

Titre de la thèse : Rôle des biofilms microphytobenthiques en tant que réservoir de pathogènes et rôle de l'érosion estuarienne pour expliquer les interactions bivalve-virus et les mortalités estivales huîtres Crassostrea gigas (virales et bactériennes)

Co-Directeur de thèse : Dr. **Orvain Francis** et Dr. **C. Lelong** (**Université de Caen, UMR BOREA « Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques » MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207**)

Co-encadrante : Dr. **C. Mallet** (**UMR Université de Clermont-Ferrand, CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement, F-63177 Aubière France**)

Partenariats actifs :

- CRH et tous les partenaires impliqués (UMR BOREA, IFREMER-LERN, SMEL, LABEO14, CRC) et plus spécifiquement Julien Normand, Aline Gangnery (IFREMER-LERN) et Maryline Houssin (LABEO-14)
- Fabrice Pernet (leader IFREMER du programme GIGASSAT) et l'ensemble des 8 partenaires de l'ANR GIGASSAT

I. Contexte de l'étude

Les virus en milieu marin peuvent infecter une très large gamme d'hôtes spécifiques tels que les procaryotes (virus bactériophages), mais aussi les eucaryotes protistes et les métazoaires. Les infections virales sont très fréquemment suivies de la mort de leur hôte avec un relargage massif de particules virales libres dans l'environnement. Les virus sont les organismes les plus abondants des écosystèmes marins avec des valeurs dans une gamme de 10^7 à 10^{10} L⁻¹ et ils sont encore plus abondants dans le compartiment benthique avec des valeurs 1000 fois plus élevée, de l'ordre de 10^7 à 10^{10} g⁻¹ de sédiments marins (Weinbauer 2004, Suttle 2005). La plupart de ces virus sont bactériophages et ils jouent un rôle essentiel dans la régulation des cycles biogéochimiques en assurant des fonctions de médiateur de la transformation et du recyclage de la matière organique et de l'énergie dans la boucle microbienne, avec des taux de mortalité des bactéries de l'ordre de 20 à 50% et qui peuvent même exceptionnellement atteindre 100% (Heldal & Bratbak 1991, Suttle 2007, Wommack & Colwell 2000, Danovaro et al. 2011). Les abondances virales sont extrêmement variables à microéchelle dans les sédiments et sont plus élevées en surface au sein de biofilms microphytobenthiques autotrophes (source d'oxygène). Leur abondance est de plus en plus faible dans les strates inférieures où les accepteurs d'électron varient graduellement selon les strates avec des communautés microbiennes spécifiques liées à la disponibilité chimique des accepteurs d'électron dominants et les plus efficaces en termes de métabolisme énergétique (Glud & Middelboe, 2004).

Les abondances virales les plus élevées se trouvent dans les eaux estuariennes et tout particulièrement dans les eaux douces. L'addition d'eau marine dans de l'eau douce en système expérimental montre un impact négatif sur la production virale alors qu'à l'inverse, une addition d'eau douce n'a pas d'effet négatif sur la production virale dans le compartiment marin. Une étude comparative à échelle globale montre que la salinité moyenne de zones estuariennes est un facteur direct contrôlant les abondances virales de manière négative, les eaux douces étant plus riches en virus. Il existe également un lien direct positif entre la biomasse chlorophyllienne

autotrophique et les concentrations virales marines et ce résultat se retrouve dans les deux compartiments des écosystèmes marins : pélagiques et benthiques (Hewson et al. 2001, Danovaro et al. 2011).

Les virus dans le compartiment benthique des écosystèmes côtiers est considéré comme une boîte noire et leur rôle écologique en tant que régulateur biogéochimique, de contrôle des populations bactériennes ou en tant qu'agent pathogène des organismes marins doit être approfondi pour mieux anticiper la vulnérabilité des écosystèmes estuariens aux risques environnementaux et sanitaires (Filippini & Middelboe 2007). Tout comme les activités bactériennes benthiques, le viriobenthos est clairement stimulé par le statut trophique de l'environnement et notamment par la prolifération algale des sédiments ou des blooms phytoplanctoniques après sédimentation de la matière détritique (Hewson & Fuhrman 2003, Glud et Middelboe 2004). Les sédiments côtiers marins forment un habitat très favorable à la survie et au développement des microorganismes pathogènes. En effet, les biofilms à la surface des vasières intertidales subissent une multitude de stress et exercent une pression sélective susceptible de stimuler l'émergence de formes de résistances comme cela a été observé pour la bactérie *Escherichia coli*, devenue résistante aux polluants accumulés dans un biofilm (Luna et al. 2010, Vignaroli et al. 2012). Les suivis sanitaires de la qualité microbiologique des mollusques exploités doivent mieux intégrer la surface des sédiments marins car les risques de survie et de résistance des formes libres de microorganismes pathogènes sont très prononcés (Luna et al. 2010). Les mesures de qualité microbiologique des eaux marines sont presque exclusivement basées sur le suivi au sein de la colonne d'eau, alors que le réceptacle à long-terme des microorganismes dont les pathogènes se trouvent à la surface du sédiment où de plus en plus d'études montrent que ce réservoir permet la survie, voir la sélectivité des formes de résistance. La remise en suspension du sédiment permet de relarguer des quantités de virus et de bactéries qui peuvent être très élevées (Dupuy et al. 2014).

Les virus pathogènes de la macrofaune et notamment de la malacofaune (Mollusques) sont aussi susceptibles de se trouver en abondance à la surface des sédiments et tout particulièrement des biofilms microphytobenthiques stimulée par l'activité de biodéposition et de bioturbation de ces animaux filtreurs (Dupuy et al. 2014). Les contaminations virales des bivalves sont très fréquentes car ces animaux capturent leur nourriture en filtrant de fines particules et tout particulièrement les microalgues (Lees 2000). Or, une majorité de ces microalgues qui participent au régime alimentaire des bivalves filtreurs proviennent du compartiment benthique, réceptacle naturel en microorganismes estuariens (Lefebvre et al. 2009). Les virus contaminant les hôtes humains ne peuvent pas se multiplier en dehors des cellules hôtes, mais les eaux estuariennes peuvent être parfois concentrées en virus entériques susceptibles de contaminer les mollusques bivalves consommés par les populations humaines (Lees 2000). Les problèmes viraux ne sont pas limités qu'aux seuls virus contaminant les bivalves (ex : OstreidHerpes virus de type 1, OsHV1), mais aussi à leur rôle de transmission des bivalves pour la santé humaine. En effet, parmi les organismes marins, les bivalves sont ceux les plus sujets à transmettre des sources virales issues de contaminations fécales (Lees 2000, Umesha et al. 2008), comme ceux responsables d'infections gastroentériques (Calicivirus, Astrovirus, Rotavirus, Adénovirus, Entérovirus), les virus Hépatiques (A et E).

Les poliovirus sont également susceptibles d'être transmis par cette route fécale – orale via les bivalves (Lees 2000). Les bivalves concentrent plus facilement les virus que les autres organismes marins à cause de leur comportement alimentaire suspensivore (Lees 2000).

Dans les biofilms autotrophiques microphytobenthiques, composés essentiellement de diatomées benthiques, de cyanobactéries et de nombreux procaryotes qui se développent à la surface de sédiments cohésifs en zone estuarienne (vases riches en silt/clay et zones de mélange sablo-vaseux), les microorganismes sont adsorbés et englués dans une gangue d'exopolymères (EPS) sécrétés par les diatomées benthiques (Orvain et al. 2014, Ubertini et al. in press). Les polymères constitutifs des biofilms microphytobenthiques peuvent être considérés comme des éponges absorbant les molécules organiques et les ions à proximité des cellules, et potentiellement des virus et bactéries pathogènes. De plus, en réponse au forçage physique par les courants tidaux et les vagues, les diatomées benthiques séjournent régulièrement dans le compartiment pélagique où elles peuvent également capter les particules organiques et les agents pathogènes à leur surface avant de sédimenter à nouveau (comportement tychopélagique). Les virus ont ainsi une tendance à se concentrer à la surface de ces EPS grâce au rôle de colle adhésive de cette matrice extracellulaire et/ou aux forces électrostatiques et aux processus physico-chimiques qui s'exercent à leur surface pouvant former des complexes ioniques avec les molécules telles que celles que l'on peut trouver à la surface des capsides virales (glycoprotéines). Parmi la diversité des fonctions attribuées aux EPS, il a été démontré que la matrice d'EPS des biofilms fournit un refuge aux microorganismes pathogènes, en tamponnant les stress potentiels (et notamment une protection contre le stress halin qui est le premier facteur de stress auquel les microorganismes d'eau douce sont soumis, Defew et al. 2009, Orvain et al. 2014). Or, les bactéries et virus pathogènes entrent dans les systèmes pélagiques marins à partir des sources aquatiques fluviales et continentales. La plupart de ces microorganismes sont immédiatement stressés par la concentration en sel (choc halin) et les fortes irradiations en UV rencontrées en milieu océanique, ce qui entraîne une forte diminution des abondances virales et bactériennes au passage dans le milieu marin, comparé aux habitats des eaux douces (Filipini and Middelboe 2007). La survie de nombreux pathogènes, entrant dans les eaux marines, est donc liée à leur association aux floculats biologiques très riche en matière organique (en EPS) ou aux particules minérales. Le mécanisme exact qui influe sur la résilience des pathogènes fixés au sein des EPS reste incertain (Decho 2000), mais ils sont essentiellement liés aux propriétés de fixation ionique des EPS aux agents toxiques tels que les métaux lourds et les antibiotiques, mais aussi à la réduction des taux d'irradiation UV exercée par les photosystèmes des microalgues constitutives du biofilm microphytobenthique. Les modifications récentes de protocole d'extraction des EPS permettent de réaliser désormais des quantifications des virus benthiques des biofilms et associés aux EPS (Takahashi et al. 2009, Carreira et al. 2015).

La salinité augmentant, dans les eaux saumâtres de transition estuarienne, explique une augmentation des concentrations en cations Na^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} . L'agrégation en floccs va accélérer leur taux de sédimentation et expliquant ainsi la richesse des sédiments intertidaux en matière organique et en microorganismes de toute sortes. Cependant, la capacité des microorganismes pathogènes à survivre, résister et se propager dans le milieu de transition

fluvial-marin que sont les estuaires sont des processus à approfondir puisque ces milieux sont à proximité de zones de baignades récréatives et sont le lieu de culture/pêche intensives d'organismes marins consommés, comme de nombreux mollusques bivalves (huîtres, moules, coques, palourdes...). Les risques de contaminations épidémiologiques des élevages de mollusques pour la consommation humaine, mais aussi des agents infectieux humains, doivent y être détectés au mieux pour aider à préserver l'exploitation de ces milieux côtiers (pêche, tourisme, conchyliculture).

Le déclin de virulence (abattement) dans l'environnement marin lorsque le virus est libre est accentué par des facteurs tels que les UV et l'activité des exoenzymes bactériennes. Après formation de floes et sédimentation, les biofilms microphytobenthiques à la surface des sédiments sont des zones d'accumulation de ces virus qui peuvent faciliter la résistance des virus puisque l'activité photosynthétique des diatomées et des cyanobactéries est très efficace pour capter la lumière (coefficient d'extinction de la lumière très élevé pour les diatomées, Serodio et al. 2003, Forster & Kromkamp 2004), et les stratégies de migrations verticales mises en jeu par les diatomées (Mitbavkar & Anil 2004, Orvain et al. 2003) leur permet d'éviter d'avoir à subir les irradiations très élevées en surface pendant la période estivale et surtout lorsque les périodes de basse-mer coïncident à l'heure de midi (situation observée en mortes-eaux sur les côtes du Calvados). De même les EPS liés ont une activité antibactérienne (Orvain et al 2014, Agogué et al. 2014) qui pourraient inhiber la production bactérienne et la libération d'exoenzymes bactériennes au contact direct des diatomées. L'ensemble des caractéristiques des biofilms laissent à penser que les malacovirus pourraient s'y fixer et trouver les conditions environnementales profitables à leur survie. Il est fortement probable que les conditions à la surface des vases entraînent une sélectivité forte des formes de résistances à différents polluants ou autres substances issues de la pollution urbaine ou agricole (eaux usées) tels que les antibiotiques ou pesticides. Des tests de traitement UV ont été réalisés par Leal Diego et al. (2013) et un cortège de virus gastroentériques humains (contamination fécale) a été énuméré. Ils ont observé que les contaminations virales des huîtres *Crassostrea gigas* ont tout de même lieu malgré le traitement UV. Les virus ont donc dans l'environnement estuarien des mécanismes de défense anti-UV qui peuvent notamment s'expliquer par une association intime aux microalgues benthiques au niveau de biofilms.

Les coques, *Cerastoderma edule*, dont le régime alimentaire est dominé par les microalgues benthiques remises en suspension (projet GECO-GECO), sont les mollusques avec le plus fort taux de molécules antivirales contre les herpèsvirus (Defer et al. 2009). Le projet GECO-GECO (AESN/CRBN/CG14/CG50) a aussi montré le rôle essentiel de la coque en tant qu'ingénieur d'écosystème, cet animal structurant son habitat sédimentaire, son érodabilité mais aussi les transferts trophiques du compartiment benthique vers le compartiment planctonique. Des expériences d'érodabilité en baie des Veys avaient été réalisées pour évaluer précisément l'impact bioturbateur des coques sur l'érodabilité des sédiments et du microphytobenthos (Orvain et al. 2015). Ce travail avait permis de mettre en évidence un phénomène de « jardinage écologique », les coques pouvant 1) stimuler la production primaire microphytobenthique autour de leurs terriers et 2) faciliter l'érosion des biofilms microphytobenthiques pour alimenter les juvéniles de coques. En effet, le facteur principal qui

explique les taux de croissance des juvéniles est le flux d'érosion du microphytobenthos (mais pas les biomasses chlorophylliennes du sédiment puisque cette ressource doit être remise en suspension pour être filtrée par les coques). Les coques peuvent ainsi favoriser la stabilité sédimentaire en facilitant l'envasement local et donc l'extension des zones sablo-vaseuses favorables à l'implantation de nouvelles populations. Les biofilms pouvant être très riches en herpès-virus (comme vu précédemment), les coques qui les consomment sont directement contaminées, mais ont développé des mécanismes de défense antiviraux. Les huîtres consomment également à hauteur de 50% les microalgues des biofilms benthiques après érosion (Lefebvre et al. 2009). En baie des Veys, les performances biologiques des coques sont exceptionnelles (Projet GECCO-GECCO), mais des mortalités de masse de coque peuvent aussi être observées chez les adultes comme cela avait été observé en été 2012. Les pathogènes peuvent participer à des mortalités de masse de la coque *Cerastoderma edule* mais de nombreux facteurs de stress peuvent interagir pour expliquer ces phénomènes et les agents viraux n'ont jamais été identifiés comme seul vecteur de mortalité de masse chez cette espèce (Burdon et al. 2014). La coque est le mollusque qui montre les activités antivirales les plus élevées dans leur hémolymphe (Defer et al. 2009). Néanmoins, étant donné les niveaux d'interactions trophiques entre les 2 mollusques bivalves principaux de la baie des Beys (Ubertini et al. 2012), il est fortement probable que des sauts inter-espèces aient lieu en termes de transferts de virus ou des rôles de réservoir. Par son action positive stimulant le développement de biofilm, les contaminations potentielles de coque par les herpès virus pourraient ensuite s'accumuler au niveau des biodepôts de coques. Les biofilms environnant les terriers de coque sont donc potentiellement des réservoirs sédimentaires riches en Herpès Virus. Pendant ce projet, on cherchera à identifier l'ensemble des schémas d'interactions présumés en vérifiant un ensemble d'hypothèse pendant ce projet de thèse (Figure 1).

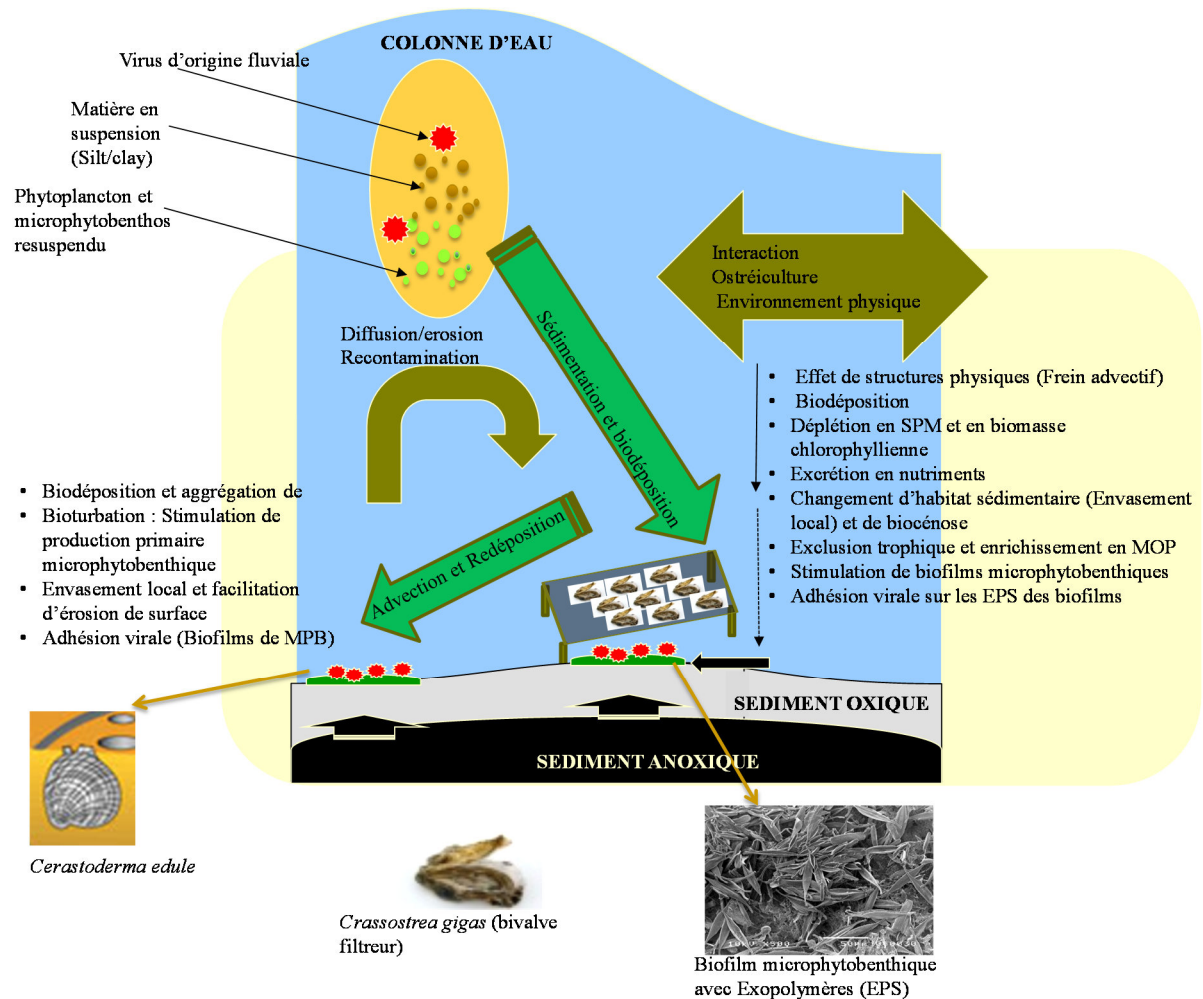


Figure 1 : Schéma des interactions entre bivalve filtreurs, biodéposition, biofilms microphytobenthiques et adhésion des Virus

Ce projet s'inscrit aussi dans la thématique de l'étude de l'impact du réchauffement global sur le fonctionnement des écosystèmes côtiers. Les alternances des régimes hydroclimatiques qui régissent le fonctionnement des écosystèmes côtiers sont conditionnées par des cycles décennaux (NAO⁻, NAO⁺, blocage Atlantique, blocage Européen dans Cassou, 2004 ; figure 2). Les prédictions par les climatologues impliquent une altération du climat nord-européen et un renforcement des évènements NAO⁺ caractérisés par des années avec des hivers à tendance pluvieuse et à vent d'ouest, stimulant la production primaire phytoplanctonique et microphytobenthique. Dans ce contexte, il apparaît très clair que les phénomènes d'érosion sédimentaire des bassins versants, des fleuves côtiers et au sein des habitats sédimentaires estuariens seront renforcés et donc que les risques de contamination par les agents pathogènes seront plus prononcés de même que l'émergence de nouvelles formes de résistance. En baie des Veys, les processus d'érosion fluviale sont stimulés en année NAO⁺ par l'impact des précipitations alors que les érosions des sédiments marins côtiers et le transit sédimentaire sont plus affectés par les vents de nord-est qui dominent pendant les années NAO⁻.

L'étude du réchauffement global sur le fonctionnement des écosystèmes côtiers consiste à mieux comprendre le rôle de l'érosion sur les performances biologiques des organismes

marins en intégrant l'ensemble des perturbations environnementales concernées. En dehors de l'effet direct des températures, le changement global intègre une série de stress anthropologiques incluant les risques d'eutrophisation plus marqués, les invasions biologiques, l'intrusion marine dans les estuaires et des perturbations métaboliques majeures des organismes marins (Rabalais et al. 2010). Les changements climatiques actuels qui provoquent l'accélération de phénomènes extrêmes s'accompagnent d'effets écologiques en cascades et de risques épidémiologiques plus prononcées suite notamment à des blooms phytoplanctoniques accentués (Rabalais et al. 2010, Kratina et al. 2012). Les milieux estuariens sont particulièrement sensibles à des effets de crue amplifiées après érosion continentales et fluviale entraînant l'amplification des blooms phytoplanctoniques et microphytobenthiques par des effets d'eutrophisation. Les 2 compartiments viriobenthiques et virioplanctoniques sont positivement associées le long de gradients d'eutrophisation dans les estuaires (Hewson & Fuhrman 2003, Danovaro et al. 2011) et on peut donc supposer que le changement climatique puisse accentuer encore les risques de contaminations virales dans les estuaires, surtout en année NAO⁺. A l'inverse, les risques de sécheresse estivale les autres années s'accompagnent d'une salinisation des eaux des estuaires de plus en plus marquée faisant remonter le front halin en amont du gradient estuarien actuel, la position de fronts halins étant le facteur le plus important pour expliquer la résilience des communautés virales. L'ensemble des communautés microbiologiques des estuaires et les processus biogéochimiques les régissant seront perturbés à grande échelle.

Depuis les années 1970, les épizooties, les mortalités de masse, les proliférations d'algues se sont précipitées à un rythme qui ne connaît aucun précédent au cours de notre histoire à cause du changement global climatique avec une hausse globale des températures estivales et des régimes de précipitations en hiver. Le rôle des vents contribue aussi à accentuer les phénomènes d'érosion des biofilms microphytobenthiques et des sédiments côtiers (de Jonge & Von Beukesom, 1995). Le rôle de l'érosion par les crues hivernales est essentiel à considérer car c'est le vecteur qui libère des stocks de nutriments en provenance des bassins versants et des réservoirs dans le sédiment estuarien ou fluvial après érosion. L'aquaculture est particulièrement vulnérable et en France la conchyliculture est la plus importante de ces cultures marines. Cependant, cette industrie basée sur l'exploitation de l'huître pacifique *Crassostrea gigas* connaît depuis 2008, la crise la plus sérieuse depuis l'introduction de cette espèce au début des années 70, pour remplacer l'huître native *Ostrea edulis* en grande partie décimée par une autre crise équivalente à la fin des années 60. Des mortalités massives de naissain ont eu lieu sur l'ensemble du littoral français et elles sont très probablement associées à l'apparition d'un nouveau génotype particulier de l'herpès-virus ostréidé (OsHV-1 μ var) apparu en 2008 (Martenot et al. 2013) ainsi que de plusieurs espèces du genre *Vibrio* très clairement impliquées dans les mortalités des naissains (Segarra et al. 2008, Sauvage et al. 2009, Renault et al 2014). Il est important d'avoir une compréhension globale des facteurs épidémiologiques qui contribuent à l'apparition de la maladie, et de sa transmission dans l'environnement aquatique, afin de prévenir les nouvelles épizooties qui pourraient arriver dans un futur proche (Harvell et al. 1999), et d'autres risques et vulnérabilités concernant la qualité de l'eau et le développement de virus pathogènes de la malacofaune. Les revues sur le changement global montrent comment le réchauffement global et toute la cascade d'évènements climatiques associée à ce facteur

prévoient de nombreuses perturbations climatiques sur le nord-ouest européen (figure 2). L'un des effets les plus manifestes se traduit par une augmentation des phénomènes d'érosion impliquant une forte perturbation de la diversité microbienne et de l'ensemble des protistes (organisme eucaryote unicellulaire dont le phytoplancton) se traduisant par une explosion de la biomasse de certaines espèces de microalgues très prolifiques (Bruno et al. 2003, Hoegh-Guldberg & Bruno 2010) et souvent opportunistes par rapport aux sources d'azote (ammonium, nitrates). Ces revues soulignent l'importance des virulences potentielles de pathogènes parmi les taxons marins dans ce contexte de perturbation climatique de grande envergure. Si le rôle des biofilms benthiques en tant que réservoir sédimentaire très sélectif pour les microorganismes pathogènes est avéré, ce facteur peut être responsable de l'émergence de risques supplémentaires à prendre en compte dans la compréhension générale de la réponse des écosystèmes côtiers aux perturbations climatiques.

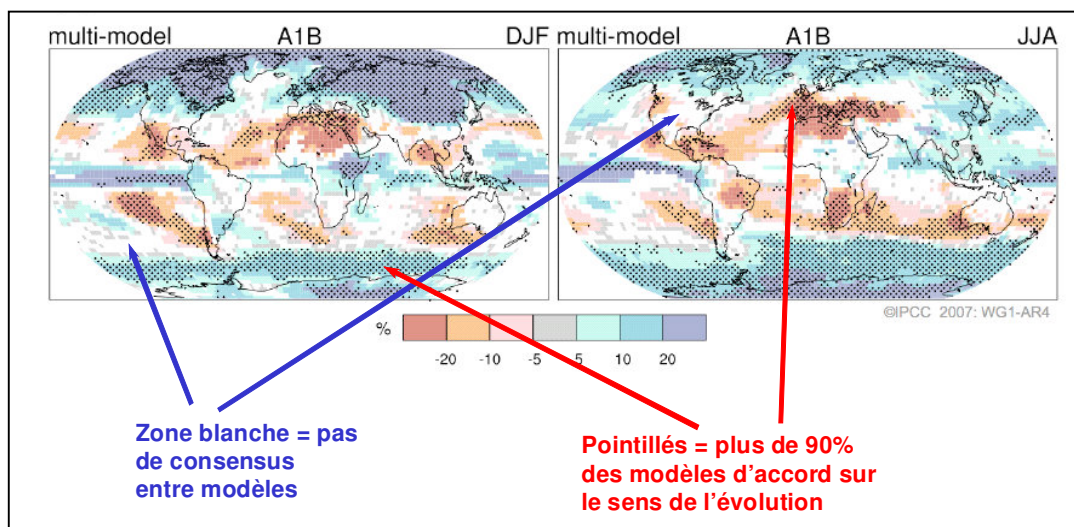


Figure 2 : Schéma récapitulatif des conséquences du réchauffement climatique sur les perturbations des régimes de précipitation à l'échelle mondiale en synthétisant les simulations de tous les modèles climatiques qui existent (en hiver à gauche et en été à droite). Les zones blanches correspondent à des zones où les modèles ne sont pas en accord sur le sens de l'évolution du régime de précipitation (les zones colorées sont celles où il y a consensus entre les modèles pouvant aller jusqu'à plus de 90% pour les zones en pointillé comme en atlantique nord). Les zones en bleu correspondent à des zones où les risques d'augmentation des précipitations sont amplifiés (rapport IPCC).

Comme illustration de ce type d'interaction climat-érosion-pathogène, on peut souligner le cas des épidémies de choléra transmises par l'espèce *Vibrio cholerae* dont une explosion a lieu tous les 4-5 ans lors des années El Nino dans l'hémisphère sud quand les conditions climatiques favorisent une explosion des organismes phytoplanctoniques à cause d'une érosion fluviale accentuée pendant ces années particulières impliquant des précipitations accentuées en Argentine (Seeligmann et al., 2008). Pendant ces épisodes, le vecteur de transmission de ce pathogène est une microalgue benthique après érosion. Elle appartient à l'espèce *Nitzschia palea* associée aux eaux douces et transmises après érosion des sédiments fluviaux. Ce genre *Nitzschia* est également très abondant dans les biofilms microphytobenthiques notamment présent à la surface des biodépôts sous les parcs à huîtres Baie des Veys (Ubertini et al. 2012). Il est nécessaire de mieux connaître les biofilms microphytobenthiques et leur érodabilité dans

les écosystèmes conchylicoles bas-normands et leur rôle potentiel en tant que réservoir et vecteur de transmission épidémiologique des virus mais aussi des bactéries pathogènes.

II. Etudes pilotes (VIAPSE 2014)

Depuis 2008, les surmortalités de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, associées au virus OsHV-1, sont importantes sur les parcs ostréicoles bas-normands. Lors de ces épisodes de mortalités, le transfert d'animaux infectés entre les bassins ostréicoles paraît être une des causes de la propagation du virus entre les parcs ostréicoles, sans exclure également la propagation entre parcs avoisinants par le milieu. Les animaux semblent être eux-mêmes le réservoir de virus. Cependant, des spécimens « sentinelles » introduits sur un parc ostréicole à proximité des zones estuariennes sont rapidement infectés, sans qu'il soit possible de discerner la source d'infection entre les huîtres déjà présentes et d'autres « réservoirs » environnementaux. Pour l'instant, les études scientifiques n'ont jamais permis d'identifier des « réservoirs à virus » environnementaux. Lors du programme VIAPSE (CRH 2014), des éléments de réponse ont pu être apportés sur la diffusion du virus, telle que la propagation du virus liée aux facteurs biotiques (comme la mise en réserve et la reproduction) et abiotiques (température, pratiques zootechniques, milieu...). Sur cette base, ce nouveau projet a pour objectifs d'approfondir et/ou confirmer les résultats obtenus au cours du programme VIAPSE (CRH 2014) pour évaluer les processus de transferts viral entre le compartiment sédimentaire estuarien et les stocks d'huîtres.

Ainsi dans le programme VIAPSE, en 2014, des prélèvements de biofilms et de sédiments à proximité ou dans des parcs ostréicoles ont été réalisés dans le but d'étudier leur capacité à être un réservoir environnemental du virus OsHV-1. Les prélèvements sont réalisés tous les 2 mois hors période à risque et tous les mois durant la période à risque (période estivale) sur 3 points précis (A, B et C) en Baie des Veys.

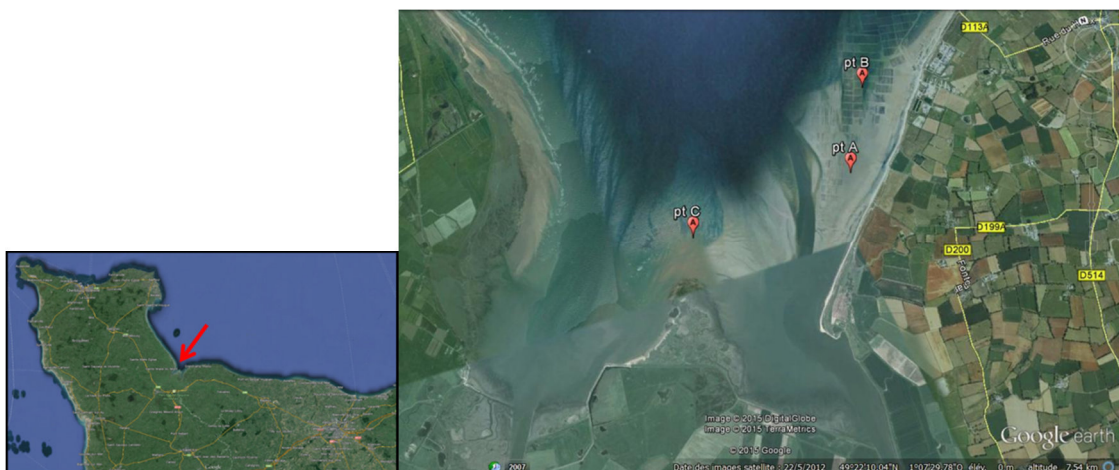


Figure 3 : Cartographie des points de prélèvements en Baie de Veys (A : pointe sud des parcs de Gêfosse, B : dans les parcs de Gêfosse, C : Pointe de Brévands).

Le point A (figure 3) est situé sur une zone Sud de dépôt sédimentaire issu des parcs ostréicoles de Gêfosse-Fontenay, le point B au niveau de la zone Nord des parcs de Gêfosse et le point C sur la pointe de Brévands, de l'autre côté du chenal et plus éloigné de la zone des parcs.

A chaque date, 3 prélèvements de biofilm et 3 de sédiments sont réalisés aux trois points sélectionnés. Le biofilm est prélevé en déposant une toile à bluter de maille 100 μm d'une taille de 7 cm x 7 cm sur le biofilm et ensuite retirée délicatement après 30 min pour ensuite transférer le biofilm dans de l'eau de mer stérile. Pour le sédiment, une carotte d'environ 20 cm de diamètre et d'une épaisseur de 1 cm est prélevée pour chaque réplikat. La charge virale contenue dans ces prélèvements est ensuite analysée à l'aide d'un kit d'extraction spécialement conçu pour le sédiment (NucleoSpin Soil, Macherey-Nagel®, Lloyd et al. 2010).

A 9 dates de prélèvements (hors et pendant l'épizootie), le sédiment et le biofilm ont été échantillonnés en triplicats et les charges virales ont été mesurées et rapportées en unité de surface (m^2) (figure 4).

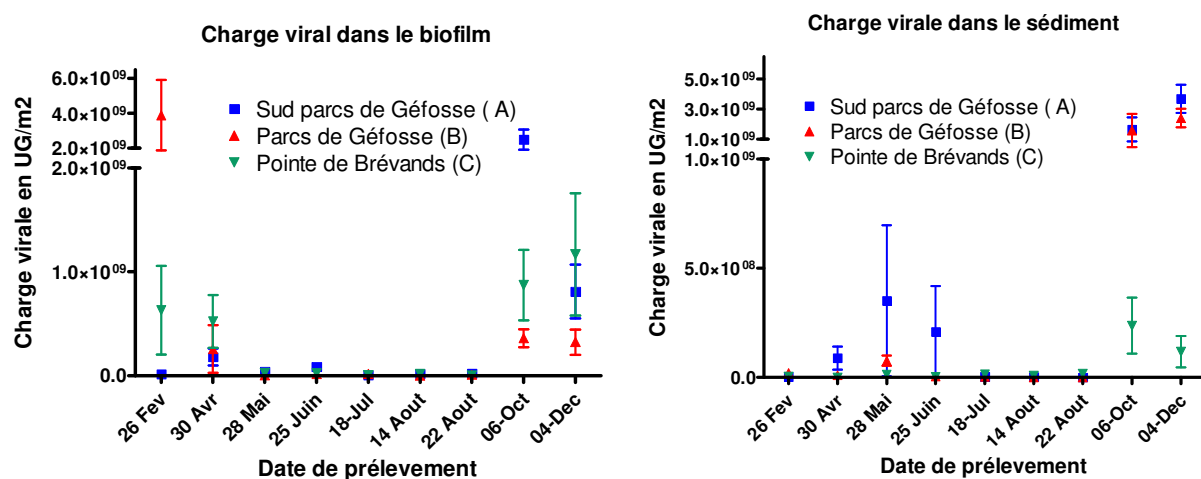


Figure 4 : Charges virales mesurées et rapportées par m^2 de surface dans le sédiment et le biofilm dans le Sud des parcs de Gêfosse (A), dans les parcs de Gêfosse (B) et sur la Pointe de Brévands (C) à 9 dates en 2014.

Dans le biofilm, les charges virales retrouvées sont toujours supérieures à 1.10^6 UG/ m^2 , cependant plus faibles en période estivale (Juin à Août) (10^6 à 10^7 UG/ m^2) qu'en hiver (février 2014 et octobre – décembre 2014) (10^7 à 10^9 UG/ m^2), et cela pour les 3 points. De manière surprenante, on constate l'absence ou une très faible charge de particules au mois d'août sur les parcs de Gêfosse au Sud des parcs. Une charge plus importante sur la Pointe de Brévands a été observée en hiver, au point le plus distant des parcs à huître, où les développements de biofilms microphytobenthiques et les populations de coques sont les plus élevés en Baie des Veys (Orvain et al. 2012, Ubertini et al. 2012).

Concernant les prélèvements de sédiment, les charges virales sont plus faibles que dans le biofilm durant les 3 premiers mois de l'année 2014 avec des charges jusqu'à 10^6 UG/m². Ces charges virales augmentent ensuite à des valeurs de 10^6 à 10^9 UG/m² (hormis sur la Pointe de Brévands) entre avril et juin, correspondant à la période de mortalité survenue fin juin 2014. Tout comme pour le biofilm, les charges sont quasi nulles jusque fin août (point A et B). En automne, on observe des charges supérieures à 10^9 UG/m² sur les parcs et au sud des Parcs, et plus faibles à Brévands, contrairement au biofilm. Les charges virales contenues dans le sédiment et le biofilm sont beaucoup plus importantes que celles retrouvées dans les espèces vivant aux alentours des parcs ostréicoles et ce compartiment pourrait être un potentiel « réservoir environnemental » du virus OsHV-1. Les charges virales contenues dans le sédiment et le biofilm sont beaucoup plus importantes que celles retrouvées dans les espèces vivantes aux alentours des parcs ostréicoles et le compartiment microphytobenthique pourrait être un potentiel « réservoir environnemental » du virus OsHV-1. Les charges virales contenues dans le biofilm, ainsi que dans le sédiment sont moins importantes durant la période estivale, l'hypothèse émise pour ce phénomène serait l'action des UV et celle de la température sur l'activité métabolique des consommateurs, plus fortes en été, et qui participerait à détruire les particules virales présentes à la surface du biofilm. L'implication du sédiment et du biofilm en tant que réservoir peut être argumenté également par des charges très importantes hors période d'épizootie, mais aussi par l'observation d'une augmentation de charges juste avant le début des épizooties.

Si le lien entre le virus et les mortalités est établi, le mode de diffusion du virus dans l'environnement reste méconnu. Des expériences en érodimétrie de laboratoire laissent suggérer un rôle majeur des courants et de l'érosion dans le transfert des sédiments vers la colonne d'eau. Le programme CRH 2014 VIAPSE a pu apporter différents éléments de réponse sur la diffusion de l'OsHV-1, comme la dynamique du virus dans le compartiment eau de mer, mais aussi du compartiment benthique et plus précisément le rôle du sédiment et/ou des microorganismes au sein des biofilms à l'interface eau/sédiment. Mais ces résultats préliminaires nécessitent d'être approfondis, en particulier sur l'évolution du virus dans le sédiment et dans le biofilm associé.

Sur ce constat, l'objectif de ce projet (thèse et projet associé) est de renforcer et d'apporter de nouveaux éléments sur cette propagation des virus dans l'environnement estuarien. L'outil d'érodimétrie, couplé aux expérimentations de pathologie s'est révélé un outil précieux pour cette analyse de diffusion du virus. Il est proposé également d'approfondir les résultats précédents sur la propagation du virus, en incluant l'impact des adultes et juvéniles infectés ne subissant aucune mortalité. Ces animaux pourraient être considérés comme un potentiel « réservoir » du virus pouvant déclencher la virose lorsque les conditions favorables sont réunies (comme la température de l'eau, ou un affaiblissement physiologique important). Ce transfert peut également se faire via leurs biodépôts, supports d'une production primaire microphytobenthique qui est particulièrement stimulée dans ces habitats (Orvain et al. 2012). Les virus libres dans l'eau ont peu de chance de contaminer leurs hôtes bivalves mais l'infection par une voie trophique (phytoplancton, microphytobenthos en suspension) est sans aucun doute un vecteur direct de contamination en étant directement acheminé dans la glande digestive.

1) Objectifs de la thèse

La problématique de cette thèse est d'étudier les agents pathogènes impliqués dans les mortalités estivales de bivalves en cherchant à détecter la présence de virus à la fois, dans les tissus des bivalves, au sein de la matrice sédimentaire et à la surface des biofilms de biodépôts. L'idée est de coupler les études fines des interactions entre habitats sédimentaire, biofilm microphytobenthiques et l'érosion des microorganismes (Figure 1) comme cela a déjà été réalisé avec succès lors de l'ANR VASIREMI (2007-2011, numéro spécial dans Journal of Sea Research en 2014). Nous chercherons à :

VOLET A

- Identifier le rôle des biofilms microphytobenthiques et leur érosion en tant que vecteur de transmission des pathogènes responsables de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* (*μvar OSHV1* et *Vibrio sp.*)
- Mettre en évidence le rôle des biofilms microphytobenthiques et des ExoPolymères qu'elles sécrètent en tant que réservoirs de pathogènes et vecteurs épidémiologiques ciblés pour les virus (Malacovirus et entérovirus) dans un écosystème conchylicole en Baie des Veys

VOLET B

- Comprendre le rôle des facteurs liés au réchauffement climatiques sur les risques de transmission épidémiologique entre biofilms, virus et bivalves (huîtres et coques) : température, nutriments azotés, salinité (conditions type NAO⁺ en laboratoire) et forçage physique (taux d'érosion).

VOLET C

- Comprendre les interactions hôtes (mollusques bivalves) – Virus – biofilm le long d'un gradient environnemental dans l'estuaire de la Baie des Veys

2) Méthodologie et partenariat

VOLET A (1^{ère} année in situ 2015/2016): Rôle des biofilms microphytobenthiques , des EPS et de l'érosion en tant que vecteur de transmission et de résistance des agents pathogènes (*Os-Herpes virus 1 μvar* et *Vibrio spp.*)

Partenariat : Université de Caen Basse-Normandie UMR BOREA, UMR 6023 « Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement », IFREMER LERN, LABEO14, CRH

Des études pilotes (Projet « Centre de Référence de l'Huître » et ANR-GIGASSAT) ont déjà été effectuées sur les biodépôts d'huîtres contaminés sous les parcs et ont mis en évidence le rôle des sédiments en tant que vecteurs de transmission avec une méthodologie opérationnelle. A l'interface eau-sédiment, les biofilms microphytobenthiques jouent un rôle majeur en tant que réservoir hivernal et vecteur de transmission des virus pathogènes (figure 4, résultats 2014 à publier).

De plus en plus, les bactéries du Genre *Vibrio* sont décrites pour intervenir pendant les épizooties virales mais aussi les mortalités estivales plus classiques qui affectent les huîtres adultes depuis plusieurs décennies. En 2015, des analyses bactériennes seront réalisées sur les mêmes prélèvements, le but étant de visualiser la dynamique des bactéries du genre *Vibrio* et plus particulièrement *Vibrio aestuarianus*, qui pourrait être responsable de surmortalités chez les huîtres adultes. Des cultures des bactéries issues des prélèvements permettront aussi de détecter d'éventuelles bactéries opportunistes qui pourraient augmenter l'effet de ces mortalités (partenariat LABEO14).

Les résultats de 2014, obtenus sur un seul cycle annuel devront être confirmés et approfondis en 2015 en suivant en parallèle les charges virales des huîtres à proximité pour mieux comprendre les échanges et les interactions virus-hôte-environnement. Dans le suivi envisagé pour cette thèse, des prélèvements seront de nouveau effectués avec une augmentation de l'effort d'échantillonnage (2 prélèvements par mois au lieu d'un seul), la charge virale dans les huîtres adultes, juvéniles et naissains déposées au point B sera également suivie et la productivité du biofilm (aux 3 points) sera mesurée. En 2016, nous augmenterons également l'effort d'échantillonnage avec la détection des virus dans les coques *Cerastoderma edule*.

Les recherches du CRH (Centre de Référence de l'Huître, Région Basse-Normandie) permettent de quantifier maintenant en routine par des techniques de biologie moléculaire (qPCR : PCR quantitative) la présence de l'ADN viral OS-Hv1 et son variant μ var. Nous évaluerons les possibilités de compléter les analyses par des injections d'huîtres de matériaux testés (avec suivis de mortalité pendant 10 jours) qui sont de biens meilleurs indices de la virulence active que les simples mesures d'ADN viral. Des techniques d'isolation de l'ADN et ARN des microorganismes à partir d'échantillons de sédiments ont été optimisés dans le commerce en utilisant le kit « PowerSoil® DNA Isolation » qui permet d'obtenir d'excellents résultats (Lloyd et al. 2010).

Nous allons développer une stratégie d'échantillonnage pour détecter la présence des agents pathogènes impliqués dans les mortalités des naissains au sein des sédiments au niveau des parcs à huître et dans les habitats sédimentaires adjacents. Nous ferons une recherche très spécifique de l'ensemble du cortège d'espèces de microalgues benthiques et de leurs EPS pour identifier les associations entre virus, *Vibrio* et microalgues benthiques (étude en microscopie avec des marqueurs des bactéries *Vibrio* de type anticorps monoclonal couplé à des techniques d'immunofluorescence). En effet, les bactéries du genre *Vibrio* adhèrent aux microalgues car ces dernières sécrètent des Exsudats Polymériques à nature adhésive (EPS). Il reste à mieux caractériser la nature précise de ces interactions en examinant par exemple le rôle des exopolymères (EPS) sécrétés par les microalgues microphytobenthiques et l'adhésion des particules virales et des bactéries pathogènes.

De plus, nous soumettrons les échantillons de sédiment à un forçage hydrodynamique contrôlé de manière précise en utilisant l'érodimètre dont nous disposons à Caen (Dupuy et al. 2014, Ubertini et al. in press). Nous quantifierons ainsi l'érosion séquentielle de ces microorganismes (voir méthodologie développée dans Mallet et al. 2014) pour identifier le forçage érosif qu'il faut appliquer pour libérer les agents pathogènes dans l'eau et nous rechercherons spécifiquement leurs associations aux microalgues benthiques susceptibles de les porter (en tant que vecteurs de transmission). Les analyses microscopiques permettront de détecter la présence des agents pathogènes marquées et associées à la biodiversité des microalgues benthiques érodées. Pour cela, nous appliquerons une méthodologie (érodimétrie) déjà attestée et validée sur d'autres vasières intertidales en baie de Marennes-Oléron (Dupuy et al, 2014, Mallet et al. 2014). Cette dernière étude était la première permettant notamment de quantifier l'érosion séquentielle des virus issus des sédiments. Tous les échantillons que nous prélèverons seront analysés en qPCR pour rechercher la présence du virus (Os-HV1 μ var). Les implications sont importantes car il s'agit d'estimer très précisément le forçage érosif (tension

de frottement) nécessaire à appliquer pour éroder les pathogènes et donc de les rendre disponibles dans l'eau en tant que vecteurs de transmission de la maladie.

Un suivi temporel approfondi à basse-fréquence (à échelle mensuelle) sera couplé à 2 suivis à haute-fréquence (à échelle journalière pendant 14 jours d'un cycle mortes-eaux/vives-eaux à 2 périodes : avant une crise de surmortalité en hiver/printemps et pendant une crise de surmortalité en printemps/été sur un site à forte vulnérabilité sous les parcs à huîtres en Basse-Normandie pour coupler 1) les taux d'érosion du sédiment, du biofilm microalgal et 2) le stock de pathogènes dans les compartiments biofilms- huitres adultes – naissain d'huîtres).

Pour mieux comprendre les interactions fines à une échelle cellulaire, l'évolution de la structure des communautés et le devenir des pathogènes seront suivis en fonction des cycles d'érosion et dépôt par une approche DGGE sur ADN et ARN, structure des populations (typage moléculaire). La communauté bactérienne sera également suivie par une approche microscopie confocale/FISH avec des sondes spécifiques de certains phylums et en utilisant des marqueurs bactériens de type lectine fluorescente des EPS pour mieux comprendre les associations cellulaires été diatomées et procaryotes. Des travaux en microscopie confocale développée à Caen sur les biofilms microphytobenthiques peuvent permettre de comprendre l'association très fine et les interactions cellulaires entre diatomées microphytobenthiques, leurs différents types d'exsudat (EPS colloïdales et EPS liées, voir Orvain et al. 2014, Pierre et al. 2012, 2014) et les agents pathogènes associés.

L'ensemble de la diversité bactérienne, la structure de communauté microbienne seront mesurée par des approches qPCR-DGGE. Dans ce volet, une analyse complète de la structure des communautés bactériennes et microalgales sera faite afin de voir les éventuelles interactions avec les pathogènes. Peut-être que certaines populations favorisent ou au contraire inhibent le développement, et la transmission des pathogènes. En cytométrie de flux, nous évaluerons également les proportions de cellules vivantes/mortes.

VOLET B (2^{ème} année en laboratoire - 2017): Impact des effets amplifiés de crues hivernales (type NAO⁺) dans le développement des agents pathogènes au sein des biofilms microphytobenthiques et leur transmission à la malacofaune.

Partenariat : Université de Caen Basse-Normandie UMR BOREA, UMR 6023 « Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement », IFREMER LERN, LABEO14, CRH

L'année 2008 qui était une année NAO⁺ montrait un contexte hydroclimatique favorable à l'érosion avec un hiver très pluvieux et un printemps précoce. Les contaminations virales des bivalves sont toujours plus élevées suite à des épisodes de fortes précipitations (Lees 2000). Il serait intéressant de tester l'hypothèse que les épisodes à forte érosion sont des épisodes favorables à une contamination virale, voire même à l'émergence de nouvelles formes de résistance des pathogènes, qui se seraient développées au sein des biofilms microphytobenthiques. Les biofilms de microalgues benthiques qui recouvrent les biodépôts d'huîtres sont des microhabitats très sélectifs qui joueraient un rôle important en tant que réservoirs de pathogènes. Nous testerons plusieurs facteurs relatifs à des modifications de l'environnement estuarien intertidal pour mieux identifier les combinaisons de facteurs provoquant le plus de risques épidémiologiques (virus et bactéries pathogènes) dans les biofilms ou transfert à la malacofaune après érosion.

Dans les plans expérimentaux de culture de biofilm et élevage des mollusques (huître et coques), nous quantifierons les virus μ var-OSHV1 et *Vibrio spp.*, lors de cultures à partir de prélèvement de sédiments sous les parcs à huîtres en baie des Veys qui seront ensuite cultivés dans les mésocosmes tidaux. L'évolution de la structure des communautés et de devenir des pathogènes sera suivie par une approche DGGE sur ADN et ARN. Les échantillons intéressants pourront être séquencés (pyroséquençage). La communauté bactérienne sera également suivie par une approche microscopie confocale/FISH avec des sondes spécifiques de certains phylums

et en utilisant des marqueurs bactériens de type lectine fluorescente des EPS pour mieux comprendre les associations cellulaires entre diatomées et procaryotes. Des travaux en microscopie confocale développés à Caen sur les biofilms microphytobenthiques peuvent permettre de comprendre l'association très fine et les interactions cellulaires entre diatomées microphytobenthiques, leurs différents types d'exsudat (EPS colloïdales et EPS liées, voir Orvain et al. 2014, Pierre et al. 2012, 2014).

Nous comparerons l'évolution de la communauté bactérienne pour l'ensemble des combinaisons de facteurs testés (salinité, charge nutritive, température). Lors de ces expériences en laboratoire, nous étudierons la résistance à long terme des virus et autres pathogènes dans les Exopolymères sécrétés par les diatomées benthiques. En effet, nous avons clairement identifié lors de l'ANR VASIREMI le rôle majeur des EPS pour réguler la production bactérienne, certains EPS (dits liés) agissant comme inhibiteurs (Agogué et al. 2014) pendant les périodes d'exposition (marée basse diurne) alors que d'autres EPS (dites colloïdales) agissent positivement à marée haute nocturne sur la croissance bactérienne. Les productions bactériennes sont donc positivement liées à la production microphytobenthique à basse-fréquence (mensuelle et saisonnière) mais sur un mode alternatif à haute fréquence (corrélation négative à échelle horaire), les périodes productives pour le microphytobenthos étant les expositions tidales de marée basses diurnes, alors que les périodes productives pour les bactéries étant les phases de marée haute (à l'obscurité).

Nous chercherons ensuite à savoir si des huîtres contaminés dans le système peuvent transmettre le virus aux biofilms cultivés via leurs biodépôts et à l'inverse si des biofilms contaminés en virus peuvent contaminer des huîtres après érosion (par tests d'érodimétrie et balnéation des huîtres dans l'eau de l'érodimètre pendant plusieurs jours). Pour réaliser ces cultures de biofilms microphytobenthiques, nous testerons tous les croisements d'interactions possibles entre les facteurs : température (10-20°C), charges nutritives (taux normal, excès de source azotée typique d'une année NAO⁺ suite à de fortes précipitations) et salinité (eau de mer et tests d'apport d'eau douce régulier). Les carottes élevées dans les systèmes expérimentaux en testant les différentes conditions seront finalement transférées dans l'érodimètre pour tester l'impact des courants érosifs sur le transfert épidémiologique par des tests de mortalités à partir de l'eau de l'érodimètre pour tester les risques d'infection aux mollusques bivalves (huîtres, coques) par des tests d'injection directe et de balnéation (l'eau de l'érodimètre sera utilisée pour élevage des bivalves pendant plusieurs jours).

Nous utiliserons l'érodimètre ainsi que d'autres systèmes d'expérimentations déjà existant (mésocosme tidal/photopériode, système d'alimentation des huîtres) pour suivre l'évolution de la communauté microbienne totale dans l'eau et les risques pathogènes en testant 3 conditions : témoin sans érosion (courant très faible non érosif) et 2 tests simulant une érosion chronique (forçage érosif modéré de type forçage par une marée normale avec érosion du biofilm uniquement) et érosion de masse (type tempête entraînant une érosion en masse du sédiment).

VOLET C (Suivi *in situ* en 2^{ème} année et fin des analyses en 3^{ème} année : 2017-2018): Tests d'ostréiculture sur des zones éloignées des zones estuariennes et recherche des interactions interspécifiques bivalves-biofilm le long du gradient estuarien

Partenariat : Université de Caen Basse-Normandie UMR BOREA, UMR 6023 « Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement », IFREMER LERN, LABEO14, CRH

Les troubles socioéconomiques causés avec 40% de perte de la production d'huître chez les ostréiculteurs sont considérables ainsi que pour l'ensemble des collectivités et des autorités publiques concernées. En réponse à ce problème, il est essentiel de développer une étude intégrée et un programme de recherche participatif impliquant les acteurs de l'ostréiculture en

se focalisant sur les aspects environnementaux et socioéconomiques perturbés par le changement climatique global dans les zones estuariennes.

Une étude de la variabilité spatiale sera réalisée à grande échelle écosystémique et l'érodimètre sera déployé en été en Baie des Veys dans la zone des parcs ostréicoles et dans le périmètre de la zone estuarienne en remontant la Vire. Il sera pertinent de prélever des échantillons de sédiment et de tester le rôle des sédiments en tant que vecteur de transmission (dans les sédiments et après érosion) le long du gradient estuarien intégrant les parcs ostréicoles. Un plan d'échantillonnage à grande échelle sera effectué pour coupler des méthodes d'érodimétrie des sédiments et performances biologiques des bivalves. Les résultats seront des transects de contamination dans les sédiments, les biofilms, dans le matériel érodé et les bivalves présents sur le site. Ce type d'analyse permettra de déterminer le rôle de l'érosion en tant que vecteur de transmission de la maladie.

Lors de ce dernier volet de ce projet de thèse, nous chercherons à évaluer le rôle de l'érosion en tant que vecteur de la maladie déjà présente et les interactions (transfert) biofilms-bivalves le long d'un gradient estuarien et en s'éloignant des parcs ostréicoles. Nous testerons la présence de pathogènes viraux et bactériens dans les huîtres dans 2 stations : une dans les parcs ostréicoles de Gêfosses-Grandcamp et une deuxième dans une station éloignée de la zone ostréicole à Utah Beach en suivant les mortalités, croissance et contamination par les pathogènes lors d'un suivi annuel.

En parallèle, nous testerons plusieurs couples de stations / espèces en fonction de la dominance des espèces observées le long d'un gradient estuarien des zones les plus proches de l'embouchure jusqu'au domaine marin ouvert avec plusieurs espèces suivies en respectant ce gradient : *Mya arenaria*, *Scrobicularia plana*, *Macoma balthica*, *Cerastoderma edule*, *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis*. Nous chercherons à identifier les contaminations interspécifiques (entre les différentes espèces de bivalve) ainsi que les biofilms les environnant directement. Des expériences d'érodimétrie seront réalisées *in situ* à une saison pour mieux identifier le rôle des facteurs physiques et de l'érosion dans le transfert des agents infectieux.

Nous mesurerons l'ensemble du cortège bactérien et viral en qPCR et DGGE dans 3 compartiments sur les 6 stations le long du gradient estuarien/halin : bivalve, sédiment et biofilm (épipélique, épipsammique ou épilithique selon la position de la station dans l'estuaire et le type de biofilm trouvé sur la station).

Nous mesurerons aux 4 saisons et quantifierons les concentrations des bactéries/virus que l'on peut identifier en commun dans les biofilms et les bivalves pour mieux identifier les transferts existant entre biofilm et bivalves et leurs interactions. La structure des communautés microbiennes dont les agents pathogènes sera suivie par une approche DGGE sur ADN et ARN. Les échantillons intéressants pourront être séquencés (pyroséquençage). Un effort particulier sera appliqué pour identifier les pathogènes trouvés parmi l'ensemble des communautés microbiologiques (malacovirus et virus gastroentériques humain), ainsi que les bactéries pathogènes (*Vibrio sp.*, *Escherichia coli*...) par des analyses en qPCR et culture de bactéries.

Si nous identifions un rôle important des biofilms et de leur érosion, nous évaluerons les possibilités d'éloigner les structures conchylicoles des zones sujettes à l'érosion en augmentant la distance au fond et des zones estuariennes (le long d'un gradient). Les sites mytilicoles d'Utah Beach pourraient être des sites d'accueil intéressants pour un transfert des structures ostréicoles car ce sont des zones relativement éloignées des zones à risques en termes d'érosion et moins soumises à l'influence des eaux douces en provenance essentiellement de la Vire en Baie des Veys. Des tests de culture d'huîtres seront réalisés sur cette zone a priori moins contaminée avec une quantification de virus μ var-OsHV1, des suivis de croissance, de survie et une quantification des performances individuelles et des contaminations (virales et bactériennes).

3) Bibliographie

- Agogué, H., Mallet, C., Orvain, F., De Crignis, M., Mornet, F., Dupuy, C. (2014) Bacterial Dynamics in a Microphytobenthic Biofilm: a Tidal Mesocosm Approach, *Journal of Sea Research* 92, ISSN 1385-1101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2014.03.003>
- Bruno, J.F., Petes, L.E., Harvell, C.D., Hettinger, A. (2003). Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters* 6 (12), 1056-1061.
- Baird, M.E., Walker, S.J., Wallace, B.B., Webster I.T., Parslow J.S. (2003). The use of mechanistic descriptions of algal growth and zooplankton grazing in an estuarine eutrophication model. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 56, 685-695
- Burdon D., Callaway R., Elliott M., Smith T., Wither A. (2014). Mass mortalities in bivalve populations: A review of the edible cockle *Cerastoderma edule*. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 150, 271-280.
- Carreira C, Larsen M, Glud RN, Brussard CPD, Middelboe M (2013). Heterogeneous distribution of prokaryotes and viruses at the microscale in a tidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 69, 183-192.
- Carreira C, Staal M, Middelboe M., Brussard CPD (2015). Counting viruses and bacteria in photosynthetic microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* 81(6), 2149-2155.
- Cassou C. (2004). Du changement climatique aux régimes de temps : l'oscillation nord-atlantique. *La météorologie* 45, 21-32.
- Danovaro R., Serresi M. (2000). Viral abundance and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Applied Environmental Microbiology* 66, 1857-1861.
- Danovaro R., Corinaldesi C., Dell'Anno A., Fuhrman J.A., Middelburg J.J., Noble R.T., Suttle C.A. (2011). Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbial Ecology* 35, 993-1034.
- Decho AW (2000). Microbial biofilms in intertidal systems : an overview. *Continental and Shelf Research* 20, 1257-1273.
- Defer D., Bourgougnon N., Fleury Y. (2009). Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture* 293, 1-7.
- De Jonge V.N., van Beusekom J.E.E. (1995). Wind- and tide-induced re-suspension of sediment and microphytobenthos from tidal flats in the Ems estuary. *Limnology & Oceanography* 40, 766-778.
- Dupuy C, Mallet C, Guizien K, Montanié H, Bréret M, Mornet F, Fontaine C, Nérot C, Orvain F (2014), Sequential resuspension of biofilm components (viruses, prokaryotes and protists) as measured by erodimetry experiments in the Brouage mudflat (French Atlantic coast), *Journal of Sea Research* 92, 1385-1101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2013.12.002>.
- Filipini M., Middelboe M (2007). Viral abundance and genome size distribution in the sediments and water column of marine and freshwater ecosystems. *FEMS Microbial Ecology* 60, 397-410.
- Forster R.M., Kromkamp J.C. (2004). Modelling the effects of chlorophyll fluorescence from subsurface layers on photosynthetic algae. *Marine Ecology Progress Series* 284, 9-22.
- Glud RN, Middelboe M (2004). Virus and bacteria dynamics of a coastal sediment: implication for benthic carbon cycling. *Limnology and Oceanography* 49(6), 2073-2081.
- Harvell, C.D., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R. (1999) Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science* 285 (5433), 1505-1510.
- Heldal M., Bratbak G. (1991). Production and decay of viruses in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series* 72, 205-212.
- Hewson I., O'Neil J.M., Fuhrman J.A., Dennison W.C. (2001). Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. *Limnology & Oceanography* 46, 1734-1746.
- Hewson I., Fuhrman J.A. (2003). Viriobenthos production and virioplankton sorptive scavenging by suspended sediment particles in coastal and pelagic waters. *Microbial Ecology* 46, 337-347.
- Hoegh-Guldberg O., Bruno J.F. (2010). The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science* 328 (5985), 1523-1528.
- IPCC (ou GIEC) – (2014). Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (2014).
- Kratina P., Greig H.S., Thompson P.L., Carvalho-Pereira T. S. A., Shurin J.B. (2012). Warming modifies trophic cascades and eutrophication in experimental freshwater communities. *Ecology* 93, 1421-1430.
- Leal Diego A.G., Ramos A.P.D., Souza D.S.M., Durigan M., Greinert-Goulart J.A., Moresco V., Amstutz R.C., Micoli A.H., Neto R.C., Barardi C.R.M., Franco R.M.B. (2013). Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. *Ocean & Coastal development* 72, 93-100.
- Lees D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 59, 81-116.
- Lefebvre S, Marín Leal JC, Dubois S, Orvain F, Blin J.-L., Bataillé M.-P., Ourry A., Galois R. (2009). Seasonal dynamics of trophic relationships among co-occurring suspension-feeders in two shellfish culture dominated ecosystems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82, 415-425.
- Lloyd K.G., MacGregor B.J., Teske A. (2010). Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiol Ecol* 72(1), 143-151. ([doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00827.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00827.x)).

- Luna G.M., Vignarolli C., Rinaldi C., Pusceddu A., Nicoletti L., Gabellini M., Danovaro R., Biavasco L. (2010). Extraintestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (17), 5659-5668.
- Mallet C, Agogu  H, Bonnemoy F, Guizien K, Orvain F, Dupuy C (2014). Structures of benthic prokaryotic communities and their hydrolytic enzyme activities resuspended from samples of intertidal mudflats: An experimental approach, *Journal of Sea Research* 92, ISSN 1385-1101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2014.01.005>
- McKew B.A., Taylor J.D., McGenity T.J., Underwood G.J.C. (2011). Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *The International Society for Microbial Ecology journal* 5, 30-41.
- Mitbavkar S., Anil A.C. (2004). Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. *Marine Biology* 145, 9-20.
- Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau PG (2003). Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development : an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial Ecology* 45, 237-251.
- Orvain F, Sauriau PG, Sygut A, Joassard L, Le Hir P (2004). Interacting effects of *Hydrobia ulvae* bioturbation and microphytobenthos on the erodability of mudflat sediments *Marine Ecology Progress Series* 278, 205-223.
- Orvain F, Lefebvre S, Montepini J, S bire M, Gangnery A, Sylvand B (2012). Spatial and temporal interaction between sediment and microphytobenthos in a temperate estuarine macro-intertidal bay. *Marine Ecology Progress Series* 458, 53-68
- Orvain F, De Crignis M, Guizien K, Lefebvre S, Mallet C, Takahashi E, Dupuy C (2014). Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria, microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France), *Journal of Sea Research* 92, ISSN 1385-1101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2014.02.018>
- Orvain F, Martinez A.-S., Desoche E., Claquin P. (2015). Interaction between epilithic microphytobenthic biofilm and larval development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. RECIF : Congress on artificial reefs : from materials to ecosystems – ESITC Caen – 27-28-29 January 2015.
- Pernet F., Barret J, Le Gall P, Corporeau C., D gremont L., Lagarde F., P pin J.F., Keck N. (2012). Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practises in the Thau lagoon. *Aquaculture Environment Interaction* 2, 215-237
- Pierre G., Graber M., Rafiliposon B.A., Dupuy C., Orvain F., De Crignis M., Maugard, T. (2012). Biochemical composition and changes of ExtraCellular PolySaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Ol ron, France). *Microbial Ecology* 63, 157-169.
- Pierre G., Zhao J.M., Orvain F., Dupuy C., Klein G.L., Graber G., Maugard M., Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes-Ol ron, France), *Journal of Sea Research* 92, ISSN 1385-1101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.018>.
- Rabalais N.N., Turner R.E., Diaz R.J., Justic D. (2009). Global change and eutrophication of coastal waters. – *ICES Journal of Marine Science* 66: 1528–1537.
- Renault T. et al. (2014) Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology*
- Sauvage C., P pin J.F., Lap gue S., Boudry P., Renault T. (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Research* 142, 181-187.
- Segarra A., P pin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N., Renault T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid HerpesVirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153 (1), 92-99.
- Serodio J. (2004). Analysis of variable chlorophyll fluorescence in microphytobenthos assemblages: implications of the use of depth-integrated measurements. *Aquatic Microbial Ecology* 36, 137-152.
- Suttle C.A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* 437, 356-361.
- Suttle C.A. (2007). Marine viruses – major players in the global ecosystem. *Nature Review Microbiology* 5, 801-812.
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009). Optimising extraction of extrapolymeric substances (EPS) from benthic diatoms : comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Marine and Freshwater Research* 60, 1-10.
- Ubertini M., Lefebvre S., Gangnery A., Granger  K., Le Gendre R., Orvain F. (2012). Spatial variability of benthic-pelagic coupling in an estuary ecosystem: Consequences for microphytobenthos resuspension phenomenon. *PloS one* 7(8): e44155. [doi:10.1371/journal.pone.0044155](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044155)
- Ubertini M., Lefebvre S., Rakotomalala C., Orvain F. (2015). Impact of sediment grain-size and biofilm age on microphytobenthos resuspension. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, in press.
- Umesha K.R., Bhavani N.C., Venugopal M.N., Karunasagar I., Krohne G., Karunasagar I. (2008). Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in South West coast of India. *International Journal of Food Microbiology* 122, 279-286.
- Vignarolli C, Luna GM, Rinaldi C, Cesare AD, Danovaro R, Biavasco F (2012). New sequence types and multidrug resistance among pathogenic *Escherichia coli* isolates from coastal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (11), 3916-3922.
- Weinbauer MG (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Review* 28, 127-181.
- Wommack K.E., Colwell R.R. (2000). Virioplankton: Viruses in aquatic systems. *Microbiology Molecular Biology Review* 64, 69-114.

