HAL
archives-ouvertes.fr

Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (Mytilus sp.)

Maud Charles

▶ **To cite this version:**

Maud Charles. Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (Mytilus sp.). Biologie animale. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC256 . tel-03053331

HAL Id: tel-03053331
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03053331

Submitted on 11 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (Mytilus sp.).

Présentée et soutenue par
Maud CHARLES

Thèse soutenue publiquement le 10/12/2019 devant le jury composé de		
M. MICHEL AUFFRET	Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale - UBO	Rapporteur du jury
Mme DELPHINE DESTOUMIEUX-GARZON	Directeur de recherche au CNRS, Université de Montpellier	Rapporteur du jury
M. PASCAL CLAQUIN	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme CORALIE LUPO	Docteur Vétérinaire, IFREMER - LA TREMBLADE	Membre du jury
M. JULIEN NORMAND	Cadre de recherche, Laboratoire LERN IFREMER	Membre du jury

Thèse dirigée par MARYLINE HOUSSIN, Biologie des organismes et ecosystèmes aquatiques (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques
BOREA

Préambule

Cette thèse de doctorat a été réalisée grâce à un financement conjoint par la **Région Normandie** (convention n°16E00484) et par le Groupement d'Intérêt Public (GIP) **LABÉO**.

Au sein de l'Unité Mixte de Recherche Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (**FRE 2030 BOREA, MNHN, CNRS, UPMC, IRD 207, UCN, UA**), les travaux de recherche ont été conduits au laboratoire **LABÉO Frank Duncombe** à Saint-Contest (Calvados).

Ce diplôme de Doctorat a été préparé à **l'Université de Caen Normandie**, au sein de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (**EDNBISE 497**), portée par la Communauté d'Universités et d'Etablissements (ComUE) **Normandie Université**.

Au 3-5 rue des boucholeurs, à Esnandes

Je remercie

Monsieur Michel AUFFRET et Madame Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.

Monsieur Pascal CLAQUIN, Madame Coralie LUPO et Monsieur Julien NORMAND, d'avoir répondu favorablement à la demande de participation à ce jury.

Maryline HOUSSIN, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci pour ta confiance et la liberté que tu m'as accordées.

Katherine COSTIL, car si j'en suis là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce toi. Merci de m'avoir transmis cette engouement pour la recherche. Je ne sais pas si nous aurons de nouveau l'occasion de travailler ensemble, mais quoi qu'il en soit, ce fut un plaisir de faire mes premiers pas dans la recherche à tes côtés.

Monsieur Guillaume FORTIER, Monsieur Pierre-Hugues PITEL, Monsieur Pascal SOURDAINE et Madame Céline ZATYLNY-GAUDIN, respectivement directeur général du GIP LABÉO, directeur du pôle santé et du pôle recherche du GIP LABÉO, ancien directeur adjoint de l'UMR 7208 BOREA et actuelle responsable site de Caen de la FRE 2030 BOREA, de m'avoir accueillie au sein de vos laboratoires.

En stages de master 1 et 2 à BOREA, dans une thématique de recherche plutôt écologie/écotoxicologie, puis détachée à LABÉO pour faire une thèse dans un domaine que je découvrais, j'ai eu l'opportunité de côtoyer deux univers différents. Que ce soit au regard du fonctionnement, de l'environnement de travail ou du personnel, ce n'en fut que plus enrichissant. Cela m'a notamment donné l'opportunité de côtoyer des personnes que je n'aurais probablement pas rencontrées ailleurs.

Ismaël BERNARD, pour la collaboration qui a commencé au début de ma thèse et qui perdure aujourd'hui. Merci pour ta disponibilité, ta réactivité et ton engouement, c'est une vraie opportunité pour nous, de travailler avec quelqu'un comme toi. Enfin, je tiens plus spécifiquement à te remercier pour la collaboration sur l'étude de 2017, ainsi que pour ton aide et ta confiance pour l'article.

Antonio VILLALBA, for your availability and your answers to my many questions (especially in histology). Thank you for your valued scientific expertise, collaborating with a renowned person like yourself has been a privilege. However, it will remain a regret not to have been able to meet you.

Yann DEYDIER, du CRC Bretagne Nord. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour les nombreux kilomètres parcourus pour nous apporter des échantillons.

Manuel SAVARY, du CRC Normandie-Mer du Nord, de nous avoir apporté des lots de moules à la suite de déclarations de mortalités en Normandie-Mer du Nord.

Loïc MAINE, mytiliculteur dans la zone conchylicole du sud Sienne, de nous avoir mis à disposition des pieux de moules d'avril 2017 à avril 2018.

Benoit CLOUET, mytiliculteur dans la zone conchylicole d'Agon-Coutainville, de nous avoir fourni plusieurs centaines de moules, tous les mois, depuis juin 2018 jusqu'à aujourd'hui et pour avoir accepté de partager son expertise et ses observations de terrain. Écouter et discuter avec des mytiliculteurs est toujours intéressant et parait essentiel lorsque l'on travaille sur un sujet comme celui-ci. Merci pour votre sympathie et votre disponibilité.

Nathalie R., Nathalie F., Valérie et Marie, du service de microbiologie alimentaire de LABÉO Frank Duncombe. Merci pour votre accueil et votre sympathie.

Sylvie et Ludovic, du service santé animale-biologie clinique de LABÉO Frank Duncombe. Merci pour votre gentillesse et votre serviabilité. Je ne saurais dire combien de lames j'ai oublié dans la centrifugeuse et que j'ai retrouvé, comme par magie, coloré et prêt à être regardées ; la magie n'existe pas, les personnes bienveillantes, oui.

Karen, chargée de communication externe à LABÉO, pour son aide et ses conseils pour l'organisation des journées de l'école doctorale. Merci pour ta gentillesse, ton dynamisme et ta disponibilité.

Stéphanie, d'avoir créé un nouveau nom de genre pour les moules, même si je ne suis pas sûre finalement que *Mytiliculus* soit accepté par le registre mondial des espèces marines.

Coralie, pour les multiples services rendus ces dernières semaines, sache que je t'en suis reconnaissante.

Lucie, pour les nombreux coups de main dans les premiers mois de la thèse, merci petite perruche pour ta bonne humeur et pour ces moments de rigolade.

Erika, pour les réponses que tu m'as apportées sur les pathologies des mollusques alors que je n'étais qu'une novice dans le domaine. Je garde un très bon souvenir de mon premier congrès à Sète, avec toi. J'espère qu'on se recroisera et je te dis « Pasta la vista ! ».

Elise et Suzanne, pour ces trois années passées à vos côtés sans l'ombre d'un nuage. Vous m'avez appris beaucoup, scientifiquement et humainement. Vous m'avez toujours aidée quand j'en avais besoin pour des manip' et je vous en suis plus que reconnaissante. Travailler à vos côtés a été un plaisir quotidien. L'une comme l'autre, vous êtes pédagogues, honnêtes, bienveillantes, attentionnées, patientes, drôles. Elise, ton admiration pour le pont-canal me restera et j'y penserai désormais à chaque fois que je l'emprunterai. Suzanne, merci pour tes citations mythiques, dont une plus particulièrement, qui est désormais célèbre. Je ne doute pas qu'à travers vous deux (on peut également compter Maryline, d'ailleurs), la « team digitale en action » perdurera.

Arthur, Charlotte, Ombeline, Valérian et Agathe pour cette amitié tissée au début de nos études supérieures.

Diane, Fabien, Martin, Julia et Bérengère pour avoir égayé grand nombre de mes déjeuners et d'avoir accepté une biologiste à votre tablée, c'était bien urbain de votre part.

Francis, pour sa présence quotidienne et reconfortante pendant la période de rédaction.

Ma famille, qui m'a toujours soutenue moralement et financièrement dans la poursuite de mes études. Un grand merci plus spécifique, à ma mère, qui m'a toujours apporté un soutien sans faille.

Guillaume, pour tout.

Liste des articles, rapports, communications orales et posters

Articles

Charles M., Bernard I., Villalba A., Oden E., Burioli E.A.V., Allain G., Trancart S., Bouchart V., Houssin M. 2020. High mortality of mussels in northern Brittany – Evaluation of the involvement of pathogens, pathological conditions and pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology*, 170, 107308. doi: 10.1016/j.jip.2019.107308

Charles M., Trancart S., Oden E., Houssin M. 2020. Experimental infection of *Mytilus edulis* by two pathogenic *Vibrio splendidus*-related strains: determination of pathogenicity level of strains and influence of the origin and annual cycle of mussels on their sensitivity. *Journal of Fish Diseases*, 43(1):9-21. doi: 10.1111/jfd.13094

Burioli E.A.V., Trancart S., Simon A., Bernard I., Charles M., Oden E., Bierne N., Houssin M. 2019. Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *Journal of Invertebrate Pathology*, 168, 107271. doi: 10.1016/j.jip.2019.107271

Burioli E.A.V, Charles M., Kristmundsson A., Trancart S., Freeman M.A., Houssin M. *In preparation*. Description of an Apicomplexan parasite in the haemocytes of the blue mussel *Mytilus edulis* in Northern Brittany (France).

Rapports techniques

Bernard I., Charles M., Allain G., Burioli E.A.V., Villalba A., Le Foll F., Deydier Y., Houssin M. 2018. Bilan de l'observatoire des mortalités de moules en Bretagne Nord pour la saison 2016-2017 et premiers éléments sur les organismes pathogènes présents. *CRC Bretagne Nord*

Bernard I., Charles M., Bierne N., Allain G., Burioli E.A.V., Villalba A., Le Foll F., Deydier Y., Houssin M. 2018. Recherche de pathogènes en lien avec les mortalités de moules en Bretagne Nord en 2017 et 2018 – rapport final. *CRC Bretagne Nord*

Communications orales

Bernard I. & Charles M. 2017. Investigation on blue mussel high mortality in France: a phenomenon with high spatio-temporal variability but no conclusive cause. *2nd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR 2017), 7-8 September 2017, Sète (France)*

Charles M. 2019. Experimental infection of *Mytilus edulis* by two *Vibrio splendidus*-related strains: determination of pathogenicity level of strains and influence of the origin and annual cycle of mussels on their sensitivity*. 3rd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR 2019), 26-28 August 2019, Chioggia (Italy)*

Posters

Burioli, E.A.V., Charles M., Bernard I., Pitel P.-H., Houssin M. 2017. First description of disseminated neoplasia in *Mytilus edulis* in Northern Brittany (France) and development of a rapid diagnostic tool. *2nd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR 2017), 7-8 September 2017, Sète (France)*

Charles M., Bernard I., Villalba A., Oden E., Burioli E.A.V., Allain G., Trancart S., Bouchart V., Houssin M. 2019. Mussel mass mortality in northern Brittany: Evaluation of the involvement of pathogens, pathological conditions and pollutants. *XXIIe édition des Journées de l'Ecole Doctorale NBISE, 22-23 mars 2019, Caen (France)*

Formations doctorales suivies et activités menées pendant le Doctorat

2016-2017

- Formation sur la gestion des références bibliographiques (Zotero) : *Méthodes et outils en Sciences et Santé*
- Cours d'anglais : *International Communication in English*
- Représentante élue des doctorants au Conseil de département de Biologie et Sciences de la Terre (BST) de l'UFR des Sciences de l'Université de Caen Normandie (de janvier 2017 à mars 2019)
- Représentante élue des doctorants au Conseil et Bureau de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDNBISE 497) (de mars 2017 à mars 2018)

2017-2018

- Cours d'anglais :
  - *International Communication in English*
  - *Les bases d'anglais pour chercheurs*
  - *Formation en langue étrangère* (anglais niv. B2) au Carré International de l'Université de Caen *[formation financée par l'EDNBISE 497 en réponse à l'appel à subvention de 2017 pour participation à une formation spécifique]*
- Formation sur la structure et le fonctionnement de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche en France : *Procédure de recrutement pour les maîtres de conférences des universités et les chargés de recherche CNRS*
- Modules pédagogiques obligatoires suivis dans le cadre de la mission enseignement :
  - *Sociologie des publics étudiants*
  - *Voix, corps et communication professionnelle*
  - *Evaluation et formation des étudiants*
- Mission enseignement : *64 h TD & TP en L1 Biologie Végétale*

2018-2019

- Formation Prévention et Secours Civique de niveau 1 (PSC1)
- Participation aux rencontres MasterDocs (27 février et 30 octobre 2019) organisées conjointement par l'association de doctorants OPTIC[1] et l'association des étudiants en sciences de Caen
- Trésorière de l'association OPTIC pour l'année 2019
- Organisatrice et chargée de la recherche de financements/partenariats pour la XXII^{e} édition des Journées de l'Ecole Doctorale NBISE, les 22 & 23 mars 2019 au Dôme de Caen (budget 10.5 k€)
- Participation au Festival de l'Excellence Normande (FêNO), du 12 au 14 avril 2019 au Parc des expositions de Caen
- Participation à La Mer XXL, du 29 juin au 10 juillet 2019 au Parc des expositions de Nantes

[1] Organisation Pour les docTorants Interdisciplinaire de Caen

Table des matières

Préambule i
Je remercie iii
Liste des articles, rapports, communications orales et posters vi
Formations doctorales suivies et activités menées pendant le Doctorat viii

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE 1

Liste des figures 7
Liste des tableaux 17
Liste des abréviations, des sigles et des acronymes 21

INTRODUCTION GÉNÉRALE 23

I. Moules et mytiliculture en France et en Europe 25

1. Histoire de la mytiliculture 25
2. Espèces cultivées : *Mytilus* spp. 27
a. Classification phylogénétique 27
b. Répartition géographique 28
c. Biotope 30
d. Cycle biologique 31
e. Anatomie 35
f. Respiration et alimentation 36
g. Appareil circulatoire et hémocytes 37
3. Exploitation des moules 40
a. Méthodes et techniques d'élevage 40
i. Captage du naissain 40
ii. Dédoublage et boudinage 42
iii. Culture sur bouchots 42
iv. Culture sur cordes ou sur filières 43
v. Culture à plat ou sur parcs 44
b. Production des régions mytilicoles françaises 44
i. Normandie-Mer du Nord 45
ii. Bretagne Nord 46
iii. Bretagne Sud 46
iv. Pays de la Loire 46
v. Poitou-Charentes 47

vi. Méditerranée 47
c. Production, valorisation et consommation 47

II. Menaces qui pèsent sur les moules et la profession mytilicole : nuisances et mortalités 51

1. Évènements climatiques exceptionnels 51
a. Hivers rudes ou profils hivernaux particuliers 52
b. Étés caniculaires 52
2. Prédation naturelle 53
a. Classe des Aves : le goéland argenté, les macreuses et l'eider à duvet 53
b. Classe des Gastéropodes : les bigorneaux perceurs 55
c. Classe des Astérides : les étoiles de mer 56
d. Classe des Actinoptérygiens : la daurade royale 57
3. Compétition, colonisation et surpopulation 58
4. Endoparasites 61
a. Mytilicola spp. 62
b. Trématodes 64
c. Marteilia spp. 67
5. Maladies non parasitaires 69
a. Virus 69
b. Bactéries 71
c. Néoplasie hémocytaire et perturbation du cycle cellulaire 75

PARTIE 1 - *APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE ANALYTIQUE* 81

PARTIE 1A - *Suivi des moules de Bretagne Nord* 83

I. Introduction et contexte de l'étude 84
II. Objectifs et démarche 85
III. Résultats 87

1. Article 1 88
Résumé 88
Abstract 89
Introduction 90
Materials and Methods 91
1. Sampling sites and mussels 91
2. Mortality and temperature monitoring 94

3. Sampling for analysis 94
4. Biometry....94
5. Histological examination....95
6. Bacteriological analysis 95
7. Molecular analyses 95
8. Chemical analyses of flesh....99
9. Data analysis....99
Half-stock index 99
Statistical analysis 100
Results....100
1. Mussel species, temperature monitoring and mortality 100
2. Biometry....102
3. Histological examination....103
4. Molecular analyses 107
Bacterial profiles 107
Presence or absence of known pathogens of bivalve molluscs 108
5. Chemical analyses of flesh....109
Discussion 110
1. Temperature, conditioning and mortality....110
2. Mussel symbionts....111
3. Lesions and alteration: hemocytic infiltration, granulocytomas and neoplasia112
4. Chemical contamination 114
5. Bacterial profiles....115
Conclusion 117
Acknowledgements 117
References 118
2. Résultats supplémentaires du suivi des moules de Bretagne Nord....127
a. Mortalités et données biométriques....127
b. Paramètres abiotiques : températures et contaminants....128
i. Températures.... 128
ii. Contaminants 129
c. Microscopies électronique et optique 131
i. Microscopie électronique à transmission.... 131
ii. Histopathologie et cytopathologie 131
d. Bactériologie 134
i. Profil bactérien 134
ii. Gènes de virulence de Vibrio splendidus.... 136
iii. Francisella halioticida 138

e. Apicomplexa 140

IV. Discussion, conclusions et perspectives 143

PARTIE 1B - *Déclarations de mortalités en Normandie et dans les Hauts-de-France*....149

I. Introduction et contexte....150

II. Objectifs et démarche....150

III. Résultats 151

1. Histologie....153

2. Cytologie....155

3. Analyses de biologie moléculaire....156

IV. Discussion, conclusions et perspectives 159

PARTIE 2 - *INFECTIONS BACTERIENNES EXPERIMENTALES*....163

I. Introduction et contexte des expérimentations 165

II. Objectifs et démarche....165

III. Résultats 166

1. Article 2....167

***Résumé*....167**

***Abstract*....168**

***Introduction*....169**

Materials and Methods 170

1. Bacterial strains and inoculum preparation....170
2. Experimental mussels 171
3. Experimental procedure of bacterial challenges 172
4. Microbiological and molecular analyses of dead mussels....173
5. Genotyping of V. splendidus-related strains 174
6. Phylogenetic analyses....174
7. Establishment of periods related to the annual life cycle of mussels....174
8. Statistical analyses....175

***Results*....175**

1. Bacterial inocula concentrations....175
2. Overall obtained mortalities and strain-positive mussels 175

Comparison of mortality by tested conditions (strains / loads)....178

Comparison of mortality by period ... *178*
Comparison of the pathogenicity of the two strains over the common time interval ... *179*
Comparison of mortality depending on spat recruitment sites ... *180*
3. Biometry ... 181
4. Other observations ... 182
Discussion ... ***183***
1. Pathogenicity of V. crassostreae 7T4_12 and V. splendidus 3G1_6 ... 183
2. Influence of the annual life cycle during a bacterial challenge ... 185
3. Mortality according to original spat recruitment site ... 186
Acknowledgements ... ***188***
References ... ***188***
2. Données supplémentaires ... **193**
a. Autres observations ... 193
b. Caractéristiques des souches testées ... 194
IV. Discussion, conclusions et perspectives ... **194**
PARTIE 3 - *PREVALENCE, INCIDENCE ET IMPACT DE LA NEOPLASIE HEMOCYTAIRE DANS DES MOULES DE NORMANDIE* ... **199**
I. Introduction et contexte des expérimentations ... **201**
II. Objectifs et démarche ... **202**
III. Résultats ... **203**
1. Suivi de la néoplasie par cytologie ... **203**
2. Expérimentations de mise en contact ... **213**
a. Suivi de l'évolution de la néoplasie ... 213
b. Mortalités ... 215
3. Suivi de la néoplasie par cytométrie en flux ... **217**
a. Néoplasie et hyperploïdie ... 217
b. Cycle cellulaire et prolifération anormale ... 220
4. Contamination chimique ... **223**
IV. Discussion, conclusions et perspectives ... **224**
DISCUSSION GENERALE ... **231**
CONCLUSION GENERALE ... **243**
MATERIELS ET METHODES ... **247**

Liste des fiches techniques 249
Fiche technique n°1.....251
Fiche technique n°2.....253
Fiche technique n°3.....255
Fiche technique n°4.....257
Fiche technique n°5.....261
Fiche technique n°6.....263
Fiche technique n°7.....267
Fiche technique n°8.....269
Fiche technique n°9.....271
Fiche technique n°10.....273
Fiche technique n°11.....275

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 279

ANNEXES.....300

Annexe I.....302
Annexe II.....304
Annexe III.....306
Annexe IV.....308

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Du fait de son passé mytilicole et de la traditionnelle culture sur bouchots connue bien au-delà des frontières françaises, la France possède une certaine notoriété en ce qui concerne la culture des moules. D'abord cloisonnées à certaines régions de la côte atlantique, la culture et la consommation de moules font désormais partie du patrimoine culturel français des régions littorales et au-delà. Depuis plusieurs années maintenant, le bassin de production de la baie de l'Aiguillon et du pertuis Breton, berceau de la culture des moules sur bouchots, s'est vu rattraper voire dépasser par d'autres régions productrices qui perpétuent cette technique, comme la Bretagne et la Normandie. À l'heure actuelle, toutes espèces et méthodes de culture confondues, la première région mytilicole française est de loin, la Bretagne Nord, suivie par le secteur méditerranéen, la Charente-Maritime, la Bretagne Sud et le Nord-Normandie qui contribuent à parts quasiment égales à la production nationale totale, viennent ensuite les Pays de la Loire qui sont la région la moins productrice de moules[2].

La mytiliculture se trouve entre l'agriculture et la pêche, et les mytiliculteurs sont considérés comme les « agriculteurs de la mer ». Bien que la profession ait su évoluer au cours des dernières décennies, notamment avec l'automatisation des procédés et l'assistance par les machines, le métier de mytiliculteur n'en reste pas moins un métier traditionnel qui se transmet encore de génération en génération. Plus des ¾ des moules produites en France sont cultivés *via* la méthode ancestrale de culture sur bouchots et l'existence de labels européens a fortement contribué à préserver et valoriser ce produit du « meroir »[3] permettant à la France d'asseoir sa position dans la mytiliculture européenne. D'après les chiffres du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (Agreste, 2019), en 2017, la France comptait, 676 entreprises conchylicoles[4] – dont 276 uniquement mytilicoles – ce qui représentait 14 865 emplois dont 9 519 équivalents temps-plein. Avec plus de 50 000 tonnes de moules produites par an et un chiffre d'affaires associé calculé à 133 millions d'euros, la mytiliculture représente une part non négligeable de l'économie française.

À la différence de l'ostréiculture française qui a été marquée par plusieurs crises successives de mortalités massives au cours du siècle dernier (Pépin *et al.*, 2014), la mytiliculture française n'a, quant à elle, connu que de très rares épisodes de mortalités massives. Outre les événements météorologiques particuliers, les dernières épizooties identifiées remontent au début des années 1960 pour la baie de l'Aiguillon, et au début des

[2] Plus d'informations sont apportées dans la section I.3.b et c (à partir de la p. 44).

[3] En homologie au mot « terroir », le terme « meroir » est employé pour les produits du terroir maritime (Cormier-Salem & Mbaye, 2018).

[4] Toutes cultures confondues de coquillages : huîtres, moules, coques, palourdes et/ou ormeaux.

années 1980, pour la baie du Mont-Saint-Michel[5]. Pourtant, depuis 2014, les moules de certains bassins de production subissent des épisodes de surmortalités. En conséquence, nombre de mytiliculteurs ont ainsi vu leur production se réduire drastiquement à la suite de ces mortalités singulières.

D'abord, plusieurs élevages mytilicoles de la côte atlantique ont été touchés par d'importantes mortalités à la fin de l'hiver et au début du printemps 2014 : en Bretagne[6], dans les Pays de la Loire[7], et en Poitou-Charentes[8]. Ensuite, en automne 2014, des mortalités plus modérées et plus localisées ont été constatées à Brest et en baie de Bourgneuf (< 25 % de mortalité). Au printemps 2015, certains des sites frappés en 2014 le sont une nouvelle fois, les secteurs de Bretagne Nord[9] et des Pays de la Loire[10] sont alors les plus concernés, tandis que les pertuis Breton et d'Antioche le sont nettement moins (~ 20 % de mortalité). En automne 2015, plusieurs de ces bassins mytilicoles sont encore atteints par des mortalités, mais avec des degrés relativement plus faibles. La plupart des sites touchés au printemps 2014 le sont à nouveau massivement au printemps 2016, avec en plus, le site de Lannion et certains abers du Nord de la Bretagne[11]. Même s'ils aboutissent à des taux de mortalités cumulés similaires, l'épisode de 2014 se distingue de celui de 2016 par son caractère particulièrement intense (Bernard & Allain, 2017). En parallèle à cela, les exploitations mytilicoles situées plus à l'Est et au Nord de la Bretagne – de la baie de Saint-Brieuc, jusqu'à la région des Hauts-de-France en passant par la Normandie – ont, dans leur grande majorité, été épargnées[12]. Cependant, les pratiques culturales font que les mytiliculteurs de ces bassins de production se fournissent presque tous exclusivement en naissains, auprès de mytiliculteurs « naisseurs » situés dans les Pays de la Loire et dans le Poitou-Charentes. Dès lors, ces événements ont perturbé tout un « socio-écosystème littoral »[13] et ont généré des questionnements et des inquiétudes de la part des professionnels du secteur. En effet, ces derniers craignent pour la pérennité de la filière mytilicole dans un contexte où (i) leur activité dépend essentiellement des centres naisseurs, situés dans les régions touchées et (ii) les moules qu'ils cultivent ne peuvent que

[5] Plus d'informations sont apportées dans les sections de la partie II.4. (à partir de la p. 61).
[6] Dans la rade de Brest (~ 80 % de mortalité) (Allain & Bernard, 2016 ; Bernard & Allain, 2017).
[7] A l'Ouest de l'île de Noirmoutier, à l'île d'Yeu, au Nord de l'île de Ré et dans le pertuis Breton (secteur nord-ouest : 88-100 % de mortalité) (Allain & Bernard, 2016 ; Béchemin *et al.*, 2015).
[8] Dans le pertuis Breton (secteur sud-est : 34-80 % de mortalité), le pertuis d'Antioche étant considéré comme non impacté (< 10 % de mortalité) (Béchemin *et al.*, 2015 ; Travers *et al.*, 2016b).
[9] La rade de Brest et l'aber Benoît (> 50 % de mortalité ; Bernard & Allain, 2017).
[10] L'estuaire de la Loire, La Plaine-sur-Mer, l'île de Noirmoutier et la baie de Bourgneuf (50-80 % de mortalité).
[11] Le pertuis d'Antioche (50-60 % de mortalité), le pertuis Breton, l'île de Noirmoutier, La Plaine-sur-Mer, la rade de Brest, les abers de Bretagne Nord et la baie de Lannion (~ 80 % de mortalité) (Bernard & Allain, 2017).
[12] En 2016 en Normandie, il y a eu deux déclarations dans le cadre du RÉseau de surveillance des PAthologies des MOllusques (REPAMO) de l'Ifremer : en avril à Utah Beach (< 10 % de mortalité) et en juin à Coudeville-sur-Mer (< 10 % de mortalité) (Osta Amigo *et al.*, 2018).
[13] Terme utilisé par Lupo *et al.* (2019).

subir les aléas du milieu naturel – qui lui-même fait face à toutes les pressions que nous lui connaissons. Les pouvoirs publics ont ainsi été interpellés et les laboratoires de recherche chargés de mener des études de façon à mieux comprendre ces événements de mortalités. A l'évidence, le caractère original, exceptionnel et hétérogène de ces mortalités massives chez les moules, a soulevé de nombreuses interrogations. Cela a également souligné l'existence de lacunes, ou du moins de l'insuffisance de données récentes, concernant la réalité des interactions entre les moules et leur milieu.

L'objectif de ce travail de thèse est de contribuer à la compréhension du phénomène de mortalité chez les moules en étudiant les organismes pathogènes, les états pathologiques et les conditions physiologiques des animaux qui peuvent plus ou moins être impliqués dans les mortalités. Ceci a été réalisé en vue d'apporter des éléments de connaissance supplémentaires au sujet de différentes hypothèses qui avaient été formulées lors des premiers épisodes de surmortalité. Pour ce faire, différentes approches ont été employées. Dans un premier temps, une démarche épidémiologique analytique a été utilisée ; d'abord dans le cadre d'une étude de suivi sur plusieurs mois des mortalités de moules de Bretagne Nord (Partie 1A, p. 83), puis de manière concomitante, dans les cas de déclarations de mortalités en Normandie et dans les Hauts-de-France (Partie 1B, p. 149). De fait, les mortalités de moules ayant un caractère inédit, hétérogène et inexpliqué, sans agent étiologique spécifiquement identifié, il apparaissait important de considérer plusieurs paramètres biotiques, abiotiques, internes et externes à l'hôte. Ensuite, dans une stratégie différente, l'attention s'est portée sur l'étude de l'implication de différents critères, propres aux individus, sur leur sensibilité lors d'une infection par un agent plus ou moins pathogène (Partie 2, p. 163). Et pour finir, dans une démarche de suivi d'une maladie, des moules de Normandie ont été suivies pendant plusieurs mois afin d'évaluer la prévalence, l'évolution et l'incidence de la néoplasie hémocytaire sur les mortalités observées (Partie 3, p. 199).

Liste des figures

Figure 1 : Baie de l'Aiguillon. A gauche, localisation de la baie de l'Aiguillon de nos jours (adaptée de Mahé (1994) avec ajout du découpage administratif du territoire français en 2019). A droite, la baie de l'Aiguillon au début du XVIII[e] siècle avec indication des bouchots, orthographiés « Bouchau » (coll. BMLR, C I, 53, *Carte de la Généralité de La Rochelle,* dans Mahé (1994)). 25

Figure 2 : Répartition géographique des espèces du genre *Mytilus.* Adaptée de Gaitán-Espitia *et al.* (2016) avec ajout des tropiques du Cancer et du Capricorne (en lignes pointillées), respectivement au nord et au sud de l'Équateur (ligne continue). 28

Figure 3 : Répartition de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* en Europe occidentale. Les auteurs n'ont considéré que les populations d'espèces « pures » (95 % du génotype *M. edulis* ou *M. galloprovincialis*). (Fly *et al.*, 2015) 29

Figure 4 : Fréquences alléliques caractéristiques de *Mytilus edulis* (E) et de *Mytilus galloprovincialis* (G) dans les populations de moules de l'Atlantique Nord-Est. Secteurs d'échantillonnage : (A) Europe de l'Ouest ; (B) côtes ouest françaises ; (C) baie de Quiberon. HZ1, HZ2 et HZ3 correspondent à des zones hybrides distinctes comportant des populations génétiquement intermédiaires. (Figure modifiée issue de Bierne *et al.* (2003) ; voir *ibid.* pour la correspondance des numéros et des villes.) 30

Figure 5 : Evolution du tissu conjonctif/gonadique chez *Mytilus* sp. au cours de l'année. (A) Schéma de la dynamique du cycle annuel du tissu conjonctif/gonadique du manteau de la moule ; le cycle périphérique représente les follicules gonadiques à différentes périodes du développement, de la maturation et de la régression des gonades (Mikhailov *et al.*, 1996) ; (B) Moules male (m) et femelle (f) avec gonades (g) mâtures (Mikhailov *et al.*, 1995). 32

Figure 6 : Cycle biologique des moules. (Les photographies des différents stades larvaires sont issues de Jahangard *et al.* (2010) et Ventura *et al.* (2016). 33

Figure 7 : Anatomie interne de la moule. © Maud Charles.....35

Figure 8 : Morphologie externe des moules, *Mytilus edulis* (A) et *Mytilus galloprovincialis* (B). 36

Figure 9 : Moules (*Mytilus edulis*) immergées filtrant l'eau. Les siphons inhalants et exhalants sont particulièrement bien visibles ; les flèches indiquent le sens du courant créé par l'animal. © Maud Charles 36

Figure 10 : Cordes en fibre de noix de coco fixées entre les pieux de bouchots pour le captage. 41

Figure 11 : Cordes garnies de naissains déposées sur les « chantiers » en attendant d'être disposées sur les pieux de bouchots (Bricqueville-sur-Mer (50), août 2017). 41
Figure 12 : Pieux de bouchots à Bricqueville-sur-Mer (Manche) (septembre 2017). (A) Alignements de pieux de bouchots ; (B) Pieux supportant des cordes de naissains nouvellement installées (moules de moins de 6 mois) ; (C) Pieux intégralement recouverts de moules de 18 mois et plus (prêtes à être récoltées). 43
Figure 13 : Différentes méthodes existantes d'élevage en suspension. (A) Différents types de culture en suspension existants ; (B) Corde en suspension sous radeau dans l'étang de Thau (Occitanie). (C) Filière en pleine mer dans la baie de Lannion (Côtes-d'Armor). 44
Figure 14 : Régions de production conchylicoles. 45
Figure 15 : Production et consommation européennes pour les principaux pays. D'après le regroupement de plusieurs sources de données (Monfort, 2014; FAO, 2016, 2018; Agreste, 2019). 50
Figure 16 : Logos et labels européens (STG & AOP) et national (Label Rouge) détenus par certains mytiliculteurs français. 50
Figure 17 : Oiseaux consommateurs de moules. (A) Goéland argenté ; (B) Macreuses brunes femelle et mâle ; (C) Macreuses noires femelle et mâle ; (D) Eider à duvet femelle ; (E) Eider à duvet mâle. 54
Figure 18 : Bigorneaux perceurs (étoiles vertes) et leurs pontes (encadré noir) sur un pieux à Bricqueville-sur-Mer (Manche). Les flèches indiquent les zones sensées comporter des moules, qui ont été ravagées par les gastéropodes. 55
Figure 19 : Prédation des moules par les étoiles de mer. (A) Pieu de bouchot recouvert par des étoiles de mer ; (B) Ramassage des étoiles de mer draguées par les mytiliculteurs. 56
Figure 20 : Moules de bouchot et pieux colonisés par les balanes, à Bricqueville-sur-Mer (Manche). 58
Figure 21 : Contribution des principaux « filtreurs » à la quantité totale de phytoplancton filtrée en une année dans la baie du Mont-Saint-Michel (Cugier *et al.*, 2010) 59
Figure 22 : Envasement des bouchots causé par *Polydora ciliata* et moyens de lutte. (A) Pieux victimes de recouvrement ou « placage de vase » ; (B) Épaisse couche de limon vaseux agglomérant formée par les tubes et galeries de *P. ciliata* ; (C) Grattoir spécifique utilisé pour nettoyer les pieux ; (D) Nettoyage des pieux par un mytiliculteur à l'aide d'une pompe à eaux. Photos © Michel Ropert.....60
Figure 23 : Représentation schématique de *Mytilicola intestinalis* et de *Mytilicola orientalis.* Les protubérances thoraciques dorsolatérales sont caractéristiques chez les deux espèces : chez *M. intestinalis,* elles sont repliées vers l'intérieur tandis que chez *M. orientalis,* elles sont étendues vers l'extérieur. Source : Goedknegt *et al.* (2018) 62

Figure 24 : Cycle généralisé des trématodes avec les deux principaux stades (sporocystes et métacercaires) retrouvés dans les moules. (Figure réalisée à partir du regroupement de deux figures issues de Szuroczki & Richardson (2009) et Thieltges *et al.* (2008))..... 65
Figure 25 : Moules (*Mytilus edulis*) parasitées par des trématodes digénétiques au niveau du manteau. (A) Petites vésicules orangées correspondant à des sporocystes encapsulés de *Proctoeces maculatus* et (B) sporocystes de trématodes (Markowitz *et al.*, 2016a). (C) Sporocystes de *Proctoeces maculatus* (flèches noires) et métacercaires de *Himasthla quissetensis* (flèches blanches) (Markowitz, Williams & Krause, 2016b)..... 66
Figure 26 : Micrographes de microscopie optique et électronique de coupes de tissus de moules infectées par un virus de la famille des *Picornaviridae*. (A) Section de glande digestive avec granulocytomes ; (B) Agrandissement d'un granulocytome avec granulocytes contenant des inclusions cytoplasmiques ; (C) Particules virales enfermées dans une vésicule. G =granulocytomes composés de granulocytes comportant des particules virales ; T=tubules digestifs ; D=conduits digestifs ; N=noyaux ; V=inclusions cytoplasmiques contenant les virions ; F=matériel fibrillaire ; R=réticulums lisses et granuleux ; M=mitochondries. (Rasmussen, 1986) 70
Figure 27 : Clades de la famille des *Vibrionaceae* définis à partir de l'analyse de séquences (*MLSA*) de 8 gènes de ménage (*ftsZ, gapA, gyrB, mreB, pyrH, recA*, *rpoA* et *topA*) de 96 taxons. (Sawabe *et al.*, 2013)..... 73
Figure 28 : Stade avancé d'une néoplasie disséminée chez *Mytilus edulis*. (A) Masse viscérale avec des infiltrations massives de cellules néoplasiques dans le tissu conjonctif de la glande digestive et de l'intestin. (B) Agrandissement au niveau du tissu conjonctif envahi par des cellules cancéreuses, une figure mitotique (anaphase) est particulièrement visible (flèche)..... 76
Figure 29 : Pourcentages des moules non diploïdes des différents stocks étudiés par les auteurs avant (en noir) et après (en rouge) l'épisode de mortalité. Les pourcentages sous les noms des sites correspondent aux pourcentages d'anomalies génétiques. [les pourcentages de mortalité obtenus après l'épisode ont été ajoutés pour chaque site en bleu] (Benabdelmouna & Ledu, 2016)..... 79
Figure 30 : Localisation géographique des 8 sites mytilicoles de Bretagne échantillonnés en 2017..... 85
Figure 31: Location of the three sampling sites: the bays of Brest, Lannion and St. Brieuc. .92
Figure 32: Pictures of (A) the preparation of the baskets each containing 100 mussels and (B) the fixing of the baskets on the intertidal mussel stakes ("bouchot"). © Regional Shellfish Committee of North Brittany (CRCBN) 94
Figure 33 : Variation of temperature (broken line) and: (A) cumulative mortality (%) observed over the duration of the study based on monthly mortality monitoring (continuous line with

dots); (B) half-stock indices (days) calculated monthly to visualize the occurrence of mortalities for each month (line with dots). The vertical black lines correspond to the dates of sampling for analyses. 101
Figure 34: Evolution of the Condition Index (C.I.) of the Brest mussels on four dates (February, April, May and September 2017). Values are means ± SEM (ANOVA, p > 0.05). 102
Figure 35: Comparison of the Condition Indices (C.I.) of mussels from the 3 sites (Brest, Lannion, St. Brieuc) on both dates (February and May 2017). Values are means ± SEM (ANOVA, *p < 0.05 and Tukey's *post hoc* test).....102
Figure 36: Micrographs of histological sections showing symbionts found in *Mytilus edulis*. A: section of the digestive gland showing different developing stages of *Marteilia* sp. (arrows) in the epithelium of digestive tubules. B: section through the gills showing a a cell of the ciliate *Ancistrum mytili* (arrow). C: section through the digestive gland showing various intracytoplasmic ciliates (arrows) in the epithelium of a digestive tubule. D: section through the mantle showing trematode sporocysts (arrows) enclosing cercariae. E: section through the visceral mass showing a copepod *Mytilicola* sp. (star) in the intestinal lumen (L). ...103
Figure 37: Micrographs of histological sections showing pathological conditions of *Mytilus edulis*. A: section through the visceral mass showing heavy hemocytic infiltration (star) of the connective tissue. B: section through the digestive gland showing granulocytomas consisting of large masses of hemocytes (stars) surrounded by layers of flattened, epithelioid cells (arrowheads). C: section through the visceral mass showing the connective tissue heavily infiltrated with masses of neoplastic cells (star). D: Higher magnification of the previous micrograph showing abundant neoplastic cells (arrows) in a hemolymph sinus: a cell in mitotic process is pointed out with an arrowhead. 104
Figure 38: Prevalence (%) of the most remarkable histopathological observations: granulocytomas (GRA), inflammation/haemocytic infiltration (INF), disseminated neoplasia (NEO), trematode sporocysts enclosing cercariae (TRE), *Marteilia* sp. (MAR), *Mytilicola* sp.(MYT) and ciliates (CIL) identified (A) in the 3 bays (Brest, Lannion, St. Brieuc) on both dates (February and May 2017); (B) in Brest on four dates (February, April, May and September 2017). 106
Figure 39: Link between the prevalence (%) of symbionts and histopathological conditions and the half-stock index (days) for each site: Brest (letter x), Lannion (plus sign) and St. Brieuc (open circle). INF: haemocytic infiltration; GRA: granulocytomas; TRE: trematode sporocysts enclosing cercariae; NEO: disseminated neoplasia; MAR: *Marteilia* sp.; MYT: *Mytilicola* sp.; CIL: ciliates. 107
Figure 40: Bacterial profiles in samples from the 3 bays (Lannion, Brest, St. Brieuc) collected in February and May 2017. 108

Figure 41 : Evolution des températures entre janvier 2017 et janvier 2018 (Bernard *et al.*, 2018). 129
Figure 42 : Micrographes des principales conditions histopathologiques. (A) Masse viscérale montrant une large lésion dans la glande digestive avec une accumulation importante d'hémocytes et la destruction des structures digestives ; (B) Infiltrations hémocytaires ; (C) Granulocytomes ; (D) Sporocystes de trématodes ; (E) Glande digestive infestée par *Marteilia* sp. (F) Infiltration hémocytaire aigue du tissu conjonctif de la glande digestive ; (G) Epithélium stomacal contenant des « paquets » d'hémocytes en migration vers le lumen ; (H) Libération d'un « paquet » d'hémocytes dans le lumen ; (I) Néoplasie disséminée : invasion des branchies par des hémocytes néoplasiques. 133
Figure 43 : Micrographes de cytologies normales (A & B) et pathologiques (C & D). (A) Hémocytes normaux : hyalinocytes (flèche blanche) et granulocyte (flèche noire) ; (B) Comportement normal d'agrégation des hyalinocytes (flèche blanche) ; (C) Regroupement de quelques hémocytes néoplasiques, particulièrement bien visibles car la préparation contient peu d'hémocytes normaux ; (C) Hémocytes néoplasiques disséminés au sein de nombreux hémocytes normaux. Coloration : MGG.....134
Figure 44 : Proportion (%) des espèces bactériennes isolées entre février et octobre 2017 en fonction de l'intensité de la mortalité observée.....135
Figure 45 : Zoïtes présents dans le cytoplasme d'un granulocyte (A) et d'un agranulocyte (B) de moules prélevées le 24/10/2017 à Camaret-sur-Mer (29). Coloration MGG. (Burioli *et al.*, in prep).....140
Figure 46 : Ultrastructure du parasite Apicomplexe observé dans des hémocytes de moules, *Mytilus edulis*. A : coupe transversale du parasite présent dans le cytoplasme d'un granulocyte ; B : coupe longitudinale du parasite ; C : plus fort grossissement du pôle postérieur avec les deux grandes mitochondries ; D : plus fort grossissement du pôle apical avec le complexe apical ; E : plus fort grossissement sur l'apicoplaste. G = granulocyte, N = noyau, Gr = granules du granulocyte, Ac = parasite Apicomplexe, Mi = mitochondries, Gg = granules glucidiques, Go = appareil de Golgi, Rh = rhoptries, Mn = micronèmes, Co = conoïde, An = anneau polaire, Ap = apicoplaste. (Burioli *et al.*, in prep).....141
Figure 47 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) de 39 espèces dont 36 appartiennent à l'embranchement des *Apicomplexa*. L'arbre est enraciné par *Gymnodinium catenatum* (Burioli *et al.*, in prep).....142
Figure 48 : Localisation géographique des déclarations de mortalités de moules dans le bassin conchylicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018.....152
Figure 49 : Moules issues des prélèvements réalisés à Oye-Plage en octobre 2017. La présence de sédiments ou de vase est particulièrement remarquable, ainsi que la

dégradation avancée des tissus (plus particulièrement dans le cas de la troisième photo sur laquelle on remarque les tissus liquéfiés). 153
Figure 50 : Préparations cytologiques réalisées avec deux prélèvements d'hémolymphes issues de moules moribondes. Flèches noires : *brown cells* ou granules lysosomales ; flèches jaunes : bactéries. Coloration : MGG 156
Figure 51 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences du gène *rpoB* de toutes les séquences de *Francisella* spp. disponibles sur GenBank®. L'arbre est enraciné par *Escherichia coli*. (*Bootstrap* = 1000 *replicates*).....159
Figure 52: Location of the five mussel original recruitment areas and the shellfish growing area Bricqueville-sur-Mer with a picture of '*bouchot*'. 172
Figure 53: Schematisation of the post-infection monitoring system. Mussels inoculated with 100 µL of artificial sterilised sea water (controls), dilution 1:10 (C1) or dilution 1:10,000 (C2) of pure bacterial suspension of *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (S1) or *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2). 173
Figure 54: Phylogenic tree made from *mreB* sequences of *Vibrio spendidus*-related strains isolated during one of the experiments (color box) and forty-four different reference bacterial strains (Oden *et a*l., 2016); *Vibrio aestuarianus* 02/041 and *Vibrio penaeicida* AQ115, were provided by the Genomic of Vibrio Research Department (CNRS Roscoff, France) and used as Splendidus clade outsider. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap scores of 1000 replicates appear next to the corresponding branch (significant bootstrap score > 80). In color boxes*, mreB* sequences of (red box) *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2), (blue box) S2-positive dead mussels and (yellow box) S2-negative dead mussels. 177
Figure 55: Mortality (%) observed in each monthly experiment at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}). A: experimental infection with *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (S1); B: experimental infection with *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2). Dark grey bars: S-positive dead mussels in injected strain; light grey bars: negative dead mussels in injected strain; grey bars (light & dark): 'all' dead mussels. At the top of the histograms are indicated the periods of the year (A, B, C and D) defined in 2.5. Kruskal-Wallis test and Wilcoxon test; p-value* < 0.05. NA: no data.....179
Figure 56: Comparison of mortalities obtained at each month with *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (white bars) and *Vibrio splendidus* 3G1_6 (dark grey bars) at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}). Chi-squared test of independence; p-value** < 0.01. 180
Figure 57: Proportion (%) of dead mussels on all experiments (all strains included) according to the origin of mussels. ID: Ile Dumet; LP: La-Plaine-sur-mer; Ch: Charron; Fo: Fouras; No: Noirmoutier. Chi-squared; p-value** < 0.01. 181

Figure 58: Comparison of the length (mm) (A) and flesh weight (g) (B) of dead mussels according to their origin. ID: Ile Dumet; LP: La-Plaine-sur-mer; Ch: Charron; Fo: Fouras; No: Noirmoutier. Values are means ± SEM. ANOVA, p-value** < 0.01 and Tukey's *post hoc* test. The similarity among the bars is emphasised through a letter system, placed above them; bars that do not share the same letter are significantly different. 181
Figure 59: Spawning observed during experiments conducted through period A (Feb. to Apr.). (A) Male egg-laying in tanks where mussels were infected with both strains *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and *Vibrio splendidus* 3G1_6 at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}) (black arrows). No spawning in negative controls (white arrowhead), or in mussels infected with both strains at the lowest concentration (10^5 CFU mL^{-1}) (black arrowheads). (B) Female egg-laying sediment in tanks where mussels were infected with both strains at the highest concentration. Dead male (C) and female (D) mussel with remnants of gametes not expelled into the mantle (un-spawned gametes) (*).....183
Figure 60 : Parasites copépodes appartenant à l'espèce *Mytilicola intestinalis* retrouvés dans certaines moules mortes durant les expérimentations d'infections expérimentales. 193
Figure 61 : Moules parasitées par des sporocystes de trématodes digénétiques au niveau des branchies (A) et des métacercaires et/ou rédies au niveau du manteau (B). Observations des « sacs » orangés à la loupe binoculaire (C et D) avec la ventouse orale (flèche bleue), l'*acetabulum* ou ventouse ventrale (flèche verte) et le pore excréteur (flèche blanche) particulièrement bien visibles. 194
Figure 62 : Micrographes d'hémolymphe normale de moule. (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Les deux types hémocytaires sont bien visibles : les granulocytes (flèches noires) et les hyalinocytes (flèche vertes) ; ainsi que le comportement normal d'agrégation des hyalinocytes (*). Coloration : MGG.....203
Figure 63 : Micrographes d'hémolymphe de moule partiellement néoplasique (type P d'après Burioli *et al.* (2019)). (A) Faible grossissement (x100). Des hémocytes normaux sont visibles : granulocytes (flèches noires) et hyalinocytes (flèches vertes) ainsi que des hémocytes néoplasiques (flèches jaunes). (B) Fort grossissement (x500) avec mesures des granulocytes (¤), des hyalinocytes (#) et des hémocytes néoplasiques (*) chez qui le(s) nucléole(s) sont visible(s) (flèches rouges). Coloration : MGG 204
Figure 64 : Micrographes d'hémolymphe de moule totalement néoplasique (type U d'après Burioli *et al.* (2019)). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG 205
Figure 65 : (A) Exemple de deux préparations cytologiques d'hémolymphes colorées au MGG : à gauche, une hémolymphe contenant une grande quantité d'hémocytes uniquement néoplasiques ; à droite, une hémolymphe contenant des hémocytes normaux. (B)

Prélèvements d'hémolymphes pleinement néoplasiques avec un aspect trouble et légèrement coloré. 206
Figure 66 : Micrographes d'hémolymphe de moule prélevée en octobre 2018 montrant des hémocytes normaux, des spermatozoïdes (flèches noires) et des morulae de cellules germinales (flèches vertes). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG. 207
Figure 67 : Hémolymphe de moule contenant des bactéries (flèches noire). Des cellules néoplasiques (type P) sont visibles (flèches jaunes) ainsi que leurs nucléoles (flèches rouge). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG 208
Figure 68 : Prévalence de la néoplasie hémocytaire entre juin et décembre 2018 dans deux stocks de moules, de plus d'un an, cultivées à Agon-Coutainville (50). Moules captées à Noirmoutier (orange) et à l'île Dumet (bleu) au printemps 2017. Les droites en pointillés représentent les droites de tendance dont les équations sont indiquées en haut à droite du graphique. 210
Figure 69 : Prévalence de la néoplasie hémocytaire entre février et septembre 2019 dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50). Moules captées à Noirmoutier (orange) et à l'île Dumet (bleu) au printemps 2018. Les droites en pointillés représentent les droites de tendance dont les équations sont indiquées en haut à droite du graphique. 211
Figure 70 : Prévalence de la néoplasie hémocytaires dans 4 stocks de moules captées à Noirmoutier et à l'île Dumet au printemps 2017 ou 2018 et respectivement suivies entre juin et décembre 2018 ou entre février et septembre 2019. 212
Figure 71 : Pourcentages de moules néoplasiques parmi les moules survivantes originaires de Noirmoutier, à T2mois et T4mois : (A) Moules mises en contact ; (B) Moules témoins. Les effectifs exacts sont indiqués au-dessus des barres (moule(s) nouvellement néoplasique(s) / total des moules analysées en cytologie). 213
Figure 72 : Pourcentages de moules néoplasiques parmi les moules survivantes originaires de l'île Dumet, à T2mois et T4mois : (A) Moules mises en contact ; (B) Moules témoins. Les effectifs exacts sont indiqués au-dessus des barres (moule(s) nouvellement néoplasique(s) / total des moules analysées en cytologie). 214
Figure 73 : Taux de mortalité cumulée observés pour les quatre expérimentations de mise en contact (MEC1 à MEC4) réalisées avec des moules prélevées entre juin et novembre 2018. (A) Moules originaires de Noirmoutier et (B) de l'île Dumet. Les différences statistiques entre les barres sont notifiées par un système de lettres ; les barres qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes (Chi-2 d'homogénéité entre MEC et

Témoins, aucune différence significative ; puis test de Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Wilcoxon entre MEC1, 2, 3 et 4). 215
Figure 74 : Profil de cytométrie en flux de l'hémolymphe d'une moule néoplasique comportant 62,9 % d'hémocytes hyperploïdes de ploïdie 10n. (A) nuage de point IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) histogramme count / IPVIOLET-A (CV % pic 2n = 6,1 % et CV % pic 10n = 3,2 %). 219
Figure 75 : Profil de cytométrie en flux de l'hémolymphe d'une moule néoplasique comportant 60,9 % d'hémocytes hyperploïdes : 21,5 % de ploïdie 10n et 39,4 % de ploïdie 15n. (A) nuage de point IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) histogramme count / IPVIOLET-A (CV % pic 2n = 7,9 %, CV % pic 10n = 5,8 % et CV % pic 15n = 5,6 %).....219
Figure 76 : Profils de cytométrie en flux donnant le pourcentage d'hémocytes dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) : (A) profil d'une moule non néoplasique avec 3,51 % des hémocytes en phase S-G2/M ; (B) profil d'une moule non néoplasique avec 13,41 % des hémocytes en phase S-G2/M. Les CV % de chacun des pics sont ≤ 10 %.....220
Figure 77 : Pourcentages de cellules en phase S-G2/M pour chacune des moules des deux stocks analysées entre février et mai 2019. A chaque mois, et pour chacun des stocks, les pourcentages moyens de cellules en phase S-G2/M sont indiqués ainsi que les effectifs analysés en cytométrie en flux (n). * seuil de population de 6 % ayant plus de 10 % d'hémocytes en phase S-G2/M défini par Benabdelmouna & Ledu (2016) 221
Figure 78 : Référentiel de qualification des mortalités établi grâce aux données du réseau REMOULA 2000-2010 de l'Ifremer. Figure modifiée d'après celle de Robert *et al.* (2016, p. 52). 234
Figure 79 : Prélèvement de l'hémolymphe et préparation des lames de cytologie. 255
Figure 80 : Préparation des béchers avec de l'eau de mer (EDM) naturelle et bullages prêts à recevoir les moules infectées. En ligne, les 5 origines étudiées, en colonne les 5 conditions expérimentales testées (témoins négatifs ; moules infectées avec la souche 1 à 10^4 CFU, moules infectées avec la souche 1 à 10^7 CFU ; *idem* pour la souche 2). 267
Figure 81 : Graphiques (nuages de points) IPBLEU-H / IPBLEU-A (A) et IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) générés à la suite de l'analyse d'un échantillon normal (A) et néoplasique (B) permettant d'éliminer les doublets de cellules (en-dessous de la surface diagonale). ...277
Figure 82 : Graphiques (histogrammes) count / IPBLEU-A et count / IPVIOLET-A générés à la suite de l'analyse d'un échantillon normal (A) et néoplasique (B). 277

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production mytilicole française en 2016 et 2017. D'après les données du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (Agreste, 2019). 48

Tableau 2 : Production mytilicole par bassin de production conchylicole pour les années 2016 et 2017. D'après les données du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (Agreste, 2019). 49

Tableau 3 : Plan d'échantillonnage du suivi des mortalités de moules de Bretagne Nord. *NA* : données indisponibles. 86

Table 4 : Information on study sites, sampling dates and number of mussels used for each analysis. 93

Table 5 : Target genes, primers (forward (Fw) and reverse (Rv)) and probe (Pr) used for detection of known bivalve molluscs pathogens. 98

Table 6: Trace element concentrations (mg/kg w.w.) in mussel tissues collected from three bays in northern Brittany: Brest (BRE), Lannion (LAN) and St. Brieuc (STB), in February 2017, and in Brest in April and September 2017. Limit of detection: < 0.002 mg/kg). *ML: Maximum Level set by the Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 amended by (EC) No. 629/2008 and (EC) No. 420/2011.* 109

Tableau 7 : Mortalité cumulée par lots supplémentaires à la date de l'échantillonnage et à la fin du suivi (octobre 2017) et moyennes des données biométriques. 127

Tableau 8 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en éléments traces mesurés par ICP-MS dans les tissus de moules des lots supplémentaires. Limite de détection < 0,002 mg/kg ; NA : non disponible (manque de tissus) ; ND : non détecté ; DET : détecté. 130

Tableau 9 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en pesticides apolaires mesurés par GC-MS/MS dans certains des lots de l'étude. NA : non disponible (manque de tissus) ; ND : non détecté. 130

Tableau 10 : Résultats (pos/neg) des PCR classique et temps réel pour les deux gènes de virulence (*R5.7* et *rtxA*) pour les souches de *V. splendidus* isolées dans les lots de moules de Brest, Lannion et Saint-Brieuc en février et mai 2017 137

Tableau 11 : Liste des déclarations de mortalités de moules pour le bassin conchylicole Normandie-Mer du Nord, répertoriées dans le cadre du REPAMO pour les années 2017 et 2018. NR : donnée non renseignée. Sources : REPAMO - Bulletins de la surveillance - Janvier à Décembre, 2017 (Canier *et al.*, 2018) et 2018 (Combette, 2018). 151

Tableau 12 : Principales observations histopathologiques dans des moules provenant de prélèvements réalisés à la suite de déclarations de mortalités dans le bassin mytilicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018. INF : infiltrations hémocytaires ; GRA :

granulocytomes ; LES : lésions diverses ; NEC : zones de nécrose ; NEO : néoplasie hémocytaire (totale ou partielle) ; DES : déstructuration des organes et/ou des tissus..154
Tableau 13 : Principales observations cytologiques sur des hémolymphes de moules provenant de prélèvements réalisés à la suite de déclarations de mortalités dans le bassin mytilicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018. NEO : néoplasie hémocytaire (totale ou partielle) ; BAC : présence de bactéries ; GAM : présence de gamètes ou de cellules germinales ; ABS : absence de granulocyte ; BRW : présence de *brown cells*.....155
Tableau 14 : Résultats des amplifications par PCR classique du gène *rpoB* de la bactérie *Francisella halioticida* et du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) d'un apicomplexe, dans les lots de moules provenant de déclarations de mortalités en 2017 et 2018. Les moules étaient généralement toutes moribondes ou vivantes, parfois les deux états étaient constatés ou alors il était parfois difficile à établir.....158
Table 15 : Bacterial load of pure bacterial suspension (BL) used to make the dilutions used for each bacterial challenge, and number of infected mussels, total dead mussels and strain-positive dead mussels in each condition tested for every monthly experiment. S1: *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and S2: *Vibrio splendidus* 3G1_6; C1: dilution 1:10 (10-1) and C2: dilution 1:10,000 (10-4). 176
Tableau 16 : Plan d'échantillonnage pour le suivi de la néoplasie par cytologie et/ou par cytométrie en flux, dans des stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) pour les saisons de production 2018 et 2019. *NA : prélevement non réalisé* 202
Tableau 17 : Effectifs de moules néoplasiques (partiellement ou totalement ainsi que le type de néoplasie, P ou U) dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) suivis entre juin et décembre 2018. No : moules captées à Noirmoutier ; ID : moules de pelisse captées à l'île Dumet. Les pourcentages d'individus néoplasiques comprennent les moules partiellement et totalement néoplasiques. 209
Tableau 18 : Effectifs de moules néoplasiques (partiellement ou totalement ainsi que le type de néoplasie, P ou U) dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) suivis entre février et septembre 2019. No : moules captées à Noirmoutier ; ID : moules de pelisse captées à l'île Dumet. Les pourcentages d'individus néoplasiques comprennent les moules partiellement et totalement néoplasiques. 210
Tableau 19 : Effectifs de moules mortes (par origine, par condition et par expérimentation) dans les intervalles entre les suivis intermédiaires à T2mois et les suivis finaux à T4mois. Les effectifs sont indiqués comme suit : moule(s) morte(s) néoplasique(s) / total moule(s) morte(s). 216
Tableau 20 : Détection de la néoplasie par cytologie (et type de néoplasie, P ou U) et cytométrie en flux avec indication des pourcentages d'hémocytes hyperploïdes et ploïdie(s) associée(s). ID : île Dumet ; No : Noirmoutier. 218

Tableau 21 : Proportions de moules classées en fonction de leurs pourcentages d'hémocytes en phase S-G2/M. [*] seuil de population de 6 % ayant plus de 10 % d'hémocytes en phase S-G2/M défini par Benabdelmouna & Ledu (2016).....222
Tableau 22 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en éléments traces mesurés par ICP-MS dans les tissus de moules cultivées à Agon-Coutainville et prélevées en avril 2019. 223
Tableau 23 : Composition du fixateur Davidson.....253
Tableau 24 : Couple d'amorces utilisées pour la détection de *Francisella halioticida* (Brevik *et al.*, 2011).....261
Tableau 25 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°1 (Thompson *et al.*, 1997) 263
Tableau 26 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°2.....264
Tableau 27 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°3.....264
Tableau 28 : Plan d'échantillonnage des expérimentations réalisées entre juin et décembre 2018.....269
Tableau 29 : Plan d'échantillonnage des expérimentations réalisées entre février et mai 2019. *NA : prélevement non réalisé.* 271
Tableau 30 : Planning des expérimentations de mise en contact (MEC) et suivi de l'évolution de la néoplasie dans les moules. 273
Tableau 31 : Solution de marquage des hémocytes pour l'analyse en CMF (quantité pour 20 échantillons).....275

Liste des abréviations, des sigles et des acronymes

A

AOP · Appellation d'Origine Protégée

ARS · Agence Régionale de la Santé

C

CMABio3 · Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie

CMF · Cytométrie en flux

CNC · Comité National de la Conchyliculture

CRC · Comité Régional de la Conchyliculture

Creaa · Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole

CV · Coefficient de Variation

D

DDTM · Direction Départementale des Territoires et de la Mer

DORIS · Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatique

E

EDM · eau de mer

EDMAS · Eau De Mer Artificielle Stérile

EPI · Équipements de protection individuelle

G

GC-MS/MS · Chromatographie gazeuse couplée spectrométrie de masse

H

HIS · Hybridation *in situ*

I

ICP-MS · Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

Ifremer · Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INPN · Inventaire National du Patrimoine Naturel

IPN · *Infectious Pancreatic Necrosis*

ISTPM · Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes

L

LC/Q -TOF · Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à temps de vol

LER · Laboratoires Environnement Ressource

M

MEA · *Modified Eugon Agar*

MEC · Mise en contact

MET · Microscopie Électronique à Transmission

MGG · May-Grünwald Giemsa

MLSA · Multilocus Sequence Analysis

MNHN · Muséum National d'Histoire Naturelle

MORBLEU · MORtalités de moules BLEUes

MUSCLE · Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation

Mytilobs · Réseau national d'observation de la moule bleue

N

NF · Norme Française

NGS · *Next Generation Sequencing*

O

OIE · Organisation Mondiale de la Santé Animale

R

REPAMO · RÉseau de surveillance des PAthologies des MOllusques

RNC · Rapport nucléo-cytoplasmique

ROCCH · Réseau d'Observation de la Contamination CHimique

S

Smel · Synergie Mer & Littoral

Smidap · Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire

STG · Spécialité Traditionnelle Garantie

T

TCBS · Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose

W

WoRMS · *World Register of Marine Species*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Moules et mytiliculture en France et en Europe

La mytiliculture[14] est par définition, l'élevage ou la culture des moules. Elle est la plus ancienne des cultures marines avec l'ostréiculture (Lambert, 1935 ; Lubet & Dardignac, 1976). C'est « un métier dans lequel la nature guide les pas de l'homme » (Mahé, 1994).

1. Histoire de la mytiliculture

Le berceau de la mytiliculture se situe à l'embouchure de la Sèvre Niortaise, dans une anse circonscrite par les communes de l'Aiguillon, de Charron, d'Esnandes et de Marsilly : la baie de l'Aiguillon (Figure 1).

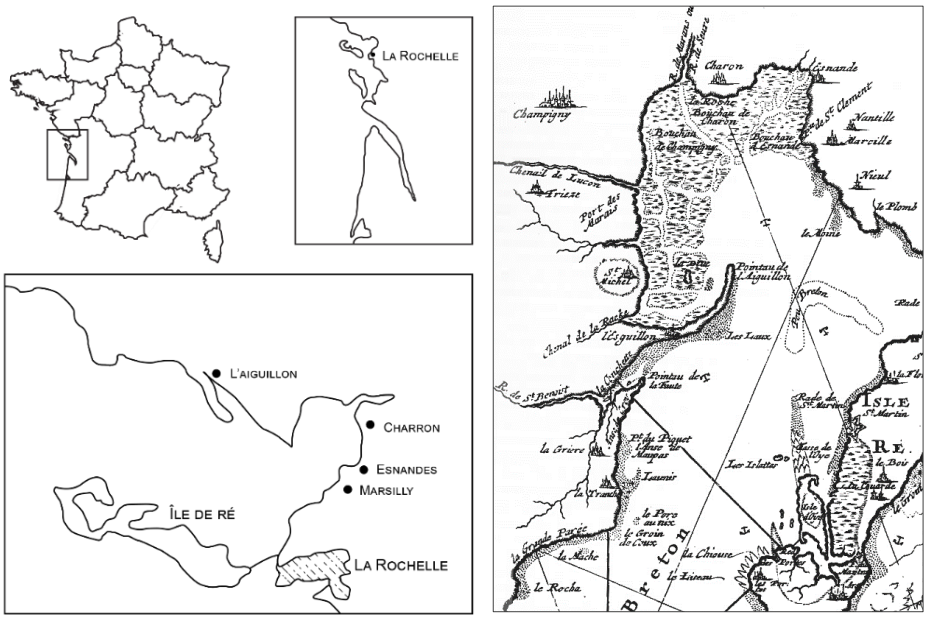


Figure 1 : Baie de l'Aiguillon. A gauche, localisation de la baie de l'Aiguillon de nos jours (adaptée de Mahé (1994) avec ajout du découpage administratif du territoire français en 2019). A droite, la baie de l'Aiguillon au début du XVIII[e] siècle avec indication des bouchots, orthographiés « Bouchau » (coll. BMLR, C I, 53, *Carte de la Généralité de La Rochelle,* dans Mahé (1994)).

La technique de culture sur bouchots, déjà évoquée par certains auteurs du XVIII[e] siècle (Arcère, 1756 ; Mercier-Dupaty, 1750), remonterait au moins au XVI[e] siècle (Mahé, 1994). En effet, Lancelot du Voisin, sieur de La Popelinière, soulignait déjà à cette époque l'existence de cette technique si particulière. L'origine de cette culture sur bouchots reste malgré tout incertaine. Il existe néanmoins une légende, créée par Charles-Marie d'Orbigny en 1835, qui raconte qu'un Irlandais, Patrick Walton, naufragé à Esnandes en 1235, serait à l'origine de cette technique. Pour se nourrir, Walton aurait tendu des filets entre des pieux de

[14] Terme officiellement apparu en 1890 (Mahé, 1994).

bois plantés verticalement dans la vase en vue de capturer les oiseaux qui nichaient dans la baie. Il aurait ainsi constaté la fixation de naissains de moules sur ces pieux : les bouchots à moules étaient nés. Cependant, il semble que cette histoire « ne repose sur aucun document valable, mais uniquement sur des affirmations gratuites » (Papy, 1941). Dans son ouvrage, Mahé (1994) retrace la genèse de ce récit, souligne les incohérences, et met en évidence les lacunes bibliographiques existantes au sujet de cette histoire. Il apparait alors que d'Orbigny aurait inventé cette légende de l'écossais providentiel, dans le but de contrer un projet d'aménagement de la baie. En effet, à cette époque, un banquier parisien sollicitait la concession gratuite de la baie de l'Aiguillon pour y construire une digue, assécher la baie et y installer une activité agricole. Comme Mahé le dit lui-même, « il est fréquent au XIX^{e} siècle que l'Histoire soit "aménagée" à des fins idéologiques, mais la démarche de ce savant [Charles-Marie d'Orbigny] est plus "humaine". ». Il semble effectivement que d'Orbigny ait eu gain de cause grâce à ce passé aux allures légendaires et aurait ainsi permis de préserver la baie de l'Aiguillon, ses habitants, et leur activité mytilicole.

La mytiliculture s'est d'abord limitée à la baie de l'Aiguillon jusqu'au XIX^{e} siècle pour ensuite gagner les régions littorales voisines. L'importance de l'ostréiculture dans la quasi-totalité des secteurs maritimes n'avait jusque-là pas laissé la place à la mytiliculture, et dans ces régions, les moules étaient simplement pêchées sur les rochers lors des grandes marées (Binet, 1999). Il aura alors fallu attendre la seconde moitié du XIX^{e} siècle pour que la mytiliculture se développe de manière conséquente en France et en Europe. C'est d'abord aux Pays-Bas qu'elle connut un développement exponentiel à la suite de l'appauvrissement des gisements naturels surexploités, vers 1860. En créant des moulières artificielles en eaux peu profondes, les néerlandais sont ainsi devenus les pionniers de la culture des moules à plat ou sur parc, méthode qui dominera l'industrie mytilicole jusque vers 1950 (Lubet, 1974).

À partir des années 1960, c'est en France que la mytiliculture connait une vive expansion. En effet, l'amélioration des moyens de transport et des méthodes de conservation a entraîné une augmentation de la consommation à l'échelle nationale. En conséquence, les surfaces exploitées ont été étendues et les techniques d'élevage, de même que le matériel utilisé, se sont très rapidement améliorés. C'est à ce moment-là que s'amorce l'essor de hauts lieux de la mytiliculture contemporaine, comme la baie du Mont-Saint-Michel[15] par exemple, marquant ainsi les débuts de la conquête des côtes bretonnes et normandes par la culture des moules.

[15] Les premiers bouchots y sont implantés en 1954.

Dans les années 1970, la mytiliculture menée sur les côtes de la Manche a connu une progression colossale et sa production dépassait du double celle réalisée sur la façade atlantique (Lubet, 1974). C'est également à cette période qu'en Espagne et en Italie, des méthodes singulières de culture en suspension sur corde se sont développées ; ces méthodes étaient tout particulièrement adaptées aux mers sans, ou à faibles marées. En parallèle, la mytiliculture française a poursuivi son expansion au nord du pays, vers les côtes de la mer du Nord, où des bouchots ont finalement été installés sur le littoral des Hauts-de-France dans les années 1980. Enfin, les premiers bouchots en baie de Somme ont été implantés en 1981, puis à partir de 1983 sur la côte d'Opale.

2. Espèces cultivées : *Mytilus* spp.

a. *Classification phylogénétique*[16]

Le genre *Mytilus* comprend sept espèces : *Mytilus edulis, Mytilus galloprovincialis, Mytilus trossulus, Mytilus californianus, Mytilus coruscus*, *Mytilus platensis* et *Mytilus chilensis*.

REGNE : Animalia
SOUS-REGNE : Eumetazoa
CLADE : Bilateria
INFRA-REGNE : Protostomia
CLADE : Lophotrochozoa
PHYLUM : Mollusca
CLASSE : Bivalvia
SOUS-CLASSE : Pteriomorphia
ORDRE : Mytilida
SUPER-FAMILLE : Mytiloidea
FAMILLE : Mytilidae
GENRE : *Mytilus*
ESPECES : *Mytilus* spp.

[16] Classification d'après les Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatique (DORIS ; Didierlaurent *et al.*, 2017) et d'après le registre mondial des espèces marines (*World Register of Marine Species* (WoRMS) ; http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138228).

b. Répartition géographique

Les espèces du genre *Mytilus* sont largement répandues dans le monde entier et présentent une distribution « amphitropicale », c'est-à-dire que leurs distributions sont disjointes de chaque côté des tropiques (Figure 2).

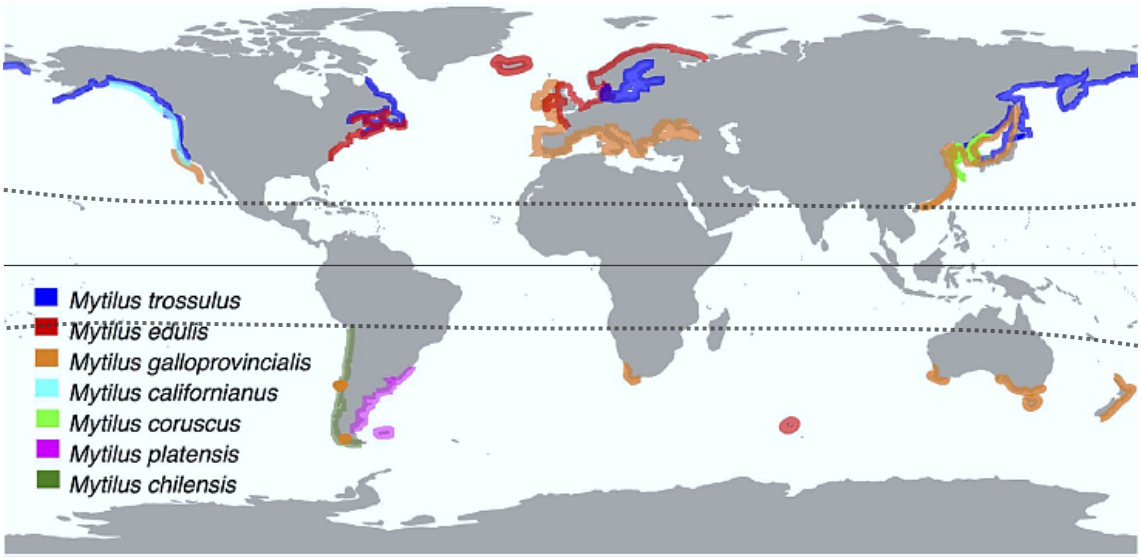


Figure 2 : Répartition géographique des espèces du genre *Mytilus.* Adaptée de Gaitán-Espitia *et al.* (2016) avec ajout des tropiques du Cancer et du Capricorne (en lignes pointillées), respectivement au nord et au sud de l'Équateur (ligne continue).

Parmi les cinq espèces présentes dans l'hémisphère nord, trois sont retrouvées en Europe et sont étroitement liées : la moule commune, *M. edulis*, la moule méditerranéenne, *M. galloprovincialis* et *M. trossulus*[17]. Ces espèces sont en effet capables de s'hybrider partout où leurs aires de répartitions se chevauchent (Gosling, 1992) et où une espèce non-native a été introduite *via* le trafic maritime ou l'aquaculture (Bierne *et al.*, 2003). Ces trois espèces sont regroupées sous l'appellation générique « moules bleues » (« *the blue mussel complex* » en anglais).

Le long des côtes européennes occidentales, les deux espèces indigènes sont aussi celles qui y sont cultivées. *Mytilus edulis* est présente dans les eaux froides à tempérées (mer du Nord, Manche, mer Celtique et côtes atlantiques françaises et irlandaises) avec une limite sud de répartition au niveau du golfe de Gascogne, à proximité de la frontière franco-espagnole. *Mytilus galloprovincialis*, quant à elle, se retrouve plutôt dans les eaux chaudes à tempérées (mer Méditerranée et côtes atlantiques espagnoles). Cependant, il existe une zone au niveau de la mer Celtique et de l'embouchure ouest de la Manche, dans laquelle on retrouve

[17] Espèce qui ne possède pas de nom vernaculaire.

M. galloprovincialis comme espèce autochtone, et non *M. edulis* (Fly *et al.*, 2015 ; Figure 3). Pour les côtes bretonnes, seuls les mytiliculteurs de ces secteurs faisant leur propre captage de naissains localement, cultivent réellement cette espèce dans ces eaux, ce qui est relativement rare.

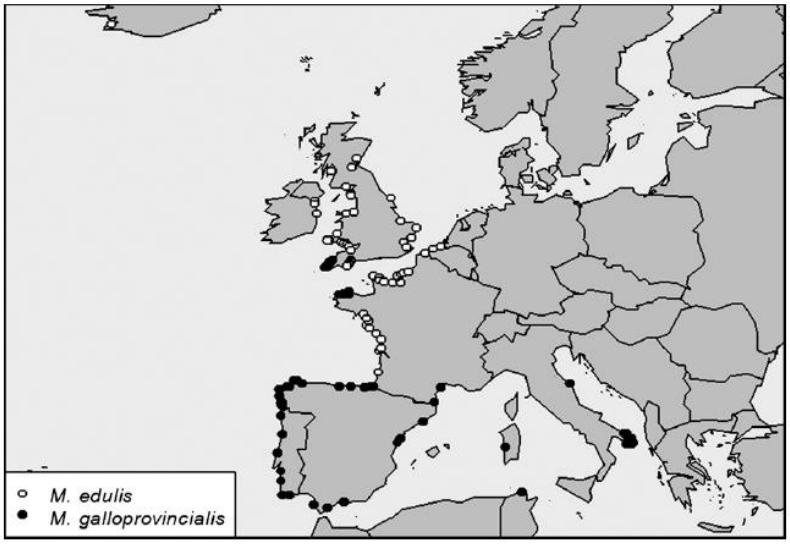


Figure 3 : Répartition de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* en Europe occidentale. Les auteurs n'ont considéré que les populations d'espèces « pures » (95 % du génotype *M. edulis* ou *M. galloprovincialis*). (Fly *et al.*, 2015)

Ces alternances de populations naturelles de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* impliquent des chevauchements de leurs aires de répartition. Ainsi, de ces chevauchements découlent des zones hybrides « *edulis/galloprovincialis* » dans lesquelles on retrouve des populations avec des marqueurs génétiques caractéristiques de *M. edulis* et de *M. galloprovincialis* dans différentes proportions (Bierne *et al*., 2003 ; Figure 4).

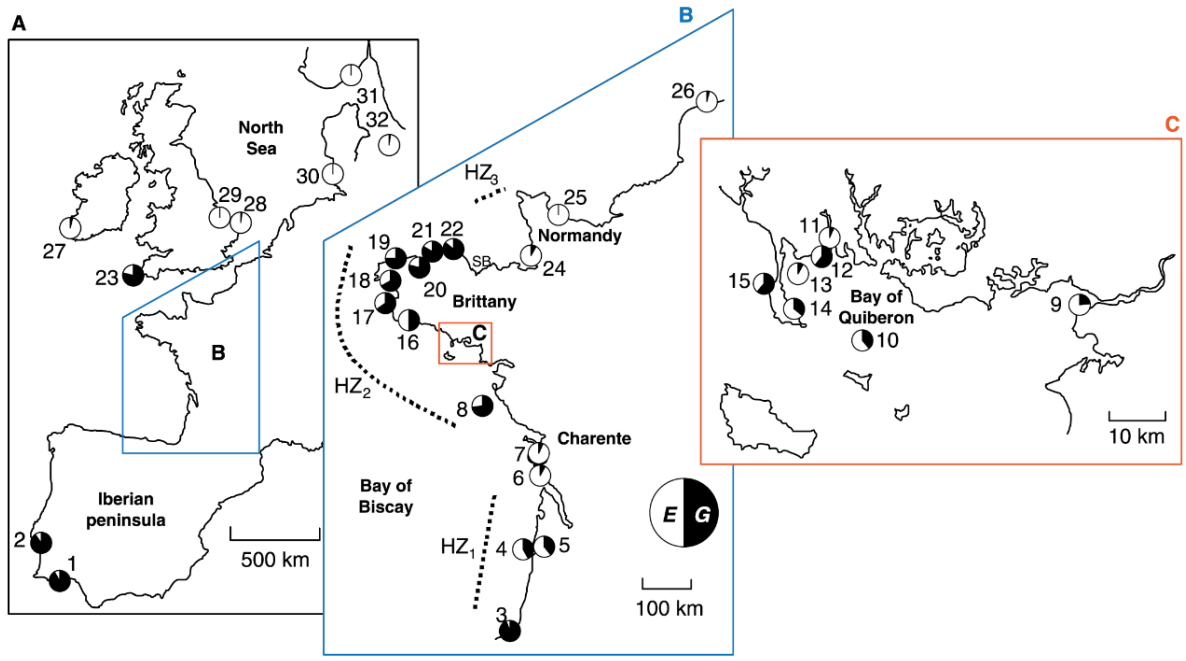


Figure 4 : Fréquences alléliques caractéristiques de *Mytilus edulis* (E) et de *Mytilus galloprovincialis* (G) dans les populations de moules de l'Atlantique Nord-Est. Secteurs d'échantillonnage : (A) Europe de l'Ouest ; (B) côtes ouest françaises ; (C) baie de Quiberon. HZ1, HZ2 et HZ3 correspondent à des zones hybrides distinctes comportant des populations génétiquement intermédiaires. (Figure modifiée issue de Bierne *et al.* (2003) ; voir *ibid.* pour la correspondance des numéros et des villes.)

c. *Biotope*

Les moules sont des animaux grégaires qui s'agglomèrent entre eux ; de la sorte, ils sont mieux protégés des prédateurs et des courants. Ces bivalves sont eurythermes, euryhalins, supportent l'exondation et résistent aux déplacements parfois violents des masses d'eau. Ces différentes caractéristiques ont permis aux moules de coloniser des habitats très diversifiés : fixées sur tous types de supports naturels durs (substrats rocheux, cailloux, coquillages) ou artificiels (coques de bateaux, pipeline, etc.), elles sont retrouvées des zones intertidales, jusqu'aux eaux profondes océaniques, en passant par les zones estuariennes. Leur limite basse de distribution est principalement conditionnée par la prédation et leur limite haute par la dessiccation (Suchanek, 1978). *Mytilus edulis* tolère des températures très basses allant jusqu'à des températures négatives et au gel (Aarset, 1982) quant à *M. galloprovincialis,* sa limite basse de température est de 7-8 °C (Lubet, 1973). Pour les températures maximales létales, elles avoisinent les 29-30 °C pour les deux espèces (Almada-Villela *et al.*, 1982) – même s'il semble qu'elles puissent supporter des températures encore supérieures, mais uniquement pendant un temps court (Cawthorne, 1979). La gamme de température optimale pour ces espèces est comprise entre 15 et 20 °C, c'est d'ailleurs dans cet intervalle que le taux de filtration est à son maximum (His & Cantin, 1995). Pour ce qui est de la salinité, les moules

tolèrent également de très larges gammes allant jusqu'à 43 ‰ et la limite basse est de 19 ‰ pour *M. galloprovincialis,* et de 7-10 ‰ pour *M. edulis* (Lubet, 1973). *Mytilus edulis* est donc plus adaptée aux milieux saumâtres comme les baies et les estuaires. D'une manière générale, il apparait que *M. edulis* est beaucoup moins exigeante et supporte de plus grandes variations de températures et de salinités que *M. galloprovincialis* qui requiert plus de constance.

d. Cycle biologique

Le cycle biologique des moules est annuel et est fonction des conditions environnementales (température et nourriture, principalement ; Gosling, 2003 ; Saraiva *et al.*, 2012). Il comporte plusieurs étapes : croissance, gamétogénèse/maturation des gamètes, ponte, repos sexuel/restauration des réserves, rétablissement des gonades, et ainsi de suite. Les moules sont capables de se reproduire dès leur première année de vie et en l'absence de tout élément perturbateur (prédation, conditions climatiques défavorables, pauvreté ou déséquilibre trophique, parasites, maladies, etc.) ; une moule peut vivre entre 15 et 20 ans (Theisen, 1973 ; Seed, 1976).

La moule est un animal gonochorique ; à maturité les gonades s'hypertrophient, envahissent le manteau, et à ce stade les animaux mâles sont généralement différenciables des animaux femelles (Figure 5 ; Gosling, 2003 ; Mikhailov *et al.*, 1995, 1996). En effet, le manteau des animaux se colore progressivement au cours de la gamétogénèse et en fin de maturité, le manteau est charnu, gorgé de spermatozoïdes ou d'ovocytes. Un manteau rouge-orangé indique une femelle tandis qu'un manteau blanc, ou jaune pâle, indique un mâle. Cependant, ce dimorphisme sexuel est un sujet de débat au sein de la communauté scientifique car il existerait un pourcentage d'erreur non négligeable avoisinant les 10 % (Angel P. Diz, données non publiées, 2019).

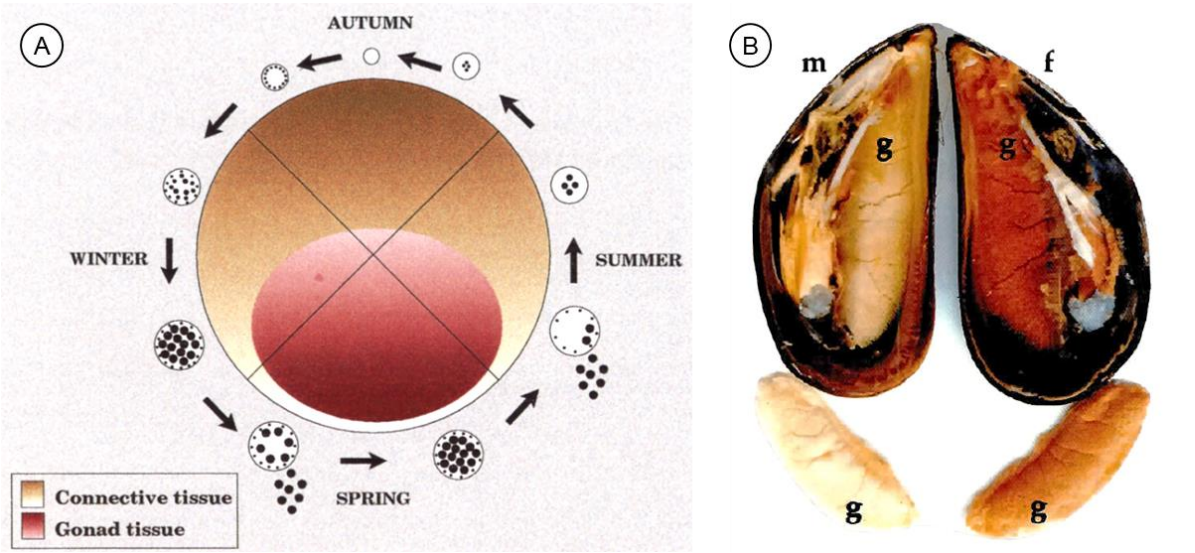


Figure 5 : Evolution du tissu conjonctif/gonadique chez *Mytilus* sp. au cours de l'année. (A) Schéma de la dynamique du cycle annuel du tissu conjonctif/gonadique du manteau de la moule ; le cycle périphérique représente les follicules gonadiques à différentes périodes du développement, de la maturation et de la régression des gonades (Mikhailov *et al.*, 1996) ; (B) Moules male (m) et femelle (f) avec gonades (g) mâtures (Mikhailov *et al.*, 1995).

Lorsque les animaux sont mûrs et les conditions environnementales propices, la ponte est enclenchée et les gamètes sont relâchés dans l'eau. La présence de gamètes dans l'eau fournit un puissant stimulus chimique aux congénères matures qui n'auraient pas encore pondu ; compte tenu du fait que les moules vivent agglomérées, la fécondation se fait aisément. Cette fécondation est externe et donne des larves microscopiques planctoniques vagiles. La vie pélagique des larves dure une trentaine de jours en moyenne, et durant cette période, différents stades larvaires se succèdent (trochophore, véligère-D, pédivéligère). Ensuite, c'est la période de fixation, aussi appelée période de recrutement : la larve a perdu son vélum et ses capacités de nage, un pied apparait, elle devient ainsi compétente pour la métamorphose. Elle se fixe alors au substrat puis devient une moule juvénile (Figure 6).

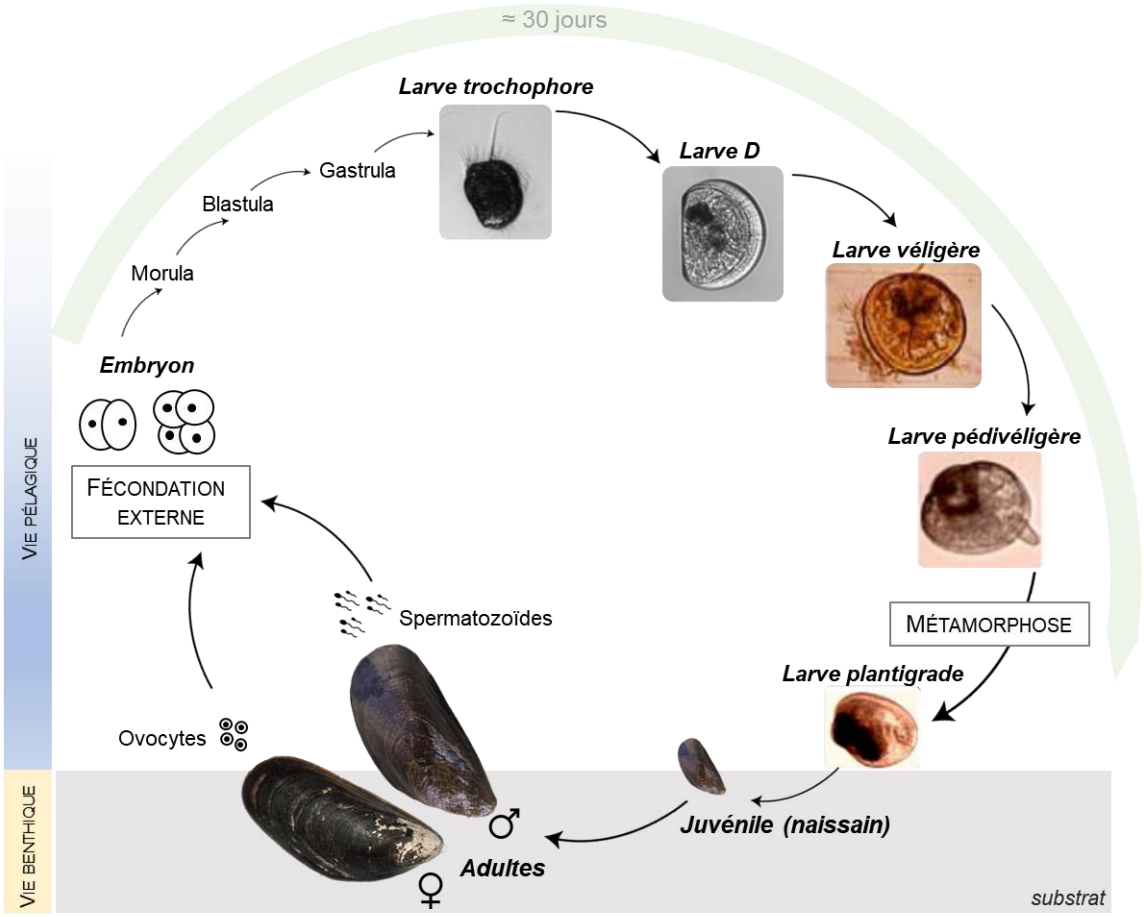


Figure 6 : Cycle biologique des moules. (Les photographies des différents stades larvaires sont issues de Jahangard *et al.* (2010) et Ventura *et al.* (2016).

Les cycles sexuels de *M. edulis* et de *M. galloprovincialis* diffèrent en termes de saisonnalité. De plus, la temporalité de ce cycle peut varier selon les individus, le lieu, l'année tant il est influencé par de nombreux facteurs extérieurs (Lubet, 1959, 1973 ; Devauchelle, Barret & Salaun, 1995 ; Gosling, 2003 ; Gosling, 2003 ; Saraiva *et al.*, 2012). Néanmoins, les mêmes grandes étapes sont généralement retrouvées. Nous prendrons, comme exemple, le cycle sexuel décrit par Lubet en 1959 pour les moules (*M. edulis*) des côtes de la Manche :

- *Stade 0* : phase de repos sexuel (de juillet à septembre). Le tissu de réserve est très développé ; les tubules gonadiques quant à eux le sont très peu, ils sont non fonctionnels et contiennent des cellules germinales quiescentes.

- *Stade I* : phase transitoire de différenciation et de multiplication des gonies (de septembre à octobre).

- *Stade II* : phase de développement intense de la gamétogénèse (de novembre à décembre). Les tubules gonadiques sont bien développés, les gonies entrent en méiose et les premiers gamètes sont formés. Les ovocytes accumulent les réserves vitellines jusqu'à la maturation ; le tissu de réserve, encore présent, s'appauvrit.

- *Stade III* : stade qui comprend la période de reproduction.
    - *III-A1* : les gamètes sont mûrs mais les animaux sont encore insensibles aux stimuli déclencheurs de la ponte (de décembre à janvier).
    - *III-A2* : les animaux répondent aux stimuli, ils sont à l'état de maturité absolue (de janviers à février).
    - *III-B* : les tubules gonadiques se vidangent.
    - *III-C* : restructuration de la gonade. Les cellules germinales précoces de seconde génération se développent. A ce stade le tissu de réserve est drastiquement réduit. Un nouvel état de maturité stade III (C-A1 ; C-A2) se produit et de nouvelles pontes ont lieu (de mars à avril).
    - *III-D* : le manteau devient translucide et rougeâtre. La lyse des gamètes résiduels est faite par les hémocytes qui envahissent les tissus. Les tubules réduisent de taille et le tissu de réserve se reconstitue (accumulation de réserves glucidiques et lipidiques). C'est la phase de pré-repos sexuel (juin).

Un cycle très similaire a été décrit par Boromthanarat *et al.* (1987) pour les moules de bouchot cultivées dans le bassin de Marennes-Oléron ; ce qui montre que, d'une région à l'autre, et d'une population de *M. edulis* à l'autre, le cycle est comparable. Notons toutefois que les conditions environnementales – telles que la température et la richesse trophique – sont des éléments clés influençant sur le développement gonadique (Saraiva *et al.*, 2012) ; ainsi, ce cycle saisonnier relativement fixe et stable, décrit par Lubet il y a soixante ans, mérite d'être reconsidéré et nuancé au regard des variations saisonnières contemporaines.

De plus, il apparait important de préciser ici que la ponte est une étape charnière du cycle de vie de la moule ; c'est un processus qui consomme une grande quantité d'énergie. Pendant cette période, les moules sont affaiblies avec des réserves en glycogène épuisées, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux agressions extérieures (Bayne & Worrall, 1980; Myrand, Guderley & Himmelman, 2000).

e. Anatomie

Les moules sont constituées de deux valves coquillières – de tailles similaires et jointes entre elles par un ligament qui fait office de charnière – qui servent de protection et de support aux tissus mous. L'ouverture et la fermeture de ces valves sont contrôlées par les muscles adducteurs antérieur et postérieur, qui nécessitent tous deux d'être sectionnés afin d'observer les tissus de l'animal (Figure 7).

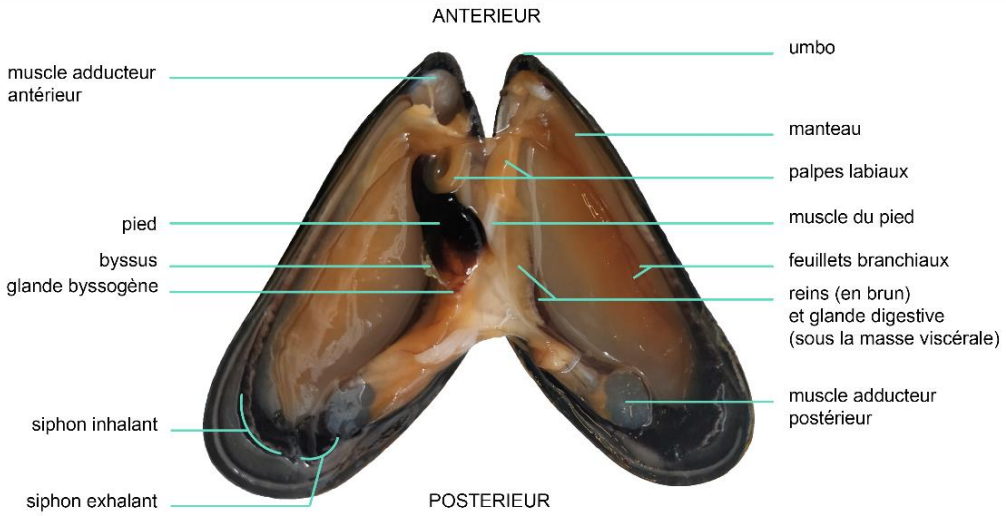


Figure 7 : Anatomie interne de la moule. © Maud Charles

Mytilus edulis et *M. galloprovincialis* sont deux espèces assez distinctes morphologiquement (Figure 8). *Mytilus edulis*, avec sa coquille courbée, peut atteindre ~10 cm de longueur maximale quand *M. galloprovincialis*, avec sa coquille plus anguleuse, atteint aisément les ~15 cm de long. Le manteau de *M. galloprovincialis* est sombre – noir violacé – avec des bords festonnés pourpres tandis que celui de *M. edulis* est beige clair avec des bords festonnés brunâtres. Cependant, comme décrit précédemment, des hybrides existent, c'est pourquoi de nos jours, l'utilisation du seul critère morphométrique pour déterminer l'appartenance à une espèce est obsolète.

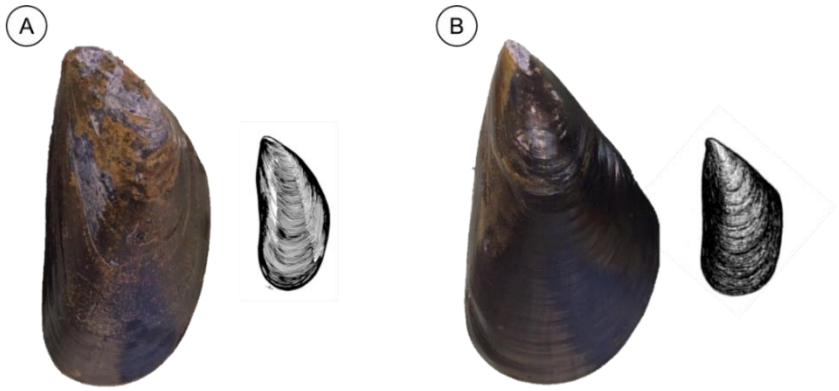


Figure 8 : Morphologie externe des moules, *Mytilus edulis* (A) et *Mytilus galloprovincialis* (B). Photos (© Maud Charles) et dessins d'illustration (www.fao.org/fishery/species/2688 et /3529)

f. Respiration et alimentation[18]

Lorsque les moules sont immergées, un échange quasi permanent est assuré avec le milieu permettant d'assurer les échanges gazeux, la prise en charge de la nourriture et l'évacuation des déchets. Ce courant est créé par l'ondulation des feuillets branchiaux et par les cils vibratiles des cellules branchiales ; l'eau entre par le siphon inhalant – marron clair, doté de petits tentacules dentelés qui permettent un premier tri grossier des particules – et ressort par le siphon exhalant – blanc, lisse et ovale – qui évacue également les déchets. Ces deux siphons sont visibles au niveau de l'ouverture postérieure de l'animal (Figure 9).



Figure 9 : Moules (*Mytilus edulis*) immergées filtrant l'eau. Les siphons inhalants et exhalants sont particulièrement bien visibles ; les flèches indiquent le sens du courant créé par l'animal. © Maud Charles

[18] Les informations contenues dans cette section sont principalement tirées de His & Cantin (1995) et de Gosling (2003).

Les moules sont des animaux microphages suspensivores, couramment appelés « filtreurs », qui s'alimentent grâce à l'eau qui traverse leur cavité palléale. L'alimentation se fait *via* le piégeage et l'acheminement des particules planctoniques accumulées dans le mucus – sécrétés par les branchies – jusqu'aux palpes labiaux. Les palpes labiaux effectuent un tri des particules en fonction de la taille : les plus gros éléments ne sont pas ingérés et sont éliminés sous forme de pseudo-fèces, les plus petits sont amenés jusqu'à l'orifice buccal à proximité, sont digérés puis éliminés par le tube digestif sous forme de fèces. La taille optimale des particules ingérées par les moules est comprise entre 4 et 8 µm ; mais selon les conditions, les animaux peuvent ingérer des particules allant jusqu'à 100 µm, pour les plus grosses, et jusqu'à moins d'un micron pour les plus petites. Les taux de pompage et de filtration dépendent de nombreux paramètres : la densité et la taille des particules planctoniques présentes, les paramètres physico-chimiques de l'eau et enfin l'âge et l'état physiologique de l'animal. Pour *M. edulis*, le taux de filtration est en moyenne de 3 L/h. Au sein du plancton, les moules consomment principalement des diatomées et des dinoflagellés. Les bactéries sont aussi une source de nourriture, mais très largement secondaire par rapport aux microalgues ; leur consommation augmente lorsque la ressource en algues est retreinte. Néanmoins, leur taille – comprise entre 1 et 5 µm – fait qu'elles sont aisément ingérées par les bivalves. D'une manière générale, les « filtreurs » sont connus pour accumuler fortement les micro-organismes, ainsi les moules possèdent une flore bactérienne qui reflète les micropopulations du milieu (Preheim *et al.*, 2011). Ceci est aussi valable pour les contaminants chimiques, c'est d'ailleurs pour cela (en plus de leur très large distribution) que les moules font partie des organismes sentinelles, utilisés dans les programmes de surveillance de la qualité du milieu[19].

Le courant décrit précédemment permet également à l'animal de respirer grâce à une paire de branchies qui capte l'oxygène dissous. Cet oxygène est ensuite distribué dans l'intégralité de l'organisme via le système circulatoire, c'est la respiration aérobie. Lorsque cette dernière est insuffisante, que les conditions du milieu sont défavorables, ou pendant les périodes d'exondation, l'animal utilise l'énergie produite par la dégradation de ses tissus de réserves[20], c'est l'anaérobiose.

g. Appareil circulatoire et hémocytes

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire constitué d'un cœur dorsal postérieur, d'où partent une aorte antérieure et une aorte postérieure qui se ramifient dans tous les tissus. Ce système circulatoire, composé d'hémolymphe, est dit « ouvert » car les plus

[19] Comme par exemple, le programme « *Mussel Watch* » aux Etats-Unis.
[20] Principalement constitués de glycogène.

petits vaisseaux débouchent directement dans des sinus, ou lacunes, baignant directement les organes et les cellules. L'hémolymphe, incolore, est composée de cellules circulantes, les hémocytes, qui s'infiltrent dans tous les tissus de l'animal. Ces hémocytes occupent des fonctions essentielles dans plusieurs processus physiologiques : échanges gazeux, osmorégulation, transport et digestion des nutriments, élimination des déchets, réparation de la coquille et cicatrisation des blessures et défenses immunitaires (Cheng, 1984 ; Gosling, 2003). Ces cellules ont, d'une manière générale, un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie. Parmi toutes ces fonctions primordiales, les hémocytes sont d'abord connus pour leur rôle dans la phagocytose (Hanington *et al.*, 2010), l'encapsulation (Loker *et al.*, 1982) et la production de molécules cytotoxiques impliquées dans l'élimination des organismes pathogènes (Lacchini *et al.*, 2006 ; Humphries & Yoshino, 2008) ; plus généralement tout ce qui a trait à l'immunité. L'élévation de la densité hémocytaire dans le système circulatoire et l'infiltration des hémocytes dans les tissus sont les deux réponses immédiates généralement observées à la suite d'une perturbation (infection, blessure, contamination) (Renwrantz, 1990 ; Coles *et al.*, 1995 ; Pipe *et al.*, 1999 ; Mayrand *et al.*, 2005).

Il apparait dans la littérature que la caractérisation des différentes populations hémocytaires existantes chez les mollusques bivalves, est sujet à débat depuis de nombreuses années. A l'heure actuelle, il n'existe pas de système universel de classification accepté par la communauté scientifique.

Les deux premiers « modèles », qui sont encore aujourd'hui modifiés et discutés, sont attribuables à Cuénot (1891) et à Takatsuki (1934). Le premier évoquait trois catégories d'hémocytes : une première pour les hémocytes dépourvus de granules (hyalinocytes ou agranulocytes) et deux pour les hémocytes granuleux (granulocytes) en fonction de la taille des granules (granules fines ou larges). Le deuxième quant à lui, décrivait deux catégories : des plus gros hémocytes avec granules (les granulocytes) et des plus petits hémocytes avec très peu de cytoplasme et sans granules (les hyalinocytes). Ces classifications ont évolué au fil des années ; il a notamment été évoqué que les différentes méthodes de fixations des cellules[21] pouvaient altérer la morphologie des cellules et des granules (Jordan, 1952), ou encore que les différences de taille des granules pouvaient refléter des stades différents de développement ou de différenciation de la cellule (Cheng, 1984). Ainsi, la classification de Cuénot (1891) apparaissait plus discutable, pourtant Pipe en 1990, soutenait ce modèle à deux types de granulocytes en fonction de la taille des granules pour *M. edulis*. La classification de Takatsuki (1934) quant à elle, a été améliorée. En effet, des auteurs ont observé des affinités différentes de coloration entre les granulocytes ; certains possédaient

[21] Pour la microscopie optique.

des granules basophiles et d'autres des granules éosinophiles ou acidophiles (Dundee, 1953 ; Narain, 1972 ; Hazleton & George, 1977). Une des hypothèses était alors que les granulocytes basophiles étaient des « jeunes » granulocytes et une fois matures, ils devenaient éosinophiles (Cheng, 1984). En 1977, Moore & Lowe définissaient cette fois deux sous-populations de hyalinocytes – toujours sans granules – chez *M. edulis* en fonction de la taille : entre 4 et 6 µm pour les plus petits, entre 7 et 10 µm pour les plus grands, et toujours plus petits que les granulocytes (7-12 µm). Rasmussen *et al.* (1985) puis Carballal *et al.* (1997) – respectivement chez *M. edulis* et chez *M. galloprovincialis* – ont étayé et agrémenté le modèle de Takatsuki. Ils ont défini trois classes de granulocytes, non pas en fonction de la taille des granules, mais en fonction de leur propriété de coloration : granulocytes acidophiles, granulocytes basophiles et granulocytes contenant un mélange des deux. Le Foll *et al.* (2010), quant à eux, ont décrit chez *M. edulis* des hémocytes basophiles « semi-granulaires » qu'ils ont classé dans les hyalinocytes. Plus récemment, Burioli *et al.* (2019) ont observé chez *Mytilus* spp., deux types de hyalinocytes, à l'instar de Moore & Lowe (1977), ainsi que des granulocytes basophiles et acidophiles, comme Carballal *et al.* (1997) et Rasmussen *et al.* (1985). En revanche, ils n'ont pas observé de granulocytes avec un mélange des deux types de granules.

D'une manière générale, la plupart des auteurs s'accordent sur l'existence de ces deux principaux types hémocytaires (Hine, 1999 ; Pila *et al.*, 2016) :

- ***Les granulocytes*** ; ils ont un rapport nucléo-cytoplasmique (RNC) faible, ils sont habituellement mononucléés (mais peuvent parfois être binucléés), avec un noyau excentré sphérique, et contiennent dans leur cytoplasme, des granules de taille variée aux propriétés de coloration différentes constituant deux sous-populations : (i) les granulocytes basophiles, aux granules bleues foncées, qui sont considérablement moins nombreux que (ii) les granulocytes acidophiles, aux granules roses considérées comme des formes de lysosomes opérant lors de la phagocytose des bactéries, des algues, des parasites protozoaires, ou encore des débris cellulaires. Ce dernier sous-type de granulocytes constitue la majeure partie des hémocytes circulant au sein de l'hémolymphe et concentre presque à lui seul toute l'activité de phagocytose.

- ***Les hyalinocytes*** ou ***agranulocytes*** ; ils ont un RNC élevé, ne possèdent pas de granules et peuvent être divisés en deux sous-groupes : (i) les cellules à noyau central ovoïde entouré d'un bord de cytoplasme peu abondant (cellules blastiques) ; (ii) les cellules à noyau excentré ovoïde, réniforme ou irrégulier et un cytoplasme plus abondant. Il semble qu'ils n'aient pas de capacité de phagocytose et leur fonction reste encore méconnue.

Chez les bivalves, la composition de l'hémolymphe peut varier en fonction de plusieurs facteurs externes ou internes : saisonnalité (Soudant *et al.*, 2004), pollution (Coles, Farley & Pipe, 1995 ; Auffret *et al.*, 2006), présence d'organismes pathogènes (da Silva *et al.*, 2008 ; Parisi *et al.*, 2008), cycle gamétogénétique (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2009) ; et d'après Auffret *et al.* (2006), les changements dans la numération des hémocytes sont des effets précoces et non-spécifiques des altérations physiologiques.

Des phagocytes contenant des granules jaune brun, communément appelées « *brown cells* », sont parfois retrouvés dans l'hémolymphe, agrégées au niveau des lésions ou entourant des parasites (Huehner & Etges, 1981 ; Sagristá, Durfort & Azevedo, 1995). La présence de lipofuscine dans les granules – qui leur donne cette coloration – indique une activité lysosomale. Ils sont particulièrement présents chez les mollusques se trouvant dans des eaux polluées (Zaroogian & Yevich, 1993) et certains auteurs ont observé un rôle dans le métabolisme des ions métalliques (Zaroogian & Anderson, 1995) et dans la détoxification (Zaroogian & Voyer, 1995). Il semble que ces cellules aient une origine différente de celles des hémocytes et constitueraient un type cellulaire distinct de ces derniers (Moore & Lowe, 1977 ; Hine, 1999).

D'une manière générale, les informations sur les rôles et fonctions des différents types hémocytaires – qui restent eux-mêmes à asseoir – demeurent incomplètes, tout comme le tissu ou la niche hématopoïétique, ainsi que les lignées cellulaires qui demeurent non caractérisées.

3. Exploitation des moules

a. Méthodes et techniques d'élevage

i. Captage du naissain

La culture des moules est basée sur l'exploitation du cycle biologique naturel des animaux. Ainsi, chaque année, les mytiliculteurs profitent de la saison de reproduction pour effectuer le recrutement (ou captage) des larves de moules, qui après une courte vie planctonique, cherchent un substrat pour se fixer. Au printemps – pour *M. edulis* –, les mytiliculteurs disposent sur l'estran des cordes en fibre de noix de coco tressées qui servent de collecteurs pour les larves en leur offrant un support de fixation adéquat pour leur développement en naissains (Figure 10). Trois régions conchylicoles totalisent à elles seules 98 % de la production de naissains de *M. edulis* : 54 % de la production nationale est apportée par les Pays de la Loire, 36 % par le Poitou-Charentes et 8 % par la Bretagne Sud ; pour *M.*

galloprovincialis, le captage se fait quasi exclusivement en Méditerranée (Alim'agri, 2017). Un peu plus de 80 % des achats de naissains de *M. edulis* sont faits par la Bretagne Nord, la Normandie et les Hauts-de-France.



Figure 10 : Cordes en fibre de noix de coco fixées entre les pieux de bouchots pour le captage.
Source : https://www.crc-pays-de-loire.fr

Ces cordes nouvellement ornementées de petites moules d'environ 1 cm, sont ensuite transférées au cours de l'été dans les différents bassins de production et, en attendant d'être disposées sur les pieux, ces cordes sont déposées sur des « chantiers » (Figure 11). La technique du captage sur cordes a été mise au point vers 1960 et a très vite remplacé la méthode de captage direct sur pieux, devenue obsolète (Bouhier, 1998). L'invention de cette technique a fortement contribué à l'expansion de la mytiliculture en Bretagne et en Normandie. Quelques rares mytiliculteurs de Bretagne, de Normandie et du Nord réalisent eux-mêmes leur captage, mais cela n'assure pas une quantité suffisante de naissains. Ainsi, ils complètent systématiquement leurs stocks en s'approvisionnant en Vendée et en Charente-Maritime.



Figure 11 : Cordes garnies de naissains déposées sur les « chantiers » en attendant d'être disposées sur les pieux de bouchots (Bricqueville-sur-Mer (50), août 2017).
Photos © Maud Charles

ii. Dédoublage et boudinage

Au cours de la croissance, certaines moules grossissent plus vite que d'autres et tendent à former des « paquets » qui risquent de se détacher du support. De plus, ces moules excédentaires gênent la croissance des moules de la couche inférieure. Ainsi, pour rééquilibrer la densité de mollusques et éviter la perte de ces grappes, le mytiliculteur récupère cet excédent, c'est le « dédoublage » des cordes. Il procède ensuite à la « mise en boudins » de ces moules qui sont alors appelées « moules de pelisse ». Ces boudins de pelisse de 2,5 m de long sont, à l'instar des cordes de naissains, transférés dans les zones de productions.

iii. Culture sur bouchots

La culture sur bouchots est la méthode d'élevage traditionnelle[22] de la moule et l'essentiel de la production française en est issu (~ 80 % ; FranceAgriMer, 2014) . Les bouchots sont formés de piquets en bois d'environ 5 m de hauteur enfoncés dans le substrat intertidal qui ressortent de 2 à 3 m de la grève. Un bouchot est composé d'une centaine de pieux disposés en rangée de 50-60 m de long (Figure 12A). Les rangées sont parallèles entre elles et perpendiculaires à la côte ou orientées dans le sens du courant[23]. Lorsque les mytiliculteurs reçoivent leurs cordes de naissains, ou leurs boudins de pelisse, ils les entourent autour des pieux et une nouvelle saison commence tandis que la précédente se termine (Figure 12B et Figure 12C). Les tempêtes, avec tout ce que cela implique – vent, houle, courant forts – peuvent entrainer la chute des moules ; de même, il arrive que les moules se détachent pour diverses raisons. Pour pallier ces décrochages, les mytiliculteurs enfilent sur leurs bouchots des filets en plastique, plusieurs fois au cours de la saison de production, c'est le catinage.

[22] Dans le langage courant, les mytiliculteurs sont appelés « boucholeurs ». D'un point de vue historique et culturel, il existe d'ailleurs plusieurs communes, fortement marquées par la culture mytilicole, qui possèdent une rue ou une avenue des boucholeurs : c'est le cas d'Esnandes et de Marsilly, dans la baie de l'Aiguillon, de Châtelaillon, dans le pertuis d'Antioche, ou encore du Vivier-sur-Mer dans la baie du Mont-Saint-Michel.

[23] L'agencement des bouchots n'a pas toujours été ainsi. D'abord en « V » et clayonnés, ils étaient disposés pointant vers la côte ou vers le large, de manière relativement désordonnée. L'augmentation de la densité des pieux, des animaux, et l'envasement accéléré que cela engendrait a progressivement conduit à l'interdiction du clayonnage et à l'aménagement strict et ordonnancé des bouchots que nous connaissons aujourd'hui.

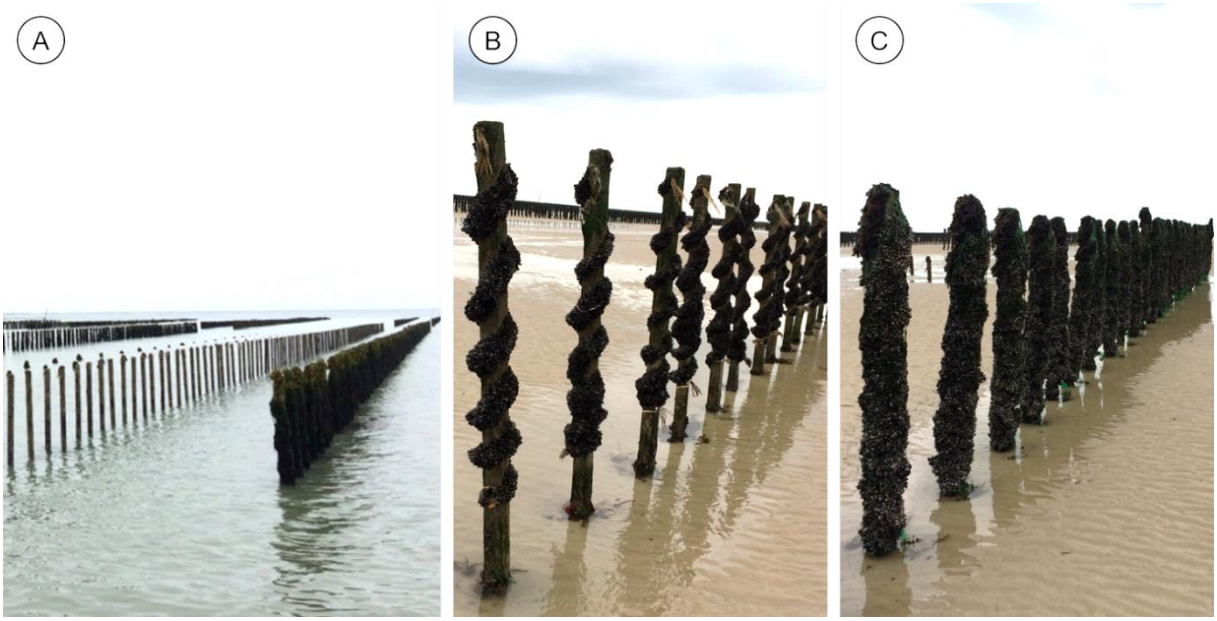


Figure 12 : Pieux de bouchots à Bricqueville-sur-Mer (Manche) (septembre 2017). (A) Alignements de pieux de bouchots ; (B) Pieux supportant des cordes de naissains nouvellement installées (moules de moins de 6 mois) ; (C) Pieux intégralement recouverts de moules de 18 mois et plus (prêtes à être récoltées).
Photos © Maud Charles

iv. Culture sur cordes ou sur filières

L'élevage en suspension (Figure 13) s'est initialement développé en Europe avec *M. galloprovincialis*, dans les mers sans ou à faibles marées (comme la mer Méditerranée, ou la mer Adriatique) (Lubet & Dardignac, 1976). Dans les régions où les eaux sont calmes, dans les baies protégées, les étangs littoraux, ou encore dans les milieux lagunaires (comme dans l'étang de Thau), les cordes – de 3 à 5 m – sont suspendues à des grands cadres en bois, appelés « tables », ou à des radeaux (Espagne) (Figure 13A et Figure 13B) . En France, l'élevage sur filière en haute mer a été initié au début des années 70 dans le but de coloniser de nouveaux espaces de production mytilicole (Bompais, 1991). En eau profonde, les cordes sont suspendues à un support horizontal (une aussière) comportant des flotteurs qui sont ancrés à des poids morts au fond de l'eau, c'est la culture « sur filières » (Figure 13A et Figure 13C).



Figure 13 : Différentes méthodes existantes d'élevage en suspension. (A) Différents types de culture en suspension existants ; (B) Corde en suspension sous radeau dans l'étang de Thau (Occitanie). (C) Filière en pleine mer dans la baie de Lannion (Côtes-d'Armor).
Source des schémas de culture : http://www.fao.org

v. Culture à plat ou sur parcs

L'élevage à plat ou sur parcs, repose sur le recrutement naturel local ou sur le transfert de naissains (réensemencement), pêchés dans des gisements naturels denses, à des zones de cultures tidales ou subtidales abritées, où ils sont éparpillés dans des moindres densités. Au cours du cycle d'élevage, les mytiliculteurs surveillent la croissance de leurs moules et se débarrassent de la prédation ainsi que des macroalgues (FAO, 2009). Cette technique est principalement utilisée aux Pays-Bas et n'est plus que très peu répandue en France. Elle a été utilisée après la seconde guerre mondiale mais a rapidement était dépassée par l'expansion des cultures sur bouchots et sur filières. Certains secteurs utilisent encore cette technique[24] mais les tonnages restent très faibles et ceci se fait généralement en complétement d'une seconde activité conchylicole.

b. Production des régions mytilicoles françaises

Le littoral français est découpé en sept régions de production conchylicoles : Normandie-Mer du Nord, Bretagne Nord, Bretagne Sud, Pays de la Loire, Poitou-Charentes, Arcachon-Aquitaine[25] et Méditerranée (Figure 14). Les conchyliculteurs présents dans ces bassins de production sont regroupés au sein d'un Comité Régional de la Conchyliculture (CRC) et au niveau de l'ensemble du territoire français, les CRC sont représentés par le Comité National de la Conchyliculture (CNC).

[24] Voir *infra*, section I.3.b.
[25] Cette région de production, Arcachon-Aquitaine, ne sera pas davantage évoquée dans la suite dans la mesure où son activité est intégralement dédiée à l'ostréiculture.



Figure 14 : Régions de production conchylicoles.
Source : http://www.cnc-france.com

i. Normandie-Mer du Nord

La principale zone de production de moules de bouchots en Normandie, sur laquelle plus de 80 producteurs sont présents, se trouve à l'ouest du département de la Manche (Annexe I, p. 302) ; elle s'étend de Pirou à Donville-les-Bains en comprenant l'archipel de Chausey où on compte 7 producteurs. Le second secteur de production se situe dans la baie des Veys au niveau d'Utah Beach et compte moins d'une vingtaine de producteurs. Ces deux secteurs fournissent respectivement 16 500 et 1 000 tonnes de moules par an en moyenne[26]. Dans la région des Hauts-de-France, la mytiliculture est présente de la baie de Somme (commune de Crotoy) aux bancs de Flandres (Dunkerque et Zuydcoote) en passant par la côte d'Opale et une vingtaine d'entreprises sont dénombrées. En baies de Somme et d'Authie (Berck), la culture se fait sur bouchots et produit entre 2 000 et 3 000 tonnes de moules par an. Sur la côte d'Opale, de Dannes à Oye-Plage, 1 500 tonnes de moules sont produites sur bouchots et 14 tonnes à plat (à Ambleteuse et Wimereux). Enfin, 600 tonnes en moyenne sont produites sur filières au niveau des bancs de Flandres depuis 2007 (CRC Normandie-Mer du Nord, com. pers., juin 2019).

[26] D'après le site internet du CRC Normandie-Mer du Nord http://www.huitres-normandie.com/carte-interactive-des-moules.

ii. Bretagne Nord

Les sites d'exploitation s'enchaînent sur les 600 km de côtes reliant la baie du Mont-Saint-Michel à la rade de Brest. Les principaux sites d'élevage sont : la baie du Mont-Saint-Michel, la baie de Saint-Brieuc et les baies de la Fresnaye et de l'Arguenon ; elles représentent respectivement 55 %, 23 % et 13 % des 17 500 tonnes de moules produites en moyenne par an en Bretagne Nord. La rade de Brest quant à elle, fournit un peu moins de 1 000 tonnes annuelles. Sur l'ensemble de la production, 94 % des moules sont produites sur bouchots (Deydier, 2016). Le reste est essentiellement cultivé sur filières dont une faible partie provient du captage effectué localement, comme en baie de Lannion ; dans ces rares cas, c'est l'espèce indigène, *M. galloprovincialis* qui est alors cultivée.

iii. Bretagne Sud

De la baie de Douarnenez au nord de l'estuaire de la Loire, le CRC Bretagne Sud compte une quarantaine de mytiliculteurs. Plus des trois quarts (30-35 producteurs) cultivent sur bouchots dans l'estuaire de la Vilaine (à Pénestin) et le restant cultive à plat, au niveau de la rivière de l'Aven (3-4 producteurs), ou sur filières, au niveau de l'île de Groix, de l'île Dumet et de l'île d'Houat (respectivement 1, 1 et 2 producteurs) (CRC Bretagne Sud, com. pers., juin 2019). Leur production s'élevait à 3 500 tonnes sur la saison 2015-2016 (CNC, 2016).

iv. Pays de la Loire

En Pays de la Loire, la mytiliculture est principalement concentrée sur quatre secteurs : le bassin de Pen Bé, le littoral de la Plaine-sur-Mer, l'île de Noirmoutier et une partie du pertuis Breton (La Tranche-sur-Mer, La Faute-sur-Mer et l'Aiguillon-sur-Mer). La profession compte ~ 90 entreprises qui pratiquent presque toutes la culture sur bouchots et plus de 50 % de ces bouchots sont situés dans le pertuis Breton. En supplément de leurs bouchots, 18 % des producteurs des Pays de la Loire cultivent sur filières : ~ 37 km de filières sont comptabilisés dont 54 % à l'île Dumet et 38 % dans le pertuis Breton (entre l'île de Ré et La Faute-sur-Mer). En 2009-2010 leur production était d'environ 5 700 tonnes (CRC Pays de la Loire, 2012). Les Pays de la Loire ne sont pas une grosse région productrice de moules, mais c'est en revanche le principal secteur naisseur national avec le bassin Poitou-Charentes. En effet, pour certaines entreprises, la moitié des cordes posées pour le captage de naissains est destinée à la commercialisation dans d'autres bassins de production (comme ceux de la Bretagne et de la Normandie-Mer du Nord) ; au total, 20 % des entreprises ne font que de la production de naissains, le restant de leur activité étant basé sur l'ostréiculture.

v. Poitou-Charentes

Entre le sud de la région productrice des Pays de la Loire et le nord de celle du Poitou-Charentes, la frontière est étroite puisqu'elle se trouve en plein cœur du pertuis Breton. Ainsi, dans la partie basse du pertuis Breton, la production de moules se fait essentiellement sur bouchots sur l'estran des communes de la baie de l'Aiguillon. Dans le pertuis d'Antioche, les bouchots se trouvent au niveau de la baie d'Yves, d'Hiers-Brouage, de l'île d'Oléron (secteur Boyard) et de l'île d'Aix. Quelques filières sont également retrouvées au large de la baie d'Yves et le long de l'île d'Oléron (« filières de la Malconche »). Comme évoqué précédemment, cette région est davantage une région de production de naissains que de moules adultes de consommation. En 2012, 140 producteurs de moules étaient comptabilisés, parmi eux 90 faisaient du captage et en revendaient la moitié, 120 élevaient des moules qu'ils avaient eux-mêmes captées et une vingtaine étaient exclusivement « naisseurs ». En 2018, la région comptait une centaine de producteurs qui ont produit près de 12 000 tonnes de moules.

vi. Méditerranée

La Méditerranée étant une mer sans marée, la culture sur bouchot n'y est donc pas présente. Dans cette région, c'est *M. galloprovincialis* qui est cultivée depuis 1925, principalement sur tables dans l'étang de Thau, le reste est cultivé sur filières, en pleine mer. En moyenne, environ 5 000 tonnes sont produites annuellement, ce qui représente approximativement 10 % de la production nationale.

c. Production, valorisation et consommation

La consommation de coquillages par les habitants des régions littorales est très ancienne et a longtemps été exclusivement issue d'une activité de pêche réalisée sur les gisements naturels. Cependant, la production des gisements naturels est très hétérogène d'une année à l'autre pour de multiples raisons. Avec l'expansion de la mytiliculture au cours du XX^{e} siècle et une prise de conscience progressive sur la nécessité de gérer durablement les stocks sauvages, la proportion de moules d'élevage dans la production européenne globale (550 000 tonnes) n'a fait que s'accroitre. En vingt ans (de 1990 à 2010) elle est passée de moins de 80 % à plus de 90 % (Monfort, 2014).

En France, il faut 18 mois en moyenne pour obtenir une moule de taille commerciale ≥ 4 cm (définie par l'arrêté ministériel du 28 janvier 2013 / NOR : TRAM1240494A). La commercialisation est saisonnière puisqu'elle suit les rythmes biologiques des animaux : *M. galloprovincialis* est commercialisée à partir du printemps, de mars à août, tandis que *M. edulis* est commercialisée à partir de l'été, de juillet à décembre. Sur les plus de 50 000 tonnes de moules produites annuellement, 75 % sont cultivées sur bouchots et 85 % appartiennent à l'espèce *M. edulis* (Tableau 1).

Tableau 1 : Production mytilicole française en 2016 et 2017. D'après les données du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (Agreste, 2019).

Type	**Volume (tonne)**	
	2016	***2017***
Total de moules produites en France	50 339	51 432
• dont moules *M.edulis*	43 700	44 438
○ dont moules de bouchots	37 272	37 399
○ dont autres techniques	6 428	7 039
• dont moules *M. galloprovincialis*	6 639	6 994
○ dont moules de bouchots	596	559
○ dont autres techniques	6 043	6 434

D'après les données du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation pour les années 2016 et 2017, la Bretagne Nord est la première région productrice française avec plus de 40 % de la production mytilicole totale, viennent ensuite la Charente-Maritime et la Méditerranée, avec une contribution de 14 %, suivies de près par la Bretagne Sud et le Nord-Normandie, avec 11 %, puis viennent enfin les Pays de la Loire avec 8 % (Tableau 2).

Tableau 2 : Production mytilicole par bassin de production conchylicole pour les années 2016 et 2017. D'après les données du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (Agreste, 2019).

Région conchylicole	**Type**	**Volume (tonne)**	
		2016	***2017***
Nord-Normandie	Moules de bouchots	4 973	5 063
	Moules (autre technique), coques, palourdes et autres coquillages	427	410
Bretagne Nord	Moules de bouchots	19 287	19 995
	Moules (autres techniques)	1 884	2 850
Bretagne Sud	Moules de bouchots	4 327	4 307
	Moules *M. edulis* (autres techniques)	1 027	1 280
	Moules *M. galloprovincialis* (autres techniques)	76	71
Pays de la Loire	Moules de bouchots	3 828	3 600
	Moules (autres techniques)	450	405
Charente Maritime	Moules de bouchots	5 356	4 959
	Moules (autres techniques que bouchot)	2 013	1 885
Méditerranée	Moules *M. galloprovincialis* (autres techniques)	5 908	6 289
	Moules *M. edulis* (autres techniques)	919	522
	Moules de bouchots	95	34
	Somme	50 570	51 670

A la fin de chaque saison, tous les stocks des producteurs français sont écoulés ; en effet, la demande est plus de deux fois supérieure à l'offre. En moyenne, les français en consomment près de 3 kg/an/personne, ce qui en fait assurément l'un des produits de la mer les plus consommés en France (FranceAgriMer, 2014). Avec un peu plus de 50 000 tonnes produites par an (Agreste, 2019) – dont 98 % proviennent de l'élevage –, la France ne peut à elle seule satisfaire la demande et est obligée d'importer une grande partie des moules. Les deux plus gros pays qui alimentent le marché français pour la consommation directe, sont l'Espagne et les Pays-Bas (FAO, 2016) (Figure 15).

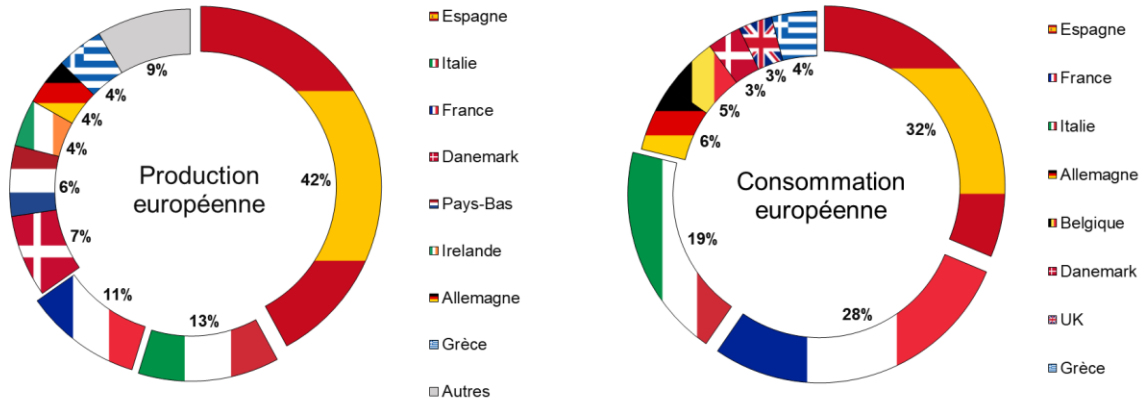


Figure 15 : Production et consommation européennes pour les principaux pays. D'après le regroupement de plusieurs sources de données (Monfort, 2014; FAO, 2016, 2018; Agreste, 2019).

La production mytilicole française se place au troisième rang européen en termes de volume, très loin derrière l'Espagne (~220 000 tonnes/an) et juste derrière l'Italie (>60 000 tonnes/an) (FAO, 2018). Ces trois pays représentent à eux seuls près des 2/3 de la production européenne (~ 550 000 tonnes), qui représente elle-même les 2/3 de la production mondiale (Monfort, 2014). Pour autant, la France occupe la première place au regard de la valeur du produit avec un chiffre d'affaires estimé à 133 millions d'euros pour 2017 (Agreste, 2019). En effet, au cours des dernières années, de nombreux professionnels de la filière mytilicole se sont engagés dans des démarches de labellisation afin de valoriser leurs produits, leur savoir-faire et leurs spécificités régionales. Ainsi, en 2013, la Commission européenne a reconnu les moules de bouchots comme une spécialité traditionnelle garantie (STG). Ce label européen est venu s'ajouter à l'appellation d'origine protégée (AOP) dont bénéficiaient, depuis 2011, les moules cultivées dans la baie du Mont-Saint-Michel. En 2015, ce fut au tour des moules de filières cultivées dans les pertuis d'acquérir leur titre de noblesse avec l'obtention du Label Rouge (Figure 16).



Figure 16 : Logos et labels européens (STG & AOP) et national (Label Rouge) détenus par certains mytiliculteurs français.

II. Menaces qui pèsent sur les moules et la profession mytilicole : nuisances et mortalités

La culture des moules se fait en milieu naturel, ouvert, sans apport de nourriture, de composés pharmaceutiques, ou de toute autre complément artificiel, ceci avec des populations variées d'origine naturelle, qui ne sont ni sélectionnées, ni modifiées, ni maitrisées. Tout cela contribue à la grande particularité de cette culture qui doit faire face aux multiples aléas de la nature, comme les variations des paramètres physico-chimiques de l'eau, les conditions hydro-climatiques particulières, la contamination biologique et la pollution des eaux ou encore, la diversité génétique et l'hybridation des populations naturelles, la prédation, les maladies, etc. Ce sont autant de facteurs plus ou moins contrôlables, généralement non anticipables et parfois difficilement mesurables, qui influent sur la santé des moules et dont dépend alors l'ensemble de la filière mytilicole.

Les sources de nuisance entravant le bon état physiologique des bivalves sont multiples et peuvent causer des dommages très variables en fonction du temps et de l'espace, soit d'une année à l'autre, d'une région à une autre, et même d'une zone d'élevage à une autre. Parmi ces nuisances, certaines d'entre elles sont aujourd'hui bien connues. Présentes parfois depuis des décennies, elles ont fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de les identifier, de les répertorier et de les documenter. Nous verrons que certaines d'entre elles peuvent être gérées grâce à des moyens de lutte ou de prévention et qu'en revanche, certains phénomènes inédits ou connus, peuvent *a contrario* s'avérer beaucoup plus complexes à maitriser.

1. Évènements climatiques exceptionnels

Au cours du dernier siècle, plusieurs événements climatiques extrêmes ont mis à rude épreuve la mytiliculture en France et dans d'autres pays d'Europe : températures hivernales glaciales, étés caniculaires, tempêtes (vents, courants violents et fortes houles), pluies abondantes ou déficit de précipitations. Bien qu'elles soient eurythermes et euryhalines, les moules peuvent alors se retrouver dangereusement proches de leurs limites de tolérance ou dans des eaux inhospitalières.

a. Hivers rudes ou profils hivernaux particuliers

Certains exemples, bien documentés, permettent de mettre en évidence ces profils atypiques. Par exemple, durant l'hiver 1928-1929, l'eau du *fjord* de Nybord (Danemark) a été recouverte de plusieurs centimètres de glace pendant plus de 3 mois, ceci a entrainé la mort de toutes les populations de moules présentes dans le *fjord* (Blegvad, 1930). De même, entre 1984 et 1987, dans la province du Friesland (Pays-Bas), des réductions drastiques des stocks ont été constatées par les mytiliculteurs ; ils ont rapidement pointé du doigt les hivers rudes mais Obert & Michaelis (1991) ont mis en évidence l'importance non négligeable d'autres facteurs aggravants comme l'accroissement des populations locales d'eiders et l'intensification de la pression de pêche sur les moules. En 1985, en baie de Somme, un phénomène très similaire s'est produit puisque l'hiver rigoureux a entrainé des pertes importantes (entre 30 et 50 % selon les secteurs) mais là-encore, des problèmes de prédation par les eiders et les macreuses avaient parallèlement été rapportés (Ropert & Olivési, 2002). Une nouvelle fois au Pays-Bas, cette fois dans la baie de Sylt-Rømø, les conditions climatiques très rudes de l'hiver 1995-1996 ont causé la disparition d'une grande partie des moules (Strasser, Reinwald & Reise, 2001). Enfin, l'épisode de mortalités qu'a connu la France en hiver 2014, dans le pertuis Breton, a en partie été associé à des conditions météorologiques particulières (Polsenaere *et al.*, 2017). En effet, d'après ces auteurs, cette période hivernale a été accompagnée d'événements orageux et pluvieux plus importants qu'à la normale, le tout agrémenté de températures de l'air et de l'eau relativement douces pour la saison. Toujours d'après Polsenaere *et al.* (2017), cela a entrainé un débit conséquent des affluents conduisant à des baisses de salinité importantes et à des pics notables de turbidité, ce qui a contribué à perturber des individus qui étaient déjà fragiles à cette période de l'année et d'autant plus affaiblis après un premier épisode de ponte.

b. Étés caniculaires

Les températures estivales élevées sont l'un des problèmes majeurs de la culture de moules (*M. galloprovincialis*) en Espagne (Ramón *et al.*, 2005). Par exemple, dans la baie des Alfacs, les températures dépassent aisément les 28 °C pendant plusieurs semaines, ce qui conduit à d'importantes mortalités estivales tandis que dans la baie de Fangar, les températures élevées sont moins courantes. Pourtant, lors d'épisodes caniculaires, comme en 2003, des mortalités peuvent également être rapportées. Cet été de 2003 a aussi été préjudiciable pour les moules (*M. edulis*) de la baie de l'Aiguillon (pertuis Breton), de la baie d'Yves et de l'île d'Aix (pertuis d'Antioche) ; les pertes estimées pour les mytiliculteurs représentaient, respectivement pour les deux pertuis, 66 % et 43 % de leur rendement normal

(Robert & Le Moine, 2003). Il est apparu que les conditions environnementales (températures de l'eau et de l'air, respectivement supérieures à 25 °C et égale à 34 °C) avoisinaient les limites hautes de tolérance de *M. edulis*. Couplée à ces conditions déjà difficiles, l'absence de pluie a maintenu une salinité élevée de 35 ‰ et a contribué à la pénurie d'éléments nutritifs dans l'eau. Pour finir, en août 2018, les mytiliculteurs de l'étang de Thau ont perdu la quasi-intégralité de leur production, mais les moules ne sont pas les seules concernées, les poissons et les huîtres ont également été touchés. Les conditions climatiques exceptionnelles ont été identifiées comme la cause de ces mortalités massives. En effet, d'une part les températures étaient élevées (> 30 °C) et d'autre part, l'absence de vent a, en partie, conduit à une mauvaise oxygénation de l'eau. Ce phénomène, appelé « la malaïgue » – pour « mauvaise eau » en occitan – s'était déjà produit en 2006.

2. Prédation naturelle

La prédation naturelle est une menace majeure pour la mytiliculture. En effet, bien que l'homme soit un grand consommateur de moules, il n'est cependant pas le seul à s'en nourrir ; comme tous chaînons du réseau trophique, les moules ont leurs prédateurs naturels. La prédation des moules par les étoiles de mer, les gastéropodes marins, et les crabes ont de nombreuses fois été constatées en Nouvelle-Angleterre, en Irlande et en Angleterre (voir Seed & Suchanek, 1992). En Normandie, déjà dans les années 70, d'importants dégâts causés par ces différents prédateurs avaient était répertoriés, sans oublier les oiseaux marins (Lubet, 1974 ; Lubet & Dardignac, 1976). Ces auteurs arguaient qu'engager une lutte contre ces prédateurs – bien que l'impact puisse être très néfaste pour les professionnels – était illusoire du fait de la nature même de la culture sur bouchots. Aujourd'hui encore, les préjudices causés par la prédation persistent et des moyens de lutte sont continuellement mis à l'étude afin d'essayer d'en limiter leurs effets.

a. Classe des Aves : le goéland argenté, les macreuses et l'eider à duvet

Les oiseaux consommateurs de moules (et autres mollusques) sont : le goéland argenté[27], la macreuse brune[28], la macreuse noire[29] et l'eider à duvet[30] (Figure 17). D'après

[27] *Larus argentatus*
[28] *Melanitta fusca*
[29] *Melanitta nigra*
[30] *Somateria mollissima*

l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN) du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), ils sont présents sur la quasi-totalité du littoral français (MNHN, 2003).



Figure 17 : Oiseaux consommateurs de moules. (A) Goéland argenté ; (B) Macreuses brunes femelle et mâle ; (C) Macreuses noires femelle et mâle ; (D) Eider à duvet femelle ; (E) Eider à duvet mâle. Source : www.oiseaux.net

Les goélands consomment des moules de petites tailles et ne sont pas des oiseaux plongeurs, ainsi ils s'attaquent aux jeunes moules au printemps et en été, pendant la marée basse (ONCFS & SRC Normandie-Mer du Nord, 2005a). Il n'est pas rare que certains mytiliculteurs rapportent des cordes entièrement arrachées des pieux sous l'effort exercé par les oiseaux pour extraire les moules (Mille, 2017). Les canards quant à eux, se nourrissent de toutes les tailles de moules, plutôt en période hivernale et étant plongeurs, ils sont capables de consommer toutes les moules présentent sur un pieu (ONCFS & SRC Normandie-Mer du Nord, 2005a). Une cohorte d'eiders comportant 40 à 50 oiseaux peut débarrasser une ligne entière de pieux (~110-150) en une marée (Goulletquer *et al.*, 1995). Depuis une quarantaine d'années, l'ouest du Cotentin – et plus particulièrement l'archipel des îles Chausey – subit des pertes conséquentes dues à la prédation des moules de bouchot par ces oiseaux (ONCFS & SRC Normandie-Mer du Nord, 2005b). Par exemple, en 2011 en Normandie, les pertes représentaient entre 10 et 30 % de la production selon les secteurs (Mille, 2017). D'après ce dernier auteur, les centres naisseurs dans les pertuis Breton et d'Antioche sont également particulièrement impactés par les goélands au niveau des cordes de naissains.

De manière générale, presque toutes les zones mytilicoles présentes sur les côtes françaises sont concernées par la prédation exercée par les goélands (avec des degrés d'atteinte très variables), et un plus faible pourcentage par celle pratiquée par les canards (mais là où ils sont présents, le préjudice peut être considérable) (Mille, 2017). Ainsi, parmi les moyens mis en œuvre pour lutter contre cette prédation, on retrouve notamment la pose de filets de protection semi-rigides (spécifiquement en hiver) et/ou l'effarouchement par des tirs à blanc couplés à des opérations ponctuelles de tirs létaux (par exemple, en 2016 l'autorisation de tirs létaux sur 80 goélands argentés a été délivrée par le préfet de la Manche) (CRC Normandie-Mer du Nord, 2017). Tout d'abord, les filets anti-oiseaux peuvent être efficaces mais ils ont l'inconvénient de se colmater facilement, ce qui nuit à la bonne circulation de l'eau,

et donc à la croissance des moules. Ensuite, les tirs à blanc sont quant à eux dissuasifs, mais les oiseaux s'habituent et n'y associent pas de danger. Enfin, les tirs léthaux posent tout de même question dans des secteurs qui abritent des réserves ornithologiques, comme les îles Chausey ou la baie des Veys par exemple.

b. Classe des Gastéropodes : les bigorneaux perceurs

L'appellation « bigorneaux perceurs » est un terme générique désignant plusieurs espèces de gastéropodes : *Ocenebra erinaceus*, *Ocenebra inornata*, et *Nucella lapillus*, Basuyaux *et al.* (2012). Selon les régions conchylicoles où ils sont présents, ils peuvent être considérés comme un vrai fléau. D'après les auteurs cité précédemment, ils ont chacun leurs préférences alimentaires (huîtres, moules) et *N. lapillus*, plus communément appelé le pourpre, est celui qui se nourrit plus spécifiquement des moules ; il est présent sur toutes les côtes françaises (hors Méditerranée ; MNHN, 2003) et est la cause de véritables préjudices sur les concessions mytilicoles (Basuyaux & Lelièvre, 2003). Cette espèce est typiquement présente sur les estrans rocheux mais elle trouve dans les bouchots – mêmes ceux situés en bas de l'estran, en zone sableuse – un environnement protecteur parfait pour s'installer. En effet, les pieux et les agglomérats de moules leur confèrent une certaine protection vis-à-vis de leurs prédateurs, une mise à disposition directe de nourriture, ainsi qu'un lieu adéquat pour installer leur nurserie (Figure 18).

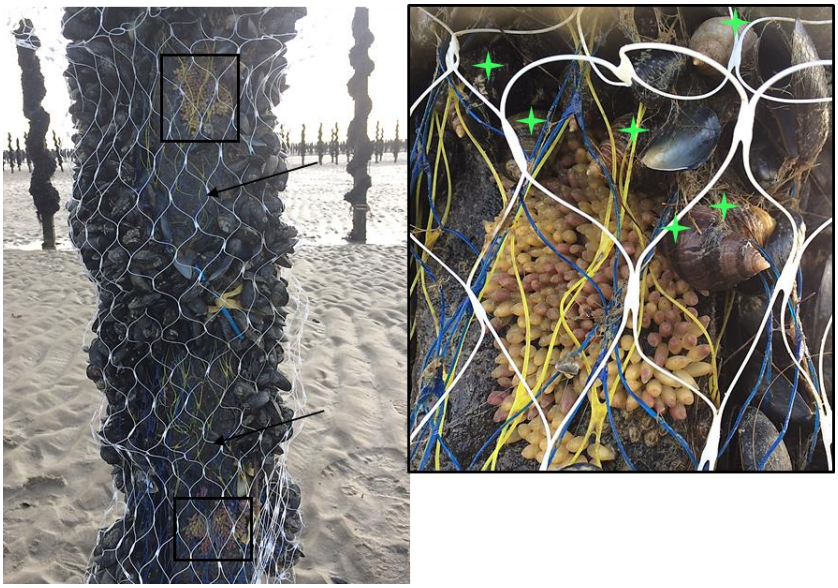


Figure 18 : Bigorneaux perceurs (étoiles vertes) et leurs pontes (encadré noir) sur un pieux à Bricqueville-sur-Mer (Manche). Les flèches indiquent les zones sensées comporter des moules, qui ont été ravagées par les gastéropodes.
Photos © Maud Charles

En Normandie, Basuyaux *et al.* (2012) ont montré qu'il existait des populations locales de perceurs qui colonisaient les cordes une fois déposées sur les pieux, mais que ces cordes étaient en partie déjà infestées par des juvéniles – quasi imperceptibles à l'œil nu – à leur arrivée des zones de captage. Ils ont démontré que tremper les cordes de naissains, nouvellement réceptionnées, dans la saumure (140 ‰) pendant 24 h était un moyen très efficace pour se débarrasser des juvéniles déjà présents. Il semblerait finalement que le seul moyen de lutte existant contre ces gastéropodes soit la collecte manuelle à grande échelle, ce qui est très couteux pour les mytiliculteurs.

c. Classe des Astérides : les étoiles de mer[31]

Les étoiles de mer communes (*Asterias rubens*) sont présentes sur l'ensemble des côtes françaises, hors Méditerranée (MNHN, 2003). Elles se nourrissent en grande partie de moules – au rythme de 3 moules adultes ou 15 juvéniles / jour – mais elles peuvent également consommer tout autre genre de bivalves. En France, elles sont amèrement célèbres en Bretagne et dans les Pays de la Loire où elles causent d'importants dégâts sur les bouchots (Figure 19A).



Figure 19 : Prédation des moules par les étoiles de mer. (A) Pieu de bouchot recouvert par des étoiles de mer ; (B) Ramassage des étoiles de mer draguées par les mytiliculteurs.

Depuis 2014 au niveau de l'estuaire de la Vilaine (Pénestin), les mytiliculteurs déclarent des préjudices importants sur leurs concessions. En automne 2015, 30 % de la production du bassin ont été dévorées ; en juin 2017 les pertes étaient estimées à 50-60 % de la production. Les étoiles de mer sont invasives et prolifèrent très rapidement si elles ne sont pas régulées par les conditions environnementales. La cause de la multiplication de ce phénomène a été

[31] Les informations contenues dans cette section, concernant les phénomènes de prédation des moules sur les côtes bretonnes, sont principalement issues de communiqués de presse et déclarations de Monsieur Bruno Evain, du Syndicat mytilicole de Pénestin.

identifiée comme étant due à des températures trop douces au printemps et en automne, accompagnées d'un déficit important d'eau douce. Les étoiles de mer supportant très mal les dessalures, elles quittent habituellement les estuaires lors des saisons pluvieuses ; ainsi, au printemps, elles sont supposées se reproduire au large (Guillou, 1981) et non dans la zone intertidale à proximité des concessions. Les moyens de lutte mis en place sont le dragage des tapis formés par les étoiles de mer sur le substrat (Figure 19B) et le ramassage manuel (en 2017, 98 tonnes, soit 3 millions d'individus, ont été ramassées sur les concessions de Pénestin). Cependant, au-delà des coûts supplémentaires engendrés pour les professionnels, il semble que cela soit insuffisant.

d. Classe des Actinoptérygiens : la daurade royale

La daurade royale (*Sparus aurata*), présente sur l'intégralité des côtes françaises (MNHN, 2003), est un poisson essentiellement carnivore prédateur des palourdes, des huîtres et des moules (Lamare *et al.*, 2017) . D'abord connue pour causer des ravages sur les filières de Méditerranée dans les années 2000 – 3 000 tonnes ont ainsi été dévorées en 2000 (Alléguède, 2001) – elle est désormais très présente sur les côtes bretonnes. En effet, en conséquence du réchauffement des eaux, la daurade a vu son aire de répartition s'étendre au nord ; ainsi, de mars à octobre, elle s'attaque aux moules bretonnes causant alors d'importants dégâts pour les mytiliculteurs (Avignon, 2017). En septembre 2014 par exemple, un banc de daurades a ainsi englouti 160 tonnes de moules en un weekend en rade de Brest. Les moyens de lutte utilisés sont la mise en place de filets ou de grillages, qui sont plus ou moins efficaces et fragiles en cas de forts courants et surtout coûteux. Plus récemment, un répulsif acoustique a été développé par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) et apparait comme une solution prometteuse (CRC Bretagne Sud & Ifremer, 2015).

Les cultures sur filières ou en suspension sont moins impactées par certains types de prédation – comme celle par les oiseaux ou les gastéropodes notamment – puisque les cordes sont continuellement immergées et n'ont pas de contact direct avec le substrat. Néanmoins, elles n'échappent pas à la prédation par les poissons. D'une manière générale, les pertes résultantes de la prédation sont très difficiles à quantifier, que ce soit par les professionnels ou par les scientifiques de terrain. De plus, il n'est pas toujours aisé d'établir avec certitude que ces disparitions de moules sont dues à la prédation (et d'en définir le prédateur) plutôt qu'à une autre cause (tempêtes, braconnage, etc.)[32].

[32] A l'exception de la prédation par les bigorneaux perceurs qui laisse une coquille percée.

3. Compétition, colonisation et surpopulation

Un paramètre supplémentaire qui peut entraver le bon développement des animaux et menacer la production mytilicole, est l'accès à la ressource trophique. En effet, dans les zones littorales où elles sont cultivées, les moules ne sont pas les seules consommatrices de phytoplancton ; ainsi, elles sont continuellement en compétition avec les autres espèces dont c'est également la source de nourriture. En outre, au sein même d'une population de moules, les individus sont en compétition entre eux (comme mentionné dans la partie I.3.a.ii., certaines moules grossissent plus vite que d'autres car elles ont un accès facilité à la ressource trophique).

En France, les principaux compétiteurs des moules pour la ressource trophique, et naturellement présents dans le milieu sont :

- Les balanes[33] : ce sont des crustacés exclusivement intertidaux et présents dans des régions plutôt septentrionales – comme la Bretagne, la Normandie et le Nord (Gruet, 2002). Les balanes vivent fixées sur tous types de supports durs (rochers, pieux de bouchots, etc.) et même sur certains organismes vivants, comme les moules (Figure 20). Elles constituent l'un des épibiontes les plus courants. En plus de la compétition qu'elle exerce, les balanes sont particulièrement gênantes pour les professionnels et la commercialisation des moules.



Figure 20 : Moules de bouchot et pieux colonisés par les balanes, à Bricqueville-sur-Mer (Manche). Photos © Maud Charles

[33] Genres *Balanus, Semibalanus* et *Chtamalus* principalement.

- La crépidule, *Crepidula fornicata* : ce mollusque gastéropode est une espèce introduite, envahissante, elle est présente sur toutes les côtes françaises (et européennes) jusqu'à l'étage infralittoral ; elle se plait particulièrement dans les eaux de la Manche et est en conséquence, très présente en Bretagne et en Normandie (MNHN, 2003). D'importants secteurs mytilicoles, comme la baie de Saint Brieuc ou la baie du Mont-Saint-Michel, sont très concernés par l'invasion de crépidules et font partie des sites les plus colonisés du littoral français (Blanchard, 2009 ; Cugier, 2010 ; Cugier *et al.*, 2010). En 2004, dans la baie du Mont-Saint-Michel, la biomasse de *C. fornicata* était estimée à plus de 150 000 tonnes (Blanchard, 2009). Cet envahissement a un impact significatif sur la compétition trophique, puisqu'à ce moment-là, 40 % du phytoplancton total filtré par l'ensemble des « filtreurs » de la baie l'était par la crépidule (Cugier *et al.*, 2010 ; Figure 21).

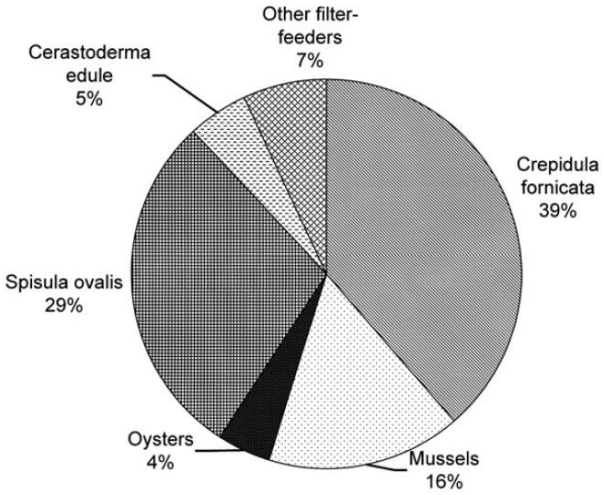


Figure 21 : Contribution des principaux « filtreurs » à la quantité totale de phytoplancton filtrée en une année dans la baie du Mont-Saint-Michel (Cugier *et al.*, 2010)

Sur cette figure, on constate que seuls 20 % du phytoplancton filtré le sont par les huîtres et les moules qui sont les seuls bivalves cultivés dans la baie ; les autres « filtreurs » (hormis *C. fornicata*) sont des espèces indigènes. Ainsi, un autre mollusque bivalve, la spisule (*Spisula ovalis*), apparait également comme étant une espèce compétitrice non négligeable dans la baie du Mont-Saint-Michel.

Un autre animal, qui n'est pas compétiteur mais plutôt un colonisateur, a été à l'origine de phénomènes d'envasement tout à fait particuliers sur les moules et mérite donc d'être décrit ici. *Polydora ciliata* est un annélide polychète tubicole – très largement répandu dans les eaux au nord-ouest de l'Europe – qui ne cible pas spécifiquement les moules mais qui peut

indirectement leur nuire. En effet, l'envasement qu'il génère lors de sa colonisation à la surface des animaux entrave pleinement leur survie.

Durant l'été 1963, des mortalités d'une grande ampleur (80 %) sont observées en mer des Wadden (à la frontière entre le Pays-Bas et le Danemark). En effet, une épaisse couche de limon vaseux collant et agglomérant, est constatée, recouvrant l'ensemble des moules (Korringa, 1963). Cette pellicule sédimentaire est en fait un amas de tubes et de galeries formés par cet annélide, *P. ciliata,* qui empêche les moules de filtrer l'eau. Si toutefois elles y arrivent, l'eau pompée emmène avec elle des particules de vase et de limon qui finissent par obstruer les branchies des animaux. *In fine*, que les moules filtrent ou non, l'issue reste la même, elles meurent d'asphyxie. Le même phénomène est observé pour la première fois en France à Quend-Plage (au nord de la baie de Somme) en 1996, où il entraine 80 % de mortalité sur les moules de bouchot. Cet événement printanier particulier, décrit comme un « placage de vase » (Figure 22A), se manifeste de nouveau en 2001 sous forme d'épaisses couches pouvant atteindre 10 à 15 cm (Figure 22B) (Ropert & Olivési, 2002).

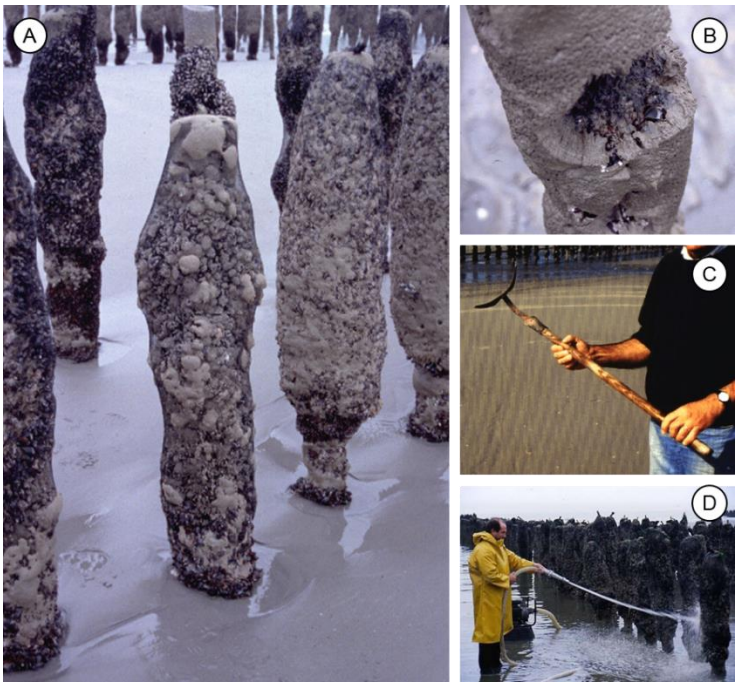


Figure 22 : Envasement des bouchots causé par *Polydora ciliata* et moyens de lutte. (A) Pieux victimes de recouvrement ou « placage de vase » ; (B) Épaisse couche de limon vaseux agglomérant formée par les tubes et galeries de *P. ciliata* ; (C) Grattoir spécifique utilisé pour nettoyer les pieux ; (D) Nettoyage des pieux par un mytiliculteur à l'aide d'une pompe à eaux. Photos © Michel Ropert

Korringa (1963) expliquait que la prolifération exceptionnelle et massive de *P. ciliata* dans la mer des Wadden en 1963, était très probablement due à la grande quantité de matières organiques en décomposition présente dans le milieu à la suite des mortalités des

organismes benthiques (dont les moules[34]) de l'hiver 1962-1963. *Polydora ciliata* est un carnivore détritivore qui se nourrit de toutes particules benthiques et planctoniques (Chéramy, 2001). Un milieu très riche en détritus organiques, nutriments et autres matières en suspension contribue donc fortement au développement de cette espèce. Par ailleurs, la présence de balanes sur les coquilles des moules offrirait un substrat rugueux particulièrement favorable au recrutement des larves de *P. ciliata* (Korringa, 1963 ; Ropert & Olivési, 2002). Il n'existe pas de moyen de lutte préventif ; la seule possibilité pour les mytiliculteurs est de nettoyer leurs pieux lorsque l'envasement est constaté, à l'aide d'un « grattoir » spécifique (Figure 22C) ou d'une pompe à eaux (Figure 22D).

Quelle que soit l'espèce avec laquelle les moules peuvent être en compétition, cela peut avoir une conséquence directe et significative sur leurs performances de croissance en raison d'un épuisement de la ressource trophique (Cugier, 2010). De façon similaire, la colonisation ou la surpopulation des zones exploitées sont réputées pour être néfastes. Une densité trop importante de mollusques dégrade les capacités nutritives des sites et perturbe les équilibres physiques et biologiques naturels du milieu (voir McKindsey *et al.*, 2006) ; elle est également connue pour faciliter la propagation des maladies et des parasites (Lambert, 1952 ; Lubet & Dardignac, 1976). Les crises successives dues à *Mytilicola* entre les années 60 et 80 dans les baies de l'Aiguillon et du Mont-Saint-Michel[35] ont d'ailleurs fortement contribué à faire réduire le nombre de bouchots dans certaines zones mytilicoles surchargées (Bompais, 1991).

4. Endoparasites[36]

Chez les moules, deux principaux groupes de parasites pathogènes ont été établis par Villalba *et al.* (1997) en fonction de leur degré de pathogénicité. Le premier groupe contient les parasites causant des dommages à l'hôte mais n'occasionnant que très rarement la mort, on y trouve notamment le copépode, *Mytilicola intestinalis.* Le second groupe comprend deux parasites, davantage nuisibles puisqu'ils causent de sérieux dommages à l'hôte et sont potentiellement léthaux ; ce sont les trématodes digénétiques, et plus spécifiquement *Proctoeces maculatus,* et un protozoaire, *Marteilia refringens*.

[34] Voir *supra*, section II.1.a. (p. 52).

[35] Voir *infra*, section II.4.a. (p. 62).

[36] « *Le parasitisme implique une coexistence d'organismes hétérospécifiques qui se caractérise par le fait que l'un des organismes impliqués (le parasite) obtient des avantages (p. ex. énergie, matière) au détriment de l'autre (hôte) ; le parasitisme a tendance à avoir des effets négatifs démontrables chez l'hôte. […] ; le parasite peut vivre à l'intérieur du corps de son hôte (endoparasitisme). Les endoparasites vivent dans les cellules (parasites intracellulaires), entre les cellules (parasites intercellulaires), ou dans les cavités, les canaux, les reins, les tractus intestinaux, etc. de leur hôte.* » ; définition traduite de l'anglais, d'après Kinne (1980).

a. Mytilicola spp.

Au sein de l'hôte – huître, coque, palourde et plus spécifiquement la moule (Bower, 2009a) – ce crustacé copépode rougeâtre vit dans l'intestin moyen (pour les adultes) et dans la glande digestive (pour les juvéniles). Il cause des lésions de l'épithélium digestif (Couteaux-Bargeton, 1953) et réduit la vitesse de filtration de l'animal parasité (Campbell, 1970), ce qui conduit à une baisse de la quantité de nourriture ingérée. Un bivalve peut héberger plusieurs individus et dans ce cas, cela peut conduire à un amaigrissement significatif de l'animal pouvant entrainer la mort. En outre, il existe une deuxième espèce de « copépode rouge », très similaire à *M. intestinalis*, *Mytilicola orientalis.* Cette espèce, décrite par Mori en 1935, est originaire du Japon et a été introduite en France dans les années 1970 par l'intermédiaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Lauckner, 1983) ; il est désormais présent en Irlande, au Pays-Bas, en Allemagne, au Danemark, et même en Méditerranée. A l'instar de *M. intestinalis*, il parasite toutes sortes de bivalves (avec une préférence pour *C. gigas* ; Elsner *et al.*, 2011) et provoque le même type d'altérations que *M. intestinalis* chez la moule ; d'ailleurs, une double infestation par *M. intestinalis* et *M. orientalis* est également possible (Bower, 2009a). Ces deux espèces ne peuvent pas être distinguées l'une de l'autre lors d'observations histologiques ; en revanche, elles peuvent l'être grâce à leurs critères morphologiques caractéristiques (Figure 23 ; Goedknegt *et al.*, 2018).

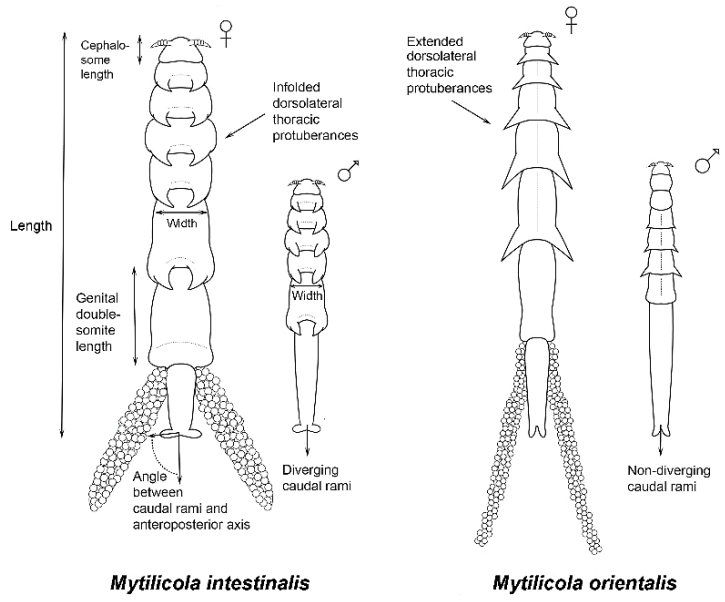


Figure 23 : Représentation schématique de *Mytilicola intestinalis* et de *Mytilicola orientalis.* Les protubérances thoraciques dorsolatérales sont caractéristiques chez les deux espèces : chez *M. intestinalis,* elles sont repliées vers l'intérieur tandis que chez *M. orientalis,* elles sont étendues vers l'extérieur. Source : Goedknegt *et al.* (2018)

Dans l'histoire de la mytiliculture, le parasite le plus célèbre pour avoir entaché la prospérité de la culture des moules en France, et également aux Pays-Bas, est probablement *M. intestinalis*, aussi appelé le « Cop rouge ». Il serait originaire de Méditerranée, où il a été identifié par Steuer en 1902, puis observé par Dollfus (1927) en 1914 et 1927 respectivement à Marseille et à Banyuls . Dans ces régions, il ne semblait pas causer de nuisances particulières sur les moules. Repéré pour la première fois en Europe du Nord en Allemagne en 1938 (Caspers, 1939), il est ensuite détecté en Angleterre en 1946 (Ellenby, 1947), puis dans les moules néerlandaises en automne 1949. En juillet 1950, des mortalités de moules sans précédent touchent la province de Zélande (Pays-Bas) et sont immédiatement attribuées à ce parasite (Korringa & Lambert, 1951). Les pertes sont estimées à plus de 50 % de la production et les moules survivantes étaient quant à elles de basse qualité car elles avaient un taux de chair très faible (Lambert, 1935). Plus tard, c'est au tour de la France au début des années 1960 d'être frappée par des mortalités massives, avec des taux de pertes compris entre 30 et 90 % selon les secteurs. En conséquence, en 1961 et 1962, les moules de la baie de l'Aiguillon sont lourdement infestées par *Mytilicola* au printemps, alors qu'elles étaient déjà dans un état physiologique fragile (post-ponte). A l'automne, l'effet délétère de ce parasite s'additionne à celui de températures élevées difficilement supportables par *M. edulis* (Brienne, 1964 ; Marteil, 1976). Par ailleurs, plusieurs auteurs (Korringa & Lambert, 1951 ; Brienne, 1964) avançaient le fait que la mytiliculture était tout à fait possible dans les zones abritant *Mytilicola*. En effet, même une infestation élevée peut n'avoir aucune incidence si les moules sont dans des conditions favorables (nourriture abondante, quantité de matière en suspension restreinte, température de l'eau tempérée ou encore, une faible quantité de compétiteur ; Brienne, 1964). Cependant, de par la nature même de la culture sur bouchots (les conditions idéales sont rarement toutes réunies), la meilleure recommandation était alors de limiter la densité de population cultivée afin de ne pas contribuer à la propagation du parasite et à l'augmentation de l'infestation des moules (Korringa & Lambert, 1951 ; Lambert, 1952).

Finalement, entre 1970 et 1973, alors que la mytiliculture y était en plein essor, c'est la baie du Mont-Saint-Michel qui fut touchée par *Mytilicola* : pour la saison 1970-1971, la mortalité était comprise entre 50 et 80 % (Gerla, 1990). En conséquence, une première restructuration des bouchots est alors entamée : les pieux sont plus espacés, la quantité diminuée et aucune nouvelle installation n'est autorisée. Malgré cela, en 1983-1984 la baie est une fois de plus touchée. En effet, il est apparu que certains mytiliculteurs peu consciencieux n'avaient pas jugé utile de suivre les recommandations de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). De plus, puisque la production avait particulièrement bien repris, certains avaient même pris la liberté de poser des pieux supplémentaires. Enfin, entre 1985 et 1987, une nouvelle restructuration visant à aérer et diminuer les bouchots est entreprise aboutissant

à une zone mytilicole stable et homogène (Gerla, 1990). Parallèlement, dans d'autres pays européens, certains auteurs avaient également étudié la prévalence et l'impact de *Mytilicola*. Par exemple, en Galice (Espagne), *Mytilicola* était retrouvé dans la plupart des moules (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*) cultivées dans les « rías »[37] depuis les années 60 sans pour autant causer de problème majeur (Paul, 1983 ; Villalba *et al.*, 1997). Aussi, Davey (1989) fit un constat similaire après l'étude de la prévalence du parasite dans des moules prélevées entre 1978 et 1988 dans l'estuaire de la Lynher (Angleterre). Hormis quelques perturbations de croissance, il n'a observé aucun effet léthal du parasite sur les animaux. Ainsi, depuis plusieurs dizaines d'années maintenant, *M. intestinalis* et *M. orientalis* font partie des endoparasites classiquement retrouvés dans les huîtres et les moules sauvages ou cultivées en Europe.

b. Trématodes

Les trématodes digénétiques[38] sont les parasites métazoaires les plus fréquents et les plus importants chez les bivalves (Lang & Dennis, 1976 ; Lauckner, 1983 ; Le Breton & Lubet, 1992 ; Sunila *et al.*, 2004 ; Bower, 2009b ; Markowitz, Williams & Krause, 2016a). En effet, en réalisant une partie de leur cycle dans les moules (stades sporocystes et/ou métacercaires ; Figure 24), ils causent de multiples dommages. A noter que, *Proctoeces maculatus* ne suit pas exactement le cycle typique de développement des trématodes digénétiques, puisqu'il peut réaliser l'intégralité de son cycle dans les moules (Lang & Dennis, 1976 ; Sunila *et al.*, 2004).

[37] Terme espagnol ou portugais utilisé pour décrire une baie étroite et profonde.

[38] Dans la littérature, plusieurs espèces affectant les bivalves ont été décrites, mais la particularité de leur cycle (avec les différents stades) et leur très large répartition géographique (dans toutes les eaux marines tropicales et tempérées) rendent l'identification des espèces très complexe. Il apparait notamment que plusieurs espèces soient en réalité conspécifiques, c'est entre autres le cas de *Cercaria milfordensis, Cercaria tenuans, Cercaria brachidontis, Proctoeces subtenuis, Proctoeces scrobiculariae* et *Proctoeces buccini* pour l'espèce *Proctoeces maculatus* (Sunila *et al.*, 2004 ; Bower, 2009b).

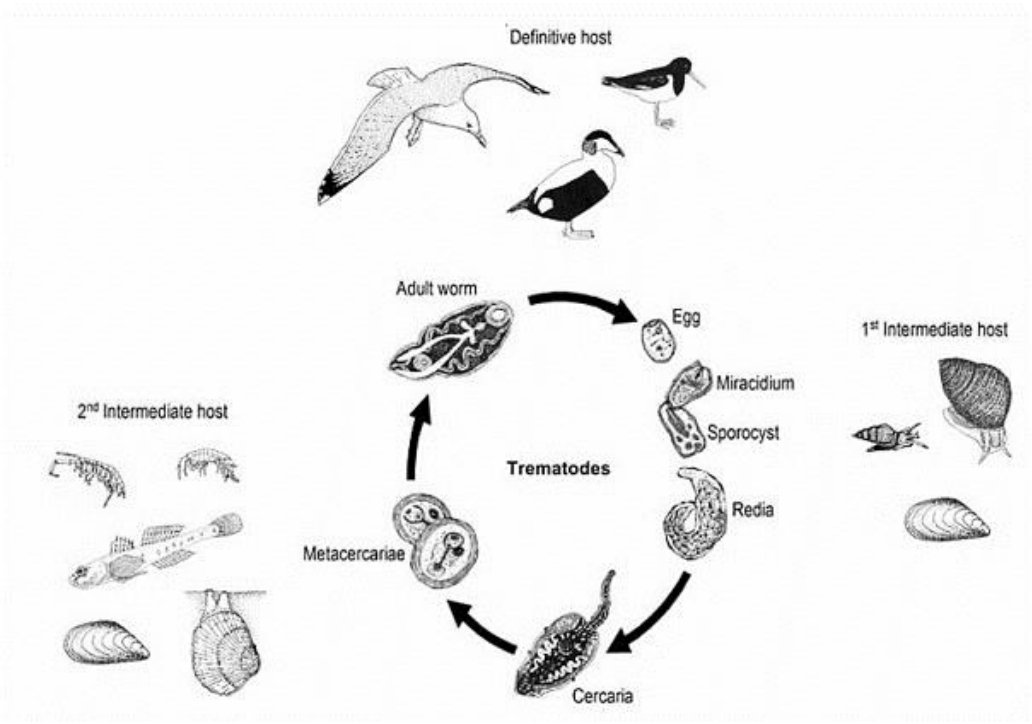


Figure 24 : Cycle généralisé des trématodes avec les deux principaux stades (sporocystes et métacercaires) retrouvés dans les moules. (Figure réalisée à partir du regroupement de deux figures issues de Szuroczki & Richardson (2009) et Thieltges *et al.* (2008))

A des stades avancés de parasitisme, (d'ailleurs visibles macroscopiquement, Canzonier, 1972 ; Markowitz *et al.*, 2015 ; Figure 25), le manteau est envahi de sporocystes et/ou de métacercaires et ne contient plus de réserves, ni de cellules germinales (il est particulièrement fin et transparent). Cela peut entrainer la castration de l'hôte ainsi qu'un affaiblissement conséquent pouvant causer la mort (Marteil, 1976 ; Le Breton & Lubet, 1992 ; Robledo, Caceres-Martinez & Figueras, 1994). D'ailleurs, Bakhmet *et al.* (2017) ont observé des perturbations significatives de la croissance chez des moules[39] parasitées par des métacercaires de *Himasthla elongata*, mettant ainsi en évidence un net déficit énergétique ; de plus, ils ont également observé des désordres au niveau des fonctions neuronales et cardiaques des animaux. En plus de comprimer les organes et tissus adjacents, les trématodes peuvent aussi provoquer des inflammations et de sérieuses lésions là où ils sont présents – avec des infiltrations hémocytaires, voir des granulocytomes, qui encapsulent les sporocystes (Robledo *et al.*, 1994 ; Laruelle, Molloy & Roitman, 2002 ; Sunila *et al.*, 2004 ; Matozzo *et al.*, 2018). Enfin, ils entrainent une faiblesse dans la fermeture des valves et perturbent les capacités de fixation au substrat (Bower, 2009b).

[39] *M. edulis*

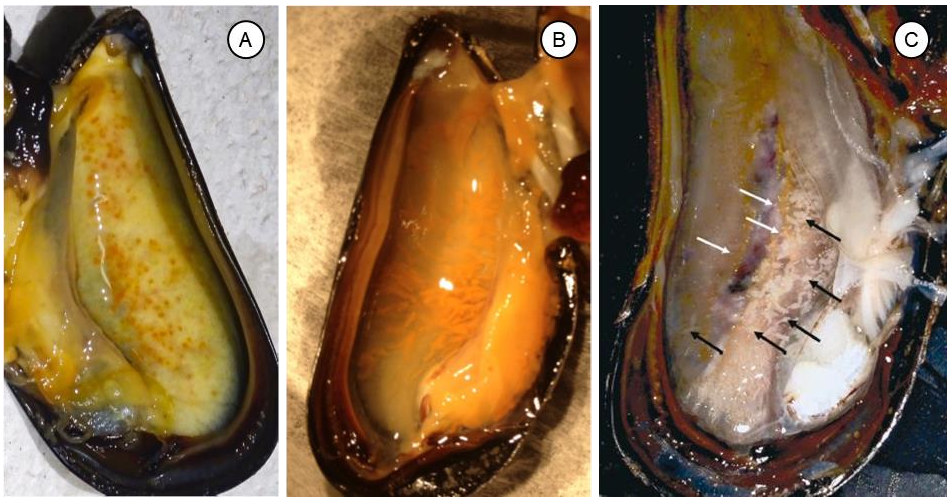


Figure 25 : Moules (*Mytilus edulis*) parasitées par des trématodes digénétiques au niveau du manteau. (A) Petites vésicules orangées correspondant à des sporocystes encapsulés de *Proctoeces maculatus* et (B) sporocystes de trématodes (Markowitz *et al.*, 2016a). (C) Sporocystes de *Proctoeces maculatus* (flèches noires) et métacercaires de *Himasthla quissetensis* (flèches blanches) (Markowitz, Williams & Krause, 2016b).

D'abord, *C. tenuans* a été repéré pour la première fois en 1972 dans la lagune de Venise (Italie) dans des moules qui avaient été importées d'Espagne (Canzonier, 1972). Ensuite, à la fin de l'hiver et au début du printemps 1981, de fortes mortalités ont été constatées sur des moules d'élevage[40] dans le sud de la lagune de Venise (Italie). Les mytiliculteurs locaux accusent un hiver anormalement froid, mais à l'examen macroscopique, des « granules » motiles rouge-orangé (~1 mm) sont constatées dans le manteau des moules moribondes et sont identifiées comme étant des sporocystes de *C. tenuans* (Munford, DaRos & Strada, 1981). Ainsi, ces auteurs avancent le fait que ce trématode est à l'origine de cette épizootie car des mortalités anormales observées à cette période de l'année n'étaient pas caractéristiques de pathologies fungiques, virales ou bactériennes. Au même moment, en Russie, un phénomène de mortalités massives est observé sur des moules[41] de la mer Noire parasitées par *P. maculatus* (Machkevski et Parukhin, 1981 ; d'après Le Breton & Lubet, 1992). Ces auteurs ont établi un lien entre l'infestation et la condition de l'animal, supposant une fragilisation de ce dernier conduisant à la mort.

Enfin, en Normandie (sur la côte Ouest du Cotentin), les moules ont été identifiées comme étant parasitées par *P. maculatus* depuis 1983, puis en juillet 1984, il a causé 30 % de mortalité (Le Breton & Lubet, 1992). Pourtant, en janvier 1984, seuls 5,4 % des moules étaient infectées ; toutefois, les auteurs soulignaient une saisonnalité dans l'infestation en lien avec le cycle du parasite ce qui pouvait expliquer les variations de prévalence d'infestation.

[40] *M. edulis* et *M. galloprovincialis*
[41] *M. galloprovincialis*

c. *Marteilia spp.*

Les parasites protozoaires du genre *Marteilia* peuvent infecter[42] plusieurs mollusques bivalves d'intérêt commercial, comme les huîtres et les moules (Villalba *et al.*, 1993, 1997 ; Fuentes *et al.*, 1995 ; Berthe *et al.*, 2004 ; Arzul *et al.*, 2014). En Europe, *Marteilia refringens* est présent du sud de la Suède jusqu'à la Grèce en passant par la France, l'Espagne, ou encore l'Italie (Bower, 2011 ; Carrasco, Green & Itoh, 2015). Compte tenu de l'impact qu'il peut avoir sur la conchyliculture, *M. refringens* fait partie des agents pathogènes à déclaration obligatoire inscrits sur la « Liste des maladies, infections et infestations » de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE)[43]. C'est d'ailleurs en raison de son caractère particulièrement préjudiciable – d'abord pour l'ostréiculture, puis pour la mytiliculture – que *M. refringens*, a fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs décennies. Ainsi, le caractère pathogène de *Marteilia* n'est plus à prouver.

D'abord, en se logeant au niveau des tubules de la glande digestive de son hôte, *Marteilia* limite l'absorption des éléments nutritifs, perturbe la digestion intracellulaire et entrave le stockage des réserves métaboliques. L'indice de condition[44] des animaux parasités se voit alors significativement réduit (Grizel & Tigé, 1973 ; Figueras, Jardon & Caldas, 1991 ; Villalba *et al.*, 1993 ; Robledo *et al.*, 1995). Ainsi, cela entraîne un affaiblissement général de l'hôte favorisant le développement de parasites opportunistes (comme les ciliés ou les bactéries) ce qui peut causer des infections secondaires (Grizel, 1985). Ensuite, l'infestation entraine des réactions inflammatoires, avec d'importantes infiltrations hémocytaires, au niveau de l'épithélium stomacal[45] et de la glande digestive (épithélium et tissu conjonctif) (Berthe *et al.*, 2004 ; Garcia *et al.*, 2009). La formation de granulocytomes[46] autour du parasite (entrainant sa destruction) ainsi que la nécrose des tissus de l'hôte ont également été observées (Villalba *et al.*, 1993). En outre, lors de l'étape de sporulation du parasite dans la lumière des tubules, l'épithélium est intégralement détruit (Figueras *et al.*, 1991 ; Villalba *et al.*, 1993, 1997). En définitive, plusieurs auteurs ont montré qu'il y avait une corrélation positive entre la prévalence du parasite et la mortalité observée chez des moules cultivées en France (Garcia *et al.*, 2005)

[42] L'infection par *Marteilia refringens* est appelée marteiliose.

[43] Anciennement « Office International des Epizooties » ; https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2019/

[44] Plusieurs auteurs ont défini différents indice de condition ; les deux plus souvent retrouvés étant celui de Freeman & Kenneth (1974) et celui de Davenport & Chen (1987) respectivement égaux à $(\frac{poids\ de\ chair\ humide}{poids\ total\ (chair+coquille)} \times 100)$ et $(\frac{poids\ de\ chair\ humide}{poids\ de\ coquille} \times 100)$.

[45] Les premiers stades parasitaires y sont couramment retrouvés (Villalba *et al.*, 1993 ; Carrasco, Green & Itoh, 2015).

[46] Un granulocytome est formé par un amas localisé de granulocytes, généralement circulaire ; dans certains cas il est entouré de plusieurs couches de cellules au noyau applati (« granulocytome typique »).

et en Espagne (Villalba *et al.*, 1993). Cependant, il existe dans la littérature des disparités quant au caractère létal d'une infection par *Marteilia* (Carrasco *et al.*, 2015). Comme l'indiquent ces auteurs, cela dépendrait de l'interaction entre l'hôte et cet organisme pathogène, c'est à dire de la sensibilité de l'hôte et de la virulence de l'organisme pathogène. Concernant la sensibilité de l'hôte par exemple, Berthe (2002) avait observé des mortalités proche de 100 % chez des moules[47] qui avaient été implantées dans une zone endémique alors qu'elles provenaient d'une zone exempte de *Marteilia*. Parallèlement, les populations indigènes de *M. edulis* étaient certes infectées, mais ne subissaient pas de mortalités particulières.

Historiquement, *Marteilia refringens* a d'abord été décrit par Grizel *et al.* (1974) qui l'ont observé dans des huîtres plates (*Ostrea edulis*) qui provenaient de Bretagne et qui subissaient des mortalités importantes. Ensuite, en 1981, un protozoaire très similaire à *M. refringens* était observé dans des moules (*M. galloprovincialis*) importées de la lagune de Venise (Italie) vers la France (Comps, Pichot & Papagianni, 1982). Ces auteurs ont décrit une espèce différente de celle observée dans les huîtres, qu'ils ont nommée *Marteilia maurini* ; à ce moment-là, son pouvoir pathogène n'a pas été évalué. Très peu de temps après ces premières observations sur des moules allochtones, la présence de *M. maurini* a été constatée dans des populations naturelles de moules, en Bretagne Nord (Auffret & Poder, 1985). Là encore, l'objectif de l'étude n'était pas d'évaluer l'impact du parasite dans les mortalités. Cependant, les auteurs appelaient déjà à une certaine vigilance quant à un potentiel risque pour la mytiliculture.

La classification exacte des espèces appartenant au genre *Marteilia* a fait l'objet de vastes débats, alimentant de nombreux travaux ; elle continue à évoluer encore aujourd'hui (Berthe *et al.*, 2004 ; Bower, 2011 ; Kerr *et al.*, 2018). Ainsi, pendant plusieurs années, la distinction entre *M. refringens* et *M. maurini* était faite en fonction de l'hôte dans lequel ces deux espèces étaient retrouvées (huître/moule). Cependant, différents auteurs ont observé des co-infections d'huîtres et de moules par les deux espèces (Le Roux *et al.*, 2001 ; Balseiro *et al.*, 2004). En conséquence, deux types de *M. refringens* ont été définis par Le Roux *et al.* (2001) en fonction de leur affinité respective pour leur hôte : un type O pour les huîtres, et un type M pour les moules. Ensuite, le nom d'espèce *M. maurini* a été invalidé (WoRMS, 2019) et l'OIE reconnait dès lors *M. refringens* et ses deux types (OIE, 2019). Depuis, des cas supplémentaires de types M et O, retrouvés aussi bien dans les huîtres, dans les moules ou dans les palourdes, ont été déclarés dans différentes régions d'Europe. En outre, Kerr *et al.* (2018) ont très récemment établi que ces deux types correspondaient à deux espèces différentes : *M. refringens* (type O) et *M. pararefringens* sp. nov. (type M) et que ces deux espèces avaient une distribution géographique différente. Ils soulignent ainsi le biais que

[47] *M. edulis*

génère la déclaration d'occurrence de ce parasite sous un seul et même nom d'espèce, plus particulièrement dans un contexte où il existe des lacunes dans les connaissances du pouvoir pathogène et du rôle de ces deux espèces dans les mortalités massives de bivalves, dans des conditions biotiques et abiotiques différentes (Ward *et al.*, 2016).

5. Maladies non parasitaires

a. Virus

Au cours de ces cinquante dernières années, des virus apparentés à plusieurs familles ont été associés à des mortalités importantes observées chez certains bivalves. Ce fut notamment le cas, en France, pour les huîtres (*Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*) et les virus de la famille des *Iridoviridae* et les virus herpétiques (Renault, 2006). Néanmoins, les observations de virus chez les moules sont très rares et plutôt anciennes. A l'heure actuelle, deux cas de virus observés chez des moules sont répertoriés.

En premier lieu, Rasmussen (1986) a étudié des populations naturelles de moules[48] sur le territoire danois entre 1983 et 1984. L'auteur a d'abord constaté la présence de granulocytomes dans les lacunes de l'appareil circulatoire et dans les vésicules du tissu conjonctif de la glande digestive et du manteau (Figure 26A). Puis, il a remarqué que certains des granulocytes constituant les granulocytomes comportaient des inclusions cytoplasmiques qu'il décrivait comme de « fines granules noires » (Figure 26B). A l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET), il a identifié ces inclusions comme étant des particules virales de 27 nm de diamètre ayant une morphologie très similaire aux virions de la famille des *Picornaviridae* (Figure 26C). Sur les 1 200 individus qu'il a analysés, 34 comportaient des particules virales et uniquement dans les granulocytes. Cet auteur ne donne pas d'information quant à un possible lien avec des mortalités, ou sur les conséquences néfastes que ce virus peut avoir en matière de pathogénicité. Toutefois, il supposait le fait que le virus entrainait indirectement la formation de ces granulocytomes. En effet, le virus entrerait dans l'hôte par l'intermédiaire du système circulatoire[49], il serait ensuite endocyté par les granulocytes et, à la suite de sa multiplication dans ces cellules circulantes, il entraverait leur mobilité, ce qui causerait des agrégats de granulocytes dans les vaisseaux et les lacunes hémolymphatiques. Cependant, dans une étude précédente, Rasmussen *et al.* (1985b) avaient également observé chez *M. edulis* la formation de granulocytomes en réponse à une contamination chimique par des composés N-nitroso (nitrates, nitrites). En outre, Lowe & Moore (1979) avaient également

[48] *M. edulis*

[49] Le moyen d'entrée du virus dans l'hémolymphe n'est pas connu.

fait ce constat de granulocytomes présents chez des moules exposées chroniquement à des contaminants. Ainsi, le processus de formation des granulocytomes, tout comme leur étiologie sont encore aujourd'hui inconnus.

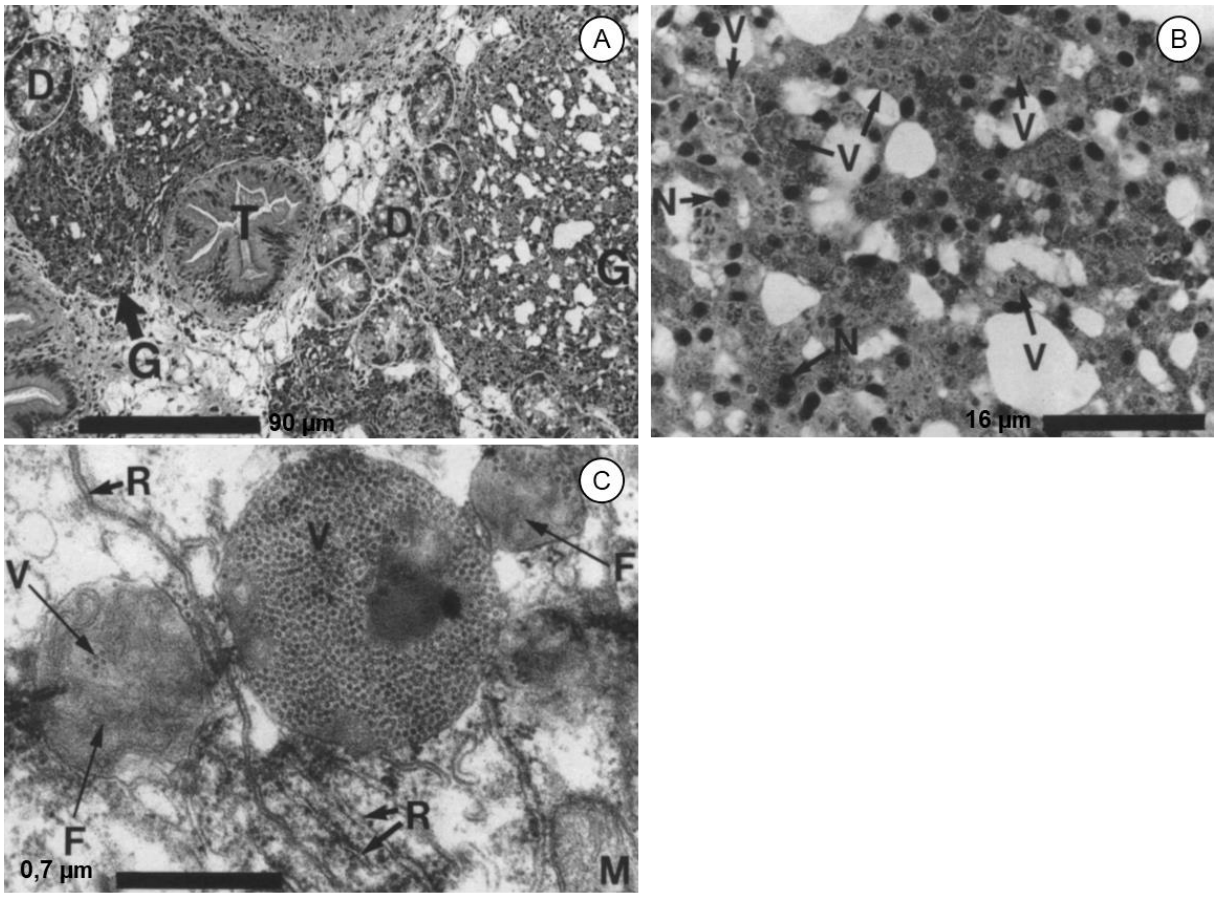


Figure 26 : Micrographes de microscopie optique et électronique de coupes de tissus de moules infectées par un virus de la famille des *Picornaviridae*. (A) Section de glande digestive avec granulocytomes ; (B) Agrandissement d'un granulocytome avec granulocytes contenant des inclusions cytoplasmiques ; (C) Particules virales enfermées dans une vésicule. G =granulocytomes composés de granulocytes comportant des particules virales ; T=tubules digestifs ; D=conduits digestifs ; N=noyaux ; V=inclusions cytoplasmiques contenant les virions ; F=matériel fibrillaire ; R=réticulums lisses et granuleux ; M=mitochondries. (Rasmussen, 1986)

Ensuite en 1994 en Nouvelle-Zélande, des mortalités exceptionnelles (50-100 %) ont touché des juvéniles de moule verte (*Perna canalicula*) cultivées. Cependant, les adultes n'étaient touchés qu'à hauteur de 2-5 %. Alors, Jones *et al.* (1996) ont constaté des infiltrations hémocytaires et des nécroses du tissu conjonctif et de l'épithélium digestif. En plus des adultes moribonds de *P. canalicula*, ils ont également analysé des moules adultes (*M. galloprovincialis*) issues des populations naturelles locales subtidales, qui manifestaient un retard de croissance. Dans ces animaux, ils ont constaté des infiltrations hémocytaires dans le tissu conjonctif de la glande digestive, ainsi que des nécroses au niveau des cellules interstitielles de la glande digestive, et des cellules basales et épithéliales des tubules digestifs.

De plus, dans les cellules de la glande digestive, ils ont remarqué la présence de particules de 25-45 nm, non enveloppées et denses aux électrons, similaires à des virions. Ainsi, les auteurs ont rapproché ces observations histologiques à celles faites chez l'huître plate (*O. edulis*), qui avait été infectée en laboratoire par un virus de type NPI[50] de la famille des *Reoviridae*, isolé de la palourde, *Tellina tenuis* (Hill & Alderman, 1979). Ils ont alors conclu que les dommages tissulaires et les mortalités massives de *P. canalicula* étaient dus à ce virus. Il apparait toutefois utile de préciser que dans le cas des virus de la famille des *Reoviridae,* aucune pathologie n'était signalée chez les hôtes naturellement porteurs ; de plus, chez les animaux infectés expérimentalement, seules quelques conditions histopathologiques étaient observées sans mortalité. Néanmoins, d'après Bower (2010), les résultats expérimentaux sur ces virus sont contradictoires et ne permettent pas de conclure sur l'effet de ces virus chez les mollusques. En outre, à cette époque-là en Nouvelle Zélande, un seul cas de mortalité dû à un virus herpétique avait été observé chez *C. gigas*.

Enfin, concernant les mortalités massives observées dans le pertuis Breton au printemps 2014, elles ne seraient vraisemblablement pas dues à un virus, d'après Béchemin *et al.* (2015). En effet, ces auteurs ont réalisé des essais d'induction de mortalité en laboratoire à partir de broyats de moules moribondes et aucune mortalité n'a été déclenchée lorsque ce broyat avait été filtré sur des mailles de 0,22 µm (diamètre qui, en théorie, ne laisserait passer que les particules virales).

b. Bactéries

Comme décrit précédemment, les moules filtrent de grandes quantités d'eau contenant du phytoplancton mais également des bactéries. En conséquence, elles accumulent aisément les bactéries présentes dans l'environnement. Ainsi, elles possèdent un riche microbiote composé de bactéries commensales appartenant à divers genres : *Vibrio, Pseudomonas, Aeromonas, Photobacterium*, etc. (Kueh & Chan, 1985 ; Vezzulli *et al.*, 2018). A l'évidence, cela les expose aussi directement aux bactéries pathogènes qui peuvent être présentes dans l'eau.

Les espèces bactériennes naturellement associées aux bivalves appartiennent majoritairement à la famille des *Vibrionaceae*[51], qui compte 142 espèces, et qui sont classées au sein de 7 genres : *Aliivibrio, Echinimonas, Enterovibrio, Grimontia, Photobacterium, Salinivibrio* et *Vibrio* (Sawabe *et al.*, 2013).

[50] Nécrose Pancréatique Infectieuse

[51] Ces bactéries sont des bacilles Gram négatifs possédant un flagelle polaire. Elles ont un métabolisme anaérobie facultatif et croissent à 20 °C.

Les espèces du genre *Vibrio* sont très largement répandues dans tous les environnements marins et sont très tolérantes en matière d'habitat écologique ; ces bactéries marines hétérotrophes sont reconnues comme appartenant à l'un des groupes bactériens les plus diversifiés et particulièrement évolutif de par leurs capacités d'adaptation écologique et d'évolution de leur génome (Sawabe *et al.*, 2013 ; Romalde *et al.*, 2014). En effet, l'expansion des techniques de biologie moléculaire au cours de ces vingt dernières années a permis de mettre en évidence la nature polyphylétique de certaines des espèces bactériennes marines, ainsi que l'existence d'une grande diversité génétique au sein même d'une espèce, comme c'est le cas chez les *Vibrio* spp. (Le Roux, 2002 ; Thompson *et al.*, 2005). Par conséquent, cela a donné lieu à plusieurs remaniements dans la classification de certaines espèces et de nouvelles espèces ont été décrites (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009 ; Thompson, 2003). En outre, il est fortement probable que cela se reproduira à l'avenir.

D'abord, les *Vibrio* spp. sont répartis dans plusieurs groupes, ou « clades »[52], portant le nom de l'une des espèces qu'ils comportent (Figure 27). Ensuite, un clade comporte plusieurs espèces. Par exemple on retrouve au sein du clade Splendidus[53], 17 espèces de *Vibrio* (Pérez-Cataluña *et al.,* 2016) : *Vibrio gallaecicus,Vibrio toranzoniae, Vibrio kanaloae, Vibrio lentus, Vibrio splendidus*, *Vibrio tasmaniensis, Vibrio hemicentroti, Vibrio atlanticus,Vibrio cyclitrophicus, Vibrio artabrorum, Vibrio celticus, Vibrio crassostreae, Vibrio gigantis, Vibrio pomeroyi, Vibrio chagasii, Vibrio pelagius* et *Vibrio fortis.* Pour finir, les souches appartenant à une même espèce à l'intérieur d'un même clade sont regroupées au sein de « cluster » ; par exemple, les différentes souches de *V. splendidus* appartiennent au cluster Splendidus. En effet, comme précisé au-dessus et décrit par de nombreux auteurs, la diversité au sein d'une même espèce est telle qu'il est nécessaire de définir un terme pour les regrouper.

[52] Ces clades sont constitués à l'aide d'une analyse phylogénétique de type MLSA (« *Multilocus Sequence Analysis* ») sur plusieurs gènes de ménage (« *housekeeping genes* »).

[53] La composition des clades de *Vibrio* est très régulièrement rediscutée et mise à jour. Par exemple, le clade Splendidus décrit par Sawabe *et al.* en 2013 comportait 11 espèces tandis que celui définit par Pérez-Cataluña *et al.* en 2016 en comportait 17.

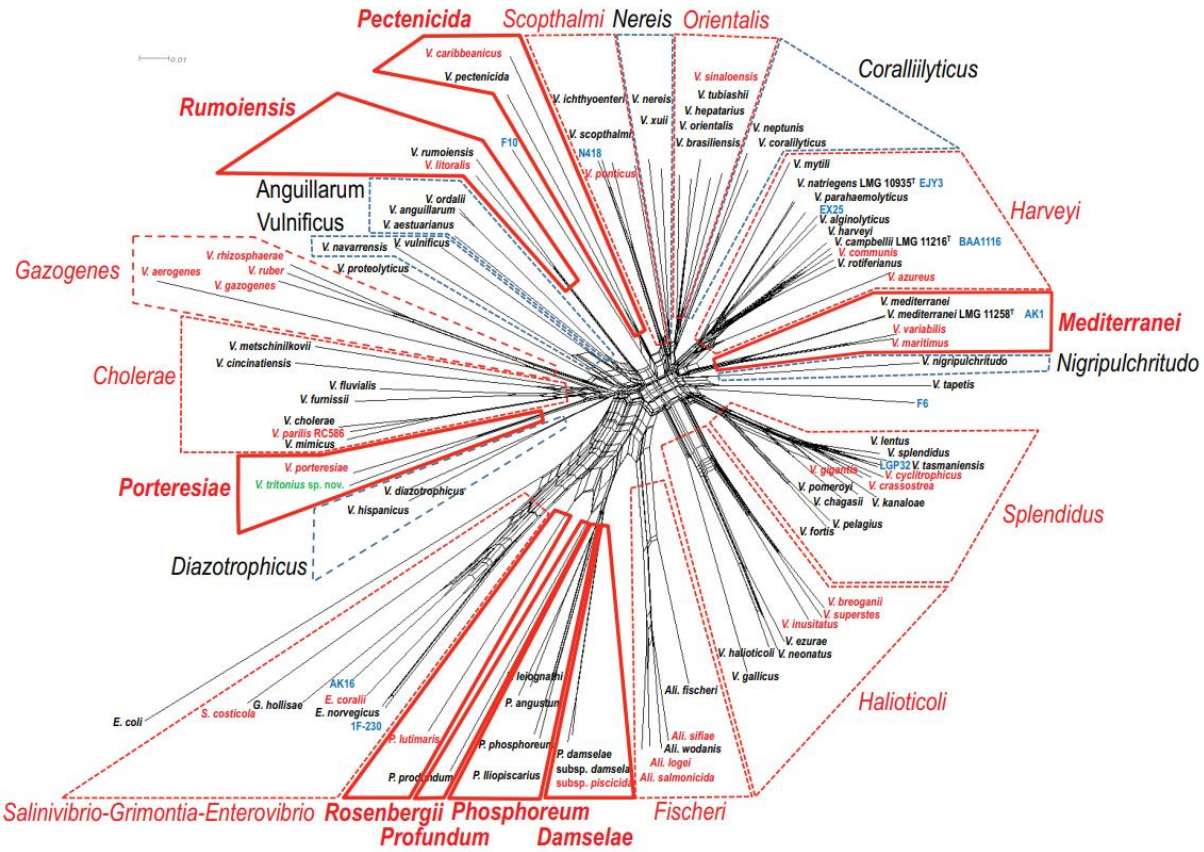


Figure 27 : Clades de la famille des *Vibrionaceae* définis à partir de l'analyse de séquences (*MLSA*) de 8 gènes de ménage (*ftsZ, gapA, gyrB, mreB, pyrH, recA*, *rpoA* et *topA*) de 96 taxons. (Sawabe *et al.*, 2013)

Parmi les *Vibrio* spp., les espèces qui sont principalement retrouvées dans les bivalves sont : *V. splendidus, Vibrio alginolyticus, Vibrio harveyi, Vibrio tubiashii,* et *Vibrio vulnificus* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010 ; Preheim *et al.*, 2011 ; Kwan & Bolch, 2015). Par ailleurs, il existe une saisonnalité dans la représentation de ces espèces dans les bivalves (Arias *et al.*, 1999 ; Romero *et al.*, 2014). En effet, les paramètres abiotiques[54] influent sur la diversité des *Vibrio* spp. présents dans l'environnement et affectent également l'état physiologique des bivalves, perturbant ainsi leur sensibilité aux infections bactériennes (Garnier *et al.*, 2007). En outre, Paillard *et al.* (2004) ont indiqué que l'émergence de vibrions en tant qu'agent étiologique dans les maladies des bivalves est susceptible d'augmenter au fil des années avec le réchauffement des eaux.

Dans l'histoire de l'aquaculture et dans de nombreux pays, des bactéries pathogènes ont causé des pertes importantes de production, notamment dans les écloseries. Nombre d'espèces appartenant au genre *Vibrio* sont considérées comme d'importants organismes pathogènes et ont été impliquées dans des épisodes de mortalité chez de nombreux

[54] Principalement la température et la salinité.

organismes marins (crustacés, mollusques, etc.). Les pathologies causées par les *Vibrio* spp. chez les bivalves ont été décrites depuis les années 1960, mais depuis les deux dernières décennies, de nombreux cas de mortalité ont régulièrement été attribués à ces bactéries. Ainsi, les *Vibrio* spp. ont fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010 ; Romalde *et al.*, 2014 ; Travers *et al.*, 2015).

Jusqu'à récemment, peu d'études avaient fait état de *Vibrio* pathogènes pour les moules. En effet, la pathogénicité des *Vibrio* avait plus souvent été démontrée chez les huîtres, les coquilles Saint-Jacques ou encore les palourdes (Gay *et al.*, 2001 ; Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux, 2002 ; Gay, 2004 ; Garnier *et al.*, 2007 ; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009). Pourtant, à la suite des mortalités massives de moules observées dans le pertuis Breton au printemps 2014, des analyses bactériologiques ont été réalisées et ont révélé la présence de nombreuses bactéries appartenant au clade Splendidus. Ces bactéries ont été isolées dans des proportions importantes dans les moules moribondes (68 %) tandis qu'elles étaient nettement moins représentées dans des moules saines (18 %) (Béchemin *et al.*, 2014 ; François *et al.*, 2015). Des essais d'induction de mortalité ont été réalisés à partir de broyats de moules moribondes, filtrés sur des mailles de 8 µm (permettant de laisser passer les bactéries) et injectés à des individus sains, et 100 % de mortalité ont été obtenus (Béchemin *et al.*, 2015). Les auteurs ont alors conclu à une perturbation des équilibres microbiens due aux conditions météorologiques particulières de l'hiver 2014[55] qui auraient favorisé la prolifération de *V. splendidus* pathogènes pour les moules. Des expérimentations similaires d'induction de la mortalité en laboratoire[56] ont été faites à la suite des mortalités de 2015 – dans lesquelles de nombreuses souches de *V. splendidus* avaient de nouveau été retrouvées (Lupo *et al.*, 2016) – et des conclusions comparables ont été formulées malgré le fait que les conditions abiotiques aient été relativement différentes par rapport à 2014 (Travers *et al.*, 2016b). Ainsi, pour ces auteurs, de même que pour Soletchnik & Robert (2016), les mortalités qui ont frappé les côtes françaises depuis 2014 sont de type infectieuses et « *Vibrio*-dépendantes ». Pourtant, plusieurs auteurs ont indiqué que *Mytilus* spp. étaient considérées comme particulièrement résistantes aux infections par différentes souches de *Vibrio*. En effet, en Italie, Balbi *et al.* (2013) ont testé l'effet d'une souche de *V. splendidus/tasmaniensis* (LGP32) – impliquée dans les mortalités d'huîtres et décrite comme fortement pathogène – sur des moules (10^7 CFU/moule) et aucune mortalité n'a été observée. Toutefois, ils ont observé des perturbations au niveau des fonctions lysosomales des hémocytes des moules ce qui entraîne, d'une manière générale, un stress et

[55] Voir *supra*, section II.1.a. (p. 52).

[56] Dans le cas de ces expérimentations (Béchemin *et al.*, 2015 et Travers *et al.*, 2016), aucune information n'est donnée concernant la concentration bactérienne des broyats – et donc des inoculas testés –, les traits de vie des individus sains utilisés, ou encore les conditions dans lesquelles les expérimentations ont été réalisées.

une perturbation à l'échelle de l'animal. Aussi, Ben Cheikh *et al.* (2016) ont également observé des perturbations au niveau de la réaction immunitaire normale (stress oxydatif et phagocytose) à la suite de l'infection par une souche de *Vibrio* pathogène. Parallèlement, Romero *et al.* (2014) en Galice (Espagne), ont testé la sensibilité de moules à des souches de *V. splendidus,* cette fois issues de l'environnement et ils ont montré qu'elles étaient très résistantes aux infections expérimentales. En effet, des mortalités étaient observées uniquement à des concentrations bactériennes très élevées (10^8 CFU/moule)[57] et dans des conditions environnementales stressantes (hypoxie, température égale à 25 °C au lieu de 15 °C). Pour finir, Oden *et al.* (2016) ont testé plusieurs dizaines de souches de *V. splendidus* – extraites des moules subissant des mortalités en 2014 dans le pertuis Breton – à des concentrations plus proches de celles retrouvées dans l'environnement (10^6 CFU/moule) et ils n'ont obtenu des mortalités significatives qu'avec une seule souche (sur les 23 testées).

D'une manière générale, de très nombreuses souches appartenant au clade Splendidus ont été isolées de l'environnement, ou de moules saines ou moribondes. Ainsi, il semble que certaines de ces souches soient pathogènes, dans des conditions plus ou moins spécifiques, et que d'autres ne le soient pas. Oden *et al.* (2016) ont émis l'hypothèse que certaines souches de *V. splendidus* pouvaient effectivement être pathogènes pour les moules, et entrainer des mortalités, mais que d'autres pouvaient simplement être retrouvées car elles étaient opportunistes et avaient colonisé les tissus en cours de dégradation des moules moribondes. De nos jours, avec les outils de biologie moléculaire comme la MLSA ou le NGS[58], il est possible de différencier précisément ces souches les unes des autres, mais cela reste relativement coûteux. Néanmoins, cela ne donne pas d'information quant au caractère virulent d'une souche. De ce fait, il reste de nombreuses lacunes concernant les interactions existantes entre les moules – et plus généralement les bivalves – et ces bactéries, ainsi que sur les différents mécanismes intrinsèques ou extrinsèques à la bactérie menant à la virulence.

c. Néoplasie hémocytaire et perturbation du cycle cellulaire

La néoplasie hémocytaire, aussi appelée néoplasie disséminée, est une maladie dans laquelle des hémocytes – anormaux, de grande taille, avec un noyau large pléomorphique –, prolifèrent massivement et sont disséminés à travers le système circulatoire (vaisseaux hémolymphatiques) ; ils s'infiltrent dans le tissu conjonctif et les organes (Figure 28) et

[57] Pour référentiel, dans cette même étude, les auteurs montrent que les concentrations bactériennes normale *in situ* et *in vivo* sont, au maximum, égales à 5.10^6 CFU/mL dans l'eau, 2.10^4 CFU/g dans le sédiment, 4.10^5 CFU/g dans le plancton, $7{,}9.10^3$ CFU/mL/g dans les moules et $1{,}4.10^4$ CFU/mL/g dans les huîtres. Les auteurs ont également testé des concentrations inférieures de 10^7 et 10^6 CFU/moule et n'ont observé aucune mortalité.

[58] « *Next Generation Sequencing* » ou séquençage haut débit.

conduisent généralement à la mort de l'animal (Elston, Kent & Drum, 1988a ; Ciocan & Sunila, 2005). Comparable à un cancer, ou plus exactement à une leucémie, cette maladie touche un grand nombre de mollusques bivalves (moules, huîtres, palourdes, etc.). De ce fait, la néoplasie hémocytaire a fait l'objet de nombreuses études au cours de ces cinquante dernières années et différentes hypothèses ont été formulées quant à son étiologie (altérations génétiques, rétrotransposons, contaminants, virus). D'ailleurs, la nature infectieuse de cette maladie est plus spécifiquement avancée dans la mesure où la transmission de la maladie par injection et/ou par cohabitation, entre individus d'une même espèce, a été observée par certains auteurs (Carballal *et al.*, 2015). Cependant, d'après les récents travaux de Metzger *et al.* (2015, 2016), il existerait en réalité deux types de cancer. Dans le premier, les hémocytes néoplasiques ont le même génotype que les cellules de l'hôte et dériverait alors de l'animal atteint. Dans le second, le génotype des hémocytes néoplasiques est différent de celui de l'hôte et serait alors transmis d'un individu à un autre, voire même entre espèces différentes. Quoi qu'il en soit, et malgré les nombreux travaux sur cette maladie, aucun agent causal faisant l'unanimité auprès de la communauté scientifique n'a été identifié comme responsable de néoplasies ; ainsi, encore aujourd'hui l'étiologie de cette maladie reste inconnue.

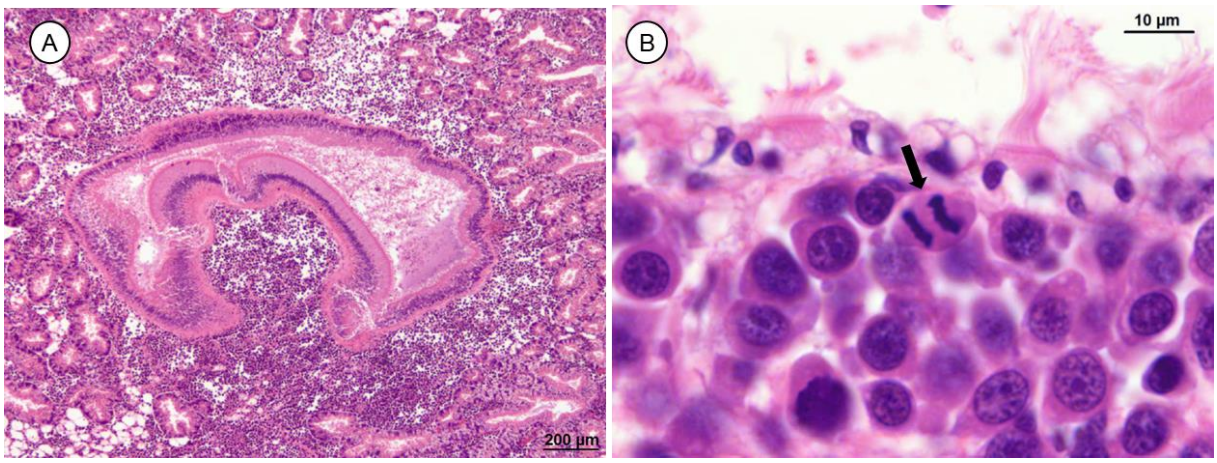


Figure 28 : Stade avancé d'une néoplasie disséminée chez *Mytilus edulis*. (A) Masse viscérale avec des infiltrations massives de cellules néoplasiques dans le tissu conjonctif de la glande digestive et de l'intestin. (B) Agrandissement au niveau du tissu conjonctif envahi par des cellules cancéreuses, une figure mitotique (anaphase) est particulièrement visible (flèche).
Micrographes © Antonio Villalba

Le premier cas de néoplasie hémocytaire chez les moules, a été décrit par Farley (1969) dans 10 % des individus provenant de la baie de Yaquina (Oregon) aux Etats-Unis[59]. Au cours des années qui ont suivi, des cas supplémentaires ont été répertoriés dans plusieurs

[59] A cette époque, les moules présentes dans cette baie étaient décrites comme appartenant à l'espèce *M. edulis*, mais au début des années 1990, les travaux de Brooks (1991) ont permis de reclasser l'espèce comme *M. trossulus.*

pays : en Angleterre (Lowe & Moore, 1979), au Canada (Cosson-Mannevy, Wong & Cretney, 1984), en Espagne (Gutierrez & Sarasquete, 1987), et sporadiquement en France (d'après Noël, 1992). A l'heure actuelle, des cas de néoplasie disséminée chez des bivalves ont été décrits sur tous les continents et dans tous les océans, excepté l'Arctique (Elston, Moore & Brooks, 1992 ; Landsberg, 1996 ; Carballal *et al.*, 2015). Toutefois, la prévalence de la maladie au sein des populations des différentes espèces varie considérablement et les pourcentages élevés sont généralement associés à des mortalités significatives. C'est notamment le cas pour la coque, *Cerastoderma edule*, à l'ouest de l'Europe (Villalba, Carballal & López, 2001), pour la mye commune, *Mya arenaria*[60], au nord-est des Etats-Unis (Barber, 2004 ; Farley *et al.*, 1986), et pour *M. trossulus*, sur la côte ouest de l'Amérique du Nord[61] (Elston *et al.*, 1992). Effectivement, chez ces espèces, la prévalence de la néoplasie dépasse aisément les 20 % (pouvant atteindre 60 %) et la maladie cause des mortalités significatives (Elston *et al.*, 1992 ; Bower, 2006 ; Carballal *et al.*, 2015). Chez les moules, la néoplasie a été reportée chez quatre espèces du genre *Mytilus* : *M. trossulus, M. galloprovincialis, M. edulis* et *M. chilensis*. Enfin, à la différence de l'ouest de l'Amérique du Nord, sur la côte est des Etats-Unis et en Europe[62], les prévalences sont généralement de moins de 4 % et la néoplasie n'est pas associée à des mortalités (Bower, 2006 ; Carballal *et al.*, 2015).

Toutefois, il semble que la prévalence varie en fonction de la saison. En effet, Mix (1983) a constaté que les pourcentages d'animaux atteints étaient plus élevés à la fin de l'hiver[63] (pouvant aller jusqu'à 20 %), puis, que ces taux diminuaient en été (jusqu'à un pourcentage nul), pour de nouveau augmenter à la fin de l'automne. Cependant, il n'a observé aucune saisonnalité dans l'histopathologie de la maladie, c'est-à-dire que le degré d'avancement – du stade initial au stade avancé – n'était aucunement lié à la saison. Concernant la dynamique de la maladie en elle-même, il semble que les premiers stades aient une progression relativement lente (2-3 mois) suivie d'une évolution rapide vers un stade avancé (une néoplasie totale) qui conduit précipitamment à la mort de l'animal (Elston *et al.,* 1988). Majoritairement, la progression de la maladie est fatale pour les animaux (Farley *et al.,* 1986) mais il semble que dans certains cas, la maladie puisse être chronique, et que des rémissions peuvent être observées dans 10 à 20 % des individus (Cooper *et al.* (1982) ; Bower, 2006).

[60] C'est d'ailleurs chez *M. arenaria* que Oprandy *et al.* (1981) ont isolé des particules virales (assimilées à des rétrovirus de type B) d'hémocytes néoplasiques, d'où l'une des hypothèses de l'implication de rétrovirus dans l'étiologie de la néoplasie.

[61] Etats de Washington et de l'Oregon (USA) et en Colombie britannique (Canada).

[62] *M. trossulus* : Danemark, Finlande, mer Baltique, Russie ; *M. galloprovincialis* : Espagne, Italie, Slovénie, Roumanie ; *M. edulis* : Angleterre, Irlande (d'après Carballal *et al.*, 2015).

[63] De janvier à mars.

Enfin, les hémocytes néoplasiques ont un contenu en ADN anormal, ils sont qualifiés d'aneuploïdes et généralement la ploïdie y est plus élevée que dans les hémocytes normaux[64] (ils sont donc hyperploïdes). Ce sont d'abord Lowe & Moore (1978) qui ont comparé la ploïdie de cellules normales avec celles de cellules néoplasiques chez *M. edulis*[65] ; ils ont principalement observé deux quantités différentes en contenu d'ADN qu'ils ont alors défini comme deux types de cellules néoplasiques, un type A et un type B. Ensuite, Elston *et al.* (1990) ont utilisé la cytométrie en flux (CMF) pour étudier la ploïdie de cellules néoplasiques de moules de la baie de Puget (Washington, Etats-Unis). Ils ont eux aussi observé deux populations majoritaires, mais plus précisément, une première avec des cellules pentaploïdes (5n) et décaploïdes (10n), et une deuxième, moins abondante, avec des cellules tétraploïdes (4n) et ectaploïdes (8n). D'ailleurs, d'après ces auteurs, les deux populations peuvent être observées dans un seul et même individu mais cela reste peu commun. Cependant, Moore *et al.* (1991), ont observé ces deux types simultanément, au sein d'une même population de moules[66], et ceci à des stades très avancés[67] ; ils ont alors émis l'hypothèse que cela pouvait être deux processus pathologiques distincts plutôt que deux stades successifs. Plus récemment, Vassilenko & Baldwin (2014) ont à leur tour analysé des *M. trossulus* de Colombie britannique (Canada) à des stades très avancés de la maladie. Ainsi, ils ont obtenu un éventail de ploïdies comprises entre 1,4n et 5,5n et ont obtenu des pics de ploïdie 4n et 5n[68] dans seulement 23 % des moules néoplasiques. Par conséquent, il apparait qu'à des stades précoces de la maladie, aucune corrélation n'existe entre l'aneuploïdie et le nombre de cellules atteintes par la néoplasie. En outre, les travaux récemment effectués en France à la suite des mortalités de 2014 et de 2015, vont plutôt en ce sens (Benabdelmouna & Ledu, 2016 ; Benabdelmouna *et al.*, 2018b). En effet, ces auteurs ont étudié la ploïdie d'hémocytes de populations de moules de la façade atlantique, avant et après mortalité (Figure 29). Comme les auteurs précédents, ils ont observé de l'aneuploïdie[69] dans toutes les populations mais à des pourcentages plus ou moins élevés. De fait, ils ont positivement corrélé ce pourcentage d'anomalies génétiques[70] à la mortalité finale de la population. De la sorte, ils ont défini (i) un seuil individuel correspondant à une faible qualité cytogénétique : au-delà de 10 %

[64] Une ploïdie normale, du moins pour les *M. trossulus* provenant du lagon Esquimalt (Colombie Britannique, Canada), est 2n=28 (González-Tizón *et al.*, 2000).
[65] Provenant de la rivière Lynher, à Plymouth en Angleterre.
[66] De la baie de Puget (Washington, Etats-Unis).
[67] Les animaux étaient moribonds.
[68] Comme l'avaient majoritairement observé les auteurs précédents.
[69] Diploïde-triploïde (2-3n), tétraploïde-pentaploïde (4-5n) à heptaploïde-octaploïde (7-8n).
[70] Ce terme employé par les auteurs regroupe l'hypoploïdie, l'hyperploïdie ainsi qu'un taux anormalement élevé de cellules en phase S-G2/M.

d'hémocytes en phase S-G2/M[71], l'animal est considéré anormal ; (ii) un seuil à l'échelle de la population : au-dessus de 6 % d'individus anormaux cela prédirait des mortalités au sein de cette population.

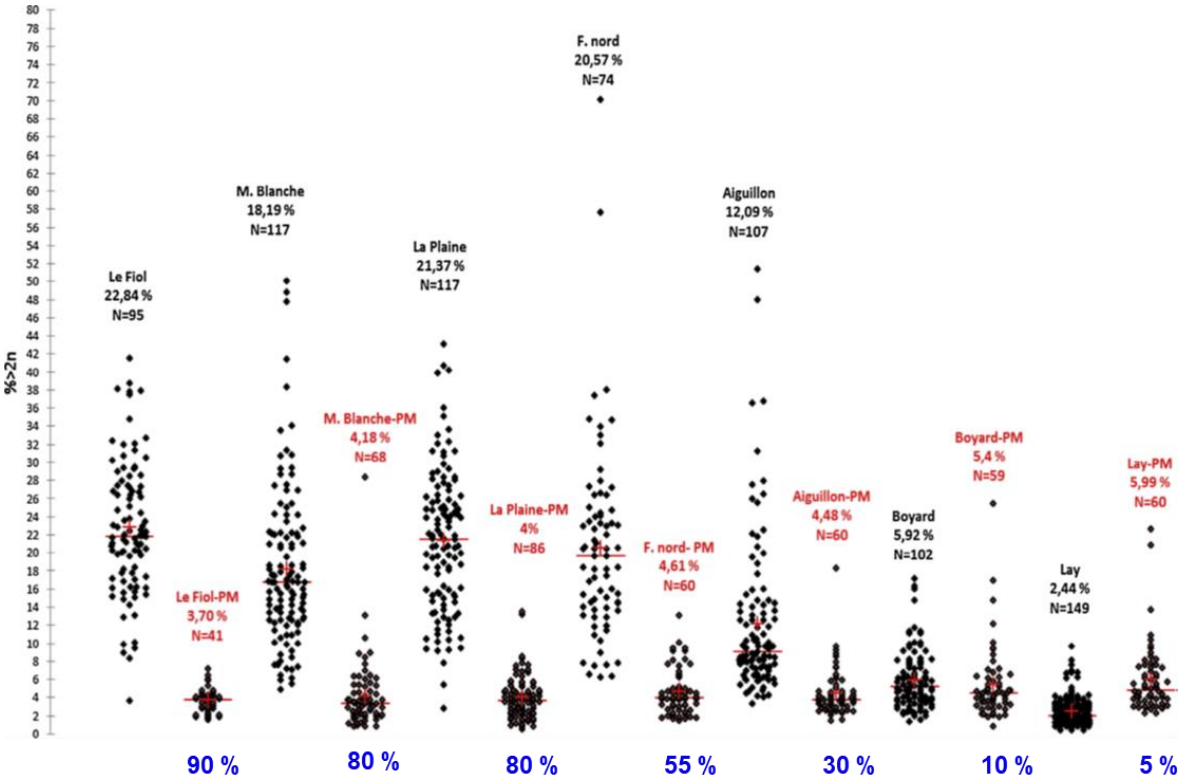


Figure 29 : Pourcentages des moules non diploïdes des différents stocks étudiés par les auteurs avant (en noir) et après (en rouge) l'épisode de mortalité. Les pourcentages sous les noms des sites correspondent aux pourcentages d'anomalies génétiques. [les pourcentages de mortalité obtenus après l'épisode ont été ajoutés pour chaque site en bleu] (Benabdelmouna & Ledu, 2016)

En définitive, quelle que soit l'origine de cette maladie, il est probable que la baisse du nombre d'hémocytes normaux perturbe sensiblement l'homéostasie des moules. En effet, comme décrit dans la section I.2.g. (p. 37), les hémocytes ont des rôles clés et centraux. Finalement, les moules fortement atteintes sont immunodéprimées à cause de la perte de la capacité de phagocytose des hémocytes néoplasiques ; elles ont alors un pouvoir de clairance bactérienne réduit et sont, d'une manière générale, plus sensibles aux perturbations extérieures (Kent *et al.*, 1989; ICES, 2017).

[71] Phase S (pour « Synthèse ») : phase de réplication de l'ADN ; phase G2 (pour « Gap ») : phase de croissance de la cellule et de préparation pour la mitose ; phase M (pour « Mitose ») : phase de répartition des chromosomes entre les deux cellules filles. Une cellule en phase S-G2/M est donc une cellule active, en phase de division cellulaire.

PARTIE 1

-

APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE ANALYTIQUE

PARTIE 1A

-

Suivi des moules de Bretagne Nord

I. Introduction et contexte de l'étude

A la suite des mortalités massives qui ont touché les élevages mytilicoles du Poitou-Charentes et de la Bretagne en 2014, le CRC Bretagne Nord a initié, en 2015-2016, une première étude dans le but de mieux comprendre ce phénomène de surmortalité. D'abord basés sur des entretiens directs avec les mytiliculteurs, les premiers travaux visaient à appréhender quand et comment les mortalités s'étaient manifestées, si des facteurs de risque s'étaient dégagés et si un certain phénomène de propagation avait été constaté. Ce recensement a permis l'établissement d'un premier rapport rédigé par Allain et Bernard (2016), dans lequel un état des lieux conséquent de la situation des bassins mytilicoles français était fait. Ce premier compte-rendu ouvrait également sur de nombreuses questions et perspectives. En conséquence, durant l'année 2016, un observatoire des mortalités mytilicoles a été mis en place par le CRC Bretagne Nord, afin de suivre régulièrement la mortalité dans plusieurs sites dispersés en Bretagne Nord, et afin d'être réellement en mesure de la quantifier. En complément, plusieurs paramètres (conditions météorologiques, température de l'eau, présence de populations sauvages de moules, etc.) ont également été suivis afin d'estimer leur rôle dans les mortalités, et à la fin de l'année 2016, le premier cas de néoplasie hémocytaire a été identifié dans des moules de Lannion (Bernard & Allain, 2017 ; Burioli *et al.*, 2017). Parallèlement, les travaux réalisés par l'Ifremer (Béchemin *et al.*, 2015 ; François *et al.*, 2015 ; Benabdelmouna & Ledu, 2016 ; Lupo *et al.*, 2016 ; Travers *et al.*, 2016a) ainsi que par d'autres équipes de recherche en France (Ben Cheikh *et al.*, 2016 ; Oden *et al.*, 2016) et à l'étranger (Carballal *et al.*, 2015 ; Metzger *et al.*, 2015, 2016) ont conduit à l'établissement de deux pistes principales pouvant potentiellement expliquer les mortalités qui touchaient les moules. La première hypothèse qui se démarquait était celle de l'implication d'un agent infectieux, et plus précisément d'une bactérie pathogène de l'espèce *V. splendidus*, et la deuxième hypothèse – qui n'est pas incompatible avec la première – était celle de la présence d'anomalies cytogénétiques – ou de néoplasie disséminée – chez les animaux. Ainsi, dans cette démarche de recherche, une troisième étude a été commanditée par le CRC Bretagne Nord pour l'année 2017 et pilotée par I. Bernard[72] dans laquelle plusieurs laboratoires de recherche ont collaboré. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude représentent donc la première partie de cette thèse.

[72] Bureau d'études Eurêka Modélisation / SAS Eurêka Mer, fondés et gérés par Ismaël Bernard.

II. Objectifs et démarche

Les deux objectifs principaux de ce suivi des mortalités de moules de Bretagne Nord étaient d'établir les profils bactériens des moules en fonction du site et de la mortalité observée, de détecter la présence de néoplasie hémocytaire et d'en établir la prévalence dans les animaux. Toutefois, il est admis que l'ampleur des mortalités chez les bivalves peut être modulée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques ; ainsi, dans le cadre de cette étude *in situ*, nous avons adopté, autant que possible, une démarche épidémiologique analytique. Ainsi, entre février et octobre 2017, 20 lots ont été échantillonnés (Tableau 3) dans 8 sites dispersés en Bretagne (7 en Bretagne Nord et 1 en Bretagne Sud ; Figure 30) et pour chaque échantillon, un éventail d'analyses de différents types a été réalisé : biométrie (indice de condition), cytologie, détermination de la flore bactérienne, détection des organismes pathogènes connus de bivalves par biologie moléculaire, observations en microscopies optique (examen histopathologique) et électronique, et mesure des contaminants. D'une manière générale, l'objectif était d'identifier des paramètres pouvant expliquer les mortalités anormales que subissaient les moules de certains sites de Bretagne Nord.

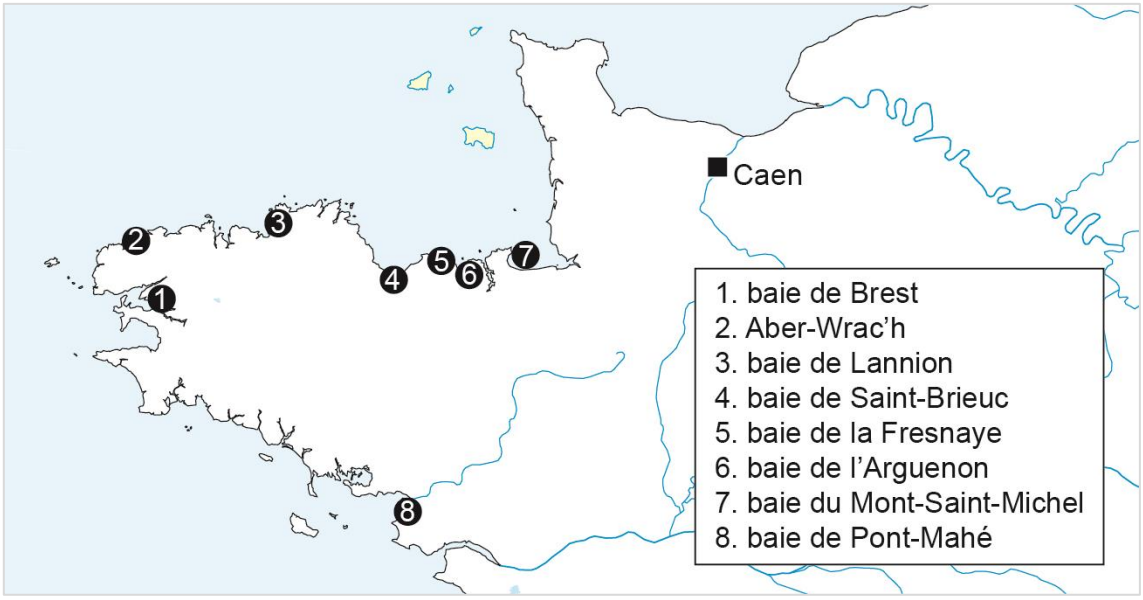


Figure 30 : Localisation géographique des 8 sites mytilicoles de Bretagne échantillonnés en 2017.

Tableau 3 : Plan d'échantillonnage du suivi des mortalités de moules de Bretagne Nord. *NA* : données indisponibles.

Lot	Site	Origine du naissain	Latitude	Longitude	Type	Age approximatif au début de l'étude	Date d'échantillonnage	Site concerné par les mortalités	Observation
L1	Baie de Lannion	Pénestin	48,7457	-3,5900	Elevage (filières)	10 mois	24/02/2017	Oui	-
L2	Baie de Saint-Brieuc	Noirmoutier	48,5502	-2,6474	Elevage (bouchots)	10 mois	27/02/2017	Non	-
L3	Rade de Brest (Pointe de Rostiviec)	La Plaine-sur-Mer	48,3403	-4,3158	Elevage (bouchots)	10 mois	27/02/2017	Oui	Début des mortalités
L4	Rade de Brest (Camaret)	-	48,2822	-4,5723	Sauvages	*NA*	24/04/2017	Oui	-
L5	Rade de Brest (Port du Château)	-	48,3773	-4,4881	Sauvages	*NA*	24/04/2017	Oui	-
L6	Rade de Brest (Pointe de Rostiviec)	La Plaine-sur-Mer	48,3403	-4,3158	Elevage (bouchots)	10 mois	24/04/2017	Oui	Mortalité cumulée à 45%
L7	Aber-Wrac'h	Noirmoutier	48,5876	-4,5022	Elevage (bouchots)	10 mois	24/04/2017	Oui	-
L8	Baie de Saint-Brieuc	Noirmoutier	48,5502	-2,6474	Elevage (bouchots)	10 mois	24/04/2017	Non	-
L9	Baie de Lannion	Pénestin	48,7457	-3,5900	Elevage (filières)	10 mois	17/05/2017	Oui	-
L10	Rade de Brest (Rivière du Faou)	La Plaine-sur-Mer	48,3403	-4,3158	Elevage (bouchots)	10 mois	29/05/2017	Oui	Près de 80% de mortalité
L11	Baie de l'Arguenon	*NA*	*NA*	*NA*	Elevage (bouchots)	10 mois	29/05/2017	Non	-
L12	Baie de Saint-Brieuc (Martin-Plage)	-	*NA*	*NA*	Sauvages	*NA*	28/05/2017	Non	-
L13	Baie de Saint-Brieuc	Noirmoutier	48,5502	-2,6474	Elevage (bouchots)	10 mois	28/05/2017	Non	-
L14	La Fresnaye	Charron	*NA*	*NA*	Elevage (bouchots)	10 mois	29/05/2017	Non	-
L15	Baie du Mont-Saint-Michel (Le Vivier-sur-Mer)	Baie d'Yves	*NA*	*NA*	Elevage (bouchots)	10 mois	29/05/2017	Non	-
L16	Rade de Brest (Pointe de Rostiviec)	La Plaine-sur-Mer	48,3403	-4,3158	Elevage (bouchots)	10 mois	20/09/2017	Oui	-
L17	Pénestin (Baie de Pont-Mahé)	Pénestin	*NA*	*NA*	Elevage (filières)	10 mois	03/10/2017	Non	-
L18	Baie de Lannion	Pénestin	48,7457	-3,5900	Elevage (filières)	10 mois	03/10/2017	Oui	-
L19	Baie de Lannion	Dunkerque	48,7457	-3,5900	Elevage (filières)	10 mois	03/10/2017	Oui	-
L20	Baie de Lannion	île Dumet	48,7457	-3,5900	Elevage (filières)	10 mois	03/10/2017	Oui	-

III. Résultats

Tout ou partie des résultats de cette étude ont fait l'objet de deux rapports techniques, d'une présentation orale lors d'un congrès international et d'un article accepté dans un journal à comité de lecture :

- Bernard I., Charles M., Allain G., Villalba A., Burioli E.A.V., Houssin M., Deydier Y. 2017. Investigation on blue mussel high mortality in France: a phenomenon with high spatio-temporal variability but no conclusive cause. *Oral communication - 2nd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR 2017)*

  (cf. abstract Annexe II, p.304)

- Bernard I., Charles M., Allain G., Burioli E.A.V., Villalba A., Le Foll F., Deydier Y., Houssin M. 2018. Bilan de l'observatoire des mortalités de moules en Bretagne Nord pour la saison 2016-2017 et premiers éléments sur les organismes pathogènes présents. *Rapport technique - CRC Bretagne Nord*

- Bernard I., Charles M., Bierne N., Allain G., Burioli E.A.V., Villalba A., Le Foll F., Deydier Y., Houssin M. 2018. Recherche de pathogènes en lien avec les mortalités de moules en Bretagne Nord en 2017 et 2018 – rapport final. *Rapport technique - CRC Bretagne Nord*

- Charles M., Bernard I., Villalba A., Oden E., Burioli E.A.V., Allain G., Trancart S., Bouchart V., Houssin M. 2020. High mortality of mussels in northern Brittany – Evaluation of the involvement of pathogens, pathological conditions and pollutants. *Scientific article – Journal of Invertebrate pathology.* doi:10.1016/j.jip.2019.107308

  Article 1 (voir infra)

1. Article 1

RESUME

En 2014, plusieurs secteurs mytilicoles français des côtes atlantiques et des côtes de la Manche ont été touchés par des mortalités de moules massives et inhabituelles. Au premier trimestre 2016, le phénomène a de nouveau frappé les exploitations de la côte ouest de la France. Du fait de l'hétérogénéité des mortalités touchant la Bretagne, une étude multiparamétrique a été mise en place pour la saison de production 2017 dans trois sites de Bretagne Nord (Brest, Lannion et Saint-Brieuc). L'objectif était d'évaluer l'état de santé des moules, de suivre la mortalité au cours du temps et d'essayer d'identifier de potentielles causes responsables de la mortalité anormalement élevée dans certains de ces sites. La rade de Brest a été le secteur le plus touché avec 70 % de mortalité cumulée, venait ensuite la baie de Lannion avec 40 % puis, la baie de Saint-Brieuc avec un taux de mortalité admis comme étant normal de 15 %. Cette étude a mis en évidence une « fenêtre temporelle de mortalité » qui s'ouvre pendant le printemps, ainsi que la présence de parasites nuisibles, de néoplasie hémocytaire, de contamination chimique, d'inflammations et de lésions tissulaires dans les sites touchés par les mortalités. Ainsi, il est probable que la combinaison de tous ces facteurs conduise à un affaiblissement des moules pouvant entrainer leur mort.

Mots-clés : Mytilus edulis ; suