont été réalisées en ciblant trois agents infectieux: l'herpès virus OsHV-1 et les bactéries de l'espèce *Vibrio aestuarianus* et du groupe *Splendidus*, ces agents étant connus comme responsables d'infections chez différentes espèces de mollusques bivalves. Pour la détection des bactéries, une étape préalable de culture sur milieu Marine agar a été mise en œuvre. Les souches bactériennes majoritaires isolées en culture ont fait l'objet d'une identification par PCR en temps réel. D'autre part, des analyses histologiques ont également été effectuées pour une recherche non ciblée d'agents infectieux, tout particulièrement les parasites protozoaires.

Le premier type d'analyse a montré l'absence de détection d'ADN du virus OsHV-1 et de la bactérie *V. aestuarianus* pour les neuf lots. Des isolats bactériens identifiés comme appartenant au groupe *Splendidus* ont été détectés dans l'ensemble des échantillons analysés par PCR en temps réel. Cette dernière approche analytique n'a cependant pas permis d'identifier les bactéries en termes d'espèce. Des approches méthodologiques complémentaires (séquençage) ont été mises en œuvre dans ce but. Les analyses histologiques ont permis de détecter dans deux lots des parasites protozoaires à déclaration obligatoire (*Marteilia sp.*). Une analyse par hybridation *in situ* a permis de compléter l'identification des parasites détectés au niveau de l'espèce (*Marteilia refringens*). Sur les sept autres lots, ces analyses histologiques n'ont pas permis de détecter de parasites protozoaires, ni de détecter d'agents pathogènes inconnus observables grâce à cette technique.

1. Immergées en plein mer, les moules peuvent être élevées le long de cordes fixées à une haussière maintenue à la surface par des flotteurs.

Les travaux menés à l'Ifremer ont également intégré des essais d'induction de mortalité, afin de vérifier si le phénomène observé sur le terrain pouvait être reproduit en conditions expérimentales. Ces essais ont été réalisés en utilisant des moules prélevées dans le Pertuis breton en avril 2014 provenant de lots présentant des mortalités. Ces moules ont servi à préparer un broyat de tissus (branchies, manteau). Ce broyat, après filtration (8 µm et 0,22 µm), a été injecté à des moules saines. Une mortalité de 100 % a été observée vingt-quatre heures après injection chez les animaux ayant reçu le broyat filtré à 8 µm et aucune mortalité n'a été relevée après injection du broyat traité à 0,22 µm. L'expérience a été répétée en utilisant les animaux morts après injection lors du premier essai pour préparer le broyat et des résultats identiques ont été obtenus (mortalité totale des animaux injectés pour le broyat filtré 8 µm et aucune mortalité pour le broyat traité à 0,22 µm). Il a été ainsi possible de transmettre par injection un élément capable d'induire des mortalités massives et rapides chez des moules saines. Cet élément n'apparaît pas être une substance toxique/toxine dans la mesure où il n'a pas été observé un effet de dilution (résultats identiques obtenus dans les deux essais successifs), ni un organisme dont la taille est inférieure à 0,22 µm (virus). Les résultats obtenus suggèrent plutôt l'implication d'une ou de plusieurs bactéries. Il est important de noter que des huîtres creuses saines ont également été injectées avec les broyats préparés à partir des moules moribondes au cours des deux essais. Aucune mortalité n'a été observée chez les huîtres. Ce résultat pourrait s'expliquer par une sensibilité différente des huîtres et des moules à un ou des agents infectieux. Il est important de préciser que ces essais demanderaient à être répétés pour confirmer les résultats obtenus.

Les bactéries cultivables majoritairement (isolats) présentes dans les tissus des animaux moribonds analysés en 2014 et identifiées comme appartenant au groupe *Splendidus* ainsi que les isolats bactériens identifiés comme appartenant à ce même groupe disponibles à l'Ifremer (isolés de moules depuis 2010 dans le cadre de saisines Repamo), ont fait l'objet d'une caractérisation *via* le séquençage d'un gène de ménage (*gyraseB*). Ainsi, 144 isolats bactériens identifiés comme appartenant au groupe *Splendidus* issus de 24 lots prélevés entre 2010 et 2014, en Bretagne, Vendée, Charente-Maritime et Normandie ont été étudiés. Ces isolats ont été collectés : 1) lors de prélèvements réalisés suite à des hausses de mortalité de moules (saisines Repamo) en 2010, 2012, 2013 et 2014 (94 isolats dont 59 prélevés en 2014, 19 lots), 2) au cours d'un projet de recherche financé par la Commission européenne (Bivalife, coordonné par l'Ifremer) sur un site de Charente-Maritime hors épisodes de mortalité (2011-2012, 50 isolats, 5 lots). Suite à des extractions d'ADN total pour l'ensemble de ces souches (144), 130 séquences du gène *gyrB* ont été obtenues, alignées, et comparées entre elles et avec des séquences de référence.

L'analyse des 85 séquences obtenues pour le gène *gyrB* des isolats prélevés au cours d'épisodes de mortalité de moules a permis de mettre en évidence un ensemble regroupant la majorité des isolats (58 sur les 85 isolats). Ce groupe contient la souche type de *V. splendidus* ainsi que des isolats prélevés en 2014, 2013 et 2010. Ainsi, 100 % des lots collectés en 2014, 100 % des lots collectés en 2010, ainsi que le lot collecté en 2013 lors d'épisodes de mortalités de moule contiennent des isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus*. Un second ensemble contenant la souche type de *V. atlanticus* regroupe sept isolats (six isolats de 2014 et un de 2012). Ainsi, 36 % des lots collectés en 2014 lors d'épisodes de mortalités de moules sont identifiés comme appartenant à l'espèce *V. atlanticus*. Enfin, des séquences d'isolats proches de celles des souches type de *V. lentus*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. artaborum*, ou sans séquence type à proximité ont également été obtenues.

À partir des 50 isolats collectés hors mortalité sur des moules sauvages, 45 séquences partielles du gène *gyrB* ont été obtenues et comparées aux séquences de référence (souches type définissant les espèces du groupe *Splendidus*). Ces différentes séquences se répartissent à proximité de différentes espèces : *V. splendidus*, *V. lentus*/*V. atlanticus*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus*/*V. gigantis*, *V. artaborum*, *V. kanaloae*.

En conclusion, l'analyse des séquences des isolats prélevés au cours des épisodes de mortalité de moules depuis 2010 met en évidence une forte représentation d'isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* : 68 % des isolats du groupe *Splendidus* prélevés au cours d'épisodes de mortalité (2010-2014) appartiennent à l'espèce *V. splendidus* (58 isolats/85 isolats analysés). Il est important de noter que des bactéries appartenant à cette même espèce peuvent également être isolées sur des animaux sains hors mortalité, mais en moindre proportion : 18 % des isolats prélevés appartiennent à l'espèce *V. splendidus* (8 isolats/45 isolats analysés). Afin de mieux appréhender la diversité des souches appartenant à l'espèce *V. splendidus* (pendant/ hors mortalité; 2010/2014), il paraît important de poursuivre l'analyse de séquences plus discriminantes (*hsp60*) ou en typant ces bactéries par des techniques comme la recherche de Variable Number Tandem Repeat (VNTR). Des essais d'infections expérimentales apparaissent également nécessaires pour préciser la virulence des isolats bactériens identifiés comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* collectées depuis 2010 lors d'épisodes de mortalité de moules. De telles approches devraient permettre de déterminer des espèces à risque au sein du groupe *Splendidus*.

Caractérisation de l'état physiologique des moules

L'état énergétique et nutritionnel des moules prélevées dans les élevages où les mortalités étaient encore en cours et dans des sites témoins exempts de mortalité anormale, ainsi que sur des gisements naturels ont été réalisées dans le Pertuis breton. Des échantillons (n=76) ont ainsi été prélevés et conditionnés. Les échantillons ont été divisés en sous échantillons pour l'analyse des sucres totaux, des triglycérides et des acides gras.

Les sucres qui constituent les principales réserves énergétiques des moules pendant la période de reproduction ont été analysés par spectrophotométrie. Les teneurs en sucres des moules prélevées sur les sites présentant 90 % de mortalité sont similaires à celles qui ont été prélevées sur les sites sans mortalité (216,2 *versus* 195,4 mg g⁻¹ tissu sec). De même, les moules prélevées sur des bouchots présentant 20 % de mortalité avaient des teneurs en sucres similaires à celles qui ont été prélevées sur des bouchots témoins. Les teneurs en sucre observées étaient comparables à celles obtenues dans d'autres études. Les lipides neutres de tous les échantillons prélevés ont été purifiés afin de quantifier les triglycérides, qui représentent un autre compartiment de réserve des moules. Leur composition en acides gras a été caractérisée par chromatographie en phase gazeuse, afin de déterminer les sources de nourriture des moules en fonction des sites de prélèvement. L'analyse qualitative des chromatogrammes suggère qu'il existe des différences importantes de sources de nourriture entre les sites.

Sur la base des analyses réalisées, il est apparu que les moules prélevées dans des sites où il y a eu des mortalités étaient de meilleure qualité, du point de vue énergétique et nutritionnel, que celles qui ont été échantillonnées sur des sites exempts de mortalité. Ce résultat apparemment paradoxal pourrait s'expliquer par le fait que les prélèvements réalisés dans les sites où les mortalités étaient encore en cours correspondent à des animaux survivants présentant des caractéristiques particulières liées à leur capacité d'avoir « résister » au phénomène.

Conclusion

Des bactéries identifiées comme appartenant à l'espèce *V. splendidus* ont été détectées chez les animaux moribonds et apparaissent capables d'induire des mortalités en laboratoire chez les moules bleues. De plus, des conditions environnementales particulières (apports importants d'eau douce, remise en suspension de sédiments au travers de tempêtes successives et temps de renouvellement des masses d'eau spécifiques du Pertuis breton élevé) ont été associées

au déclenchement du phénomène. Ces éléments suggèrent des modifications dans les équilibres microbiens favorisant la présence de bactéries appartenant à l'espèce *V. splendidus*. Des variations de salinité et de turbidité auraient pu modifier l'abondance de ces bactéries et le temps de renouvellement élevé des masses d'eau du Pertuis breton au cours de la période considérée aurait pu favoriser la rencontre de ces agents infectieux avec les moules.

La filière ostréicole française fait face à de très fortes mortalités d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, depuis 2008. En 2014, des épisodes de mortalité massive de moules bleues ont été rapportées, en Charente-Maritime et en Vendée (Pertuis breton). Des phénomènes marquants de mortalités ont été également notés chez différentes espèces de bivalves fouisseurs comme le flion tronqué et la coque. Si des agents pathogènes ont été identifiés et apparaissent comme étant les causes directes induisant la mort des animaux, il reste à expliquer l'émergence de tels phénomènes.

Les fortes variations spatio-temporelles et physico-chimiques des environnements côtiers peuvent significativement influencer la physiologie des animaux (en matière de capacités de réponse au stress ou aux maladies infectieuses). De la même manière, ces variations peuvent être à l'origine de modifications des équilibres microbiens et parasitaires. Les fluctuations environnementales et l'hétérogénéité de la zone côtière, à l'interface terrestre-aquatique, apparaissent donc comme des variables majeures dans les équilibres qui peuvent exister entre les agents infectieux et leurs hôtes. Dans ce contexte, analyser des interactions multiples entre un (des) agent(s) infectieux, son (leur) hôte et l'environnement apparaît aujourd'hui comme une approche indispensable.

Remerciements

Les travaux réalisés ont bénéficié d'un soutien financier de la DGAL et de la Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture (DPMA; conventions DGAL n° 14/1211521 et DPMA n° 14/1211522).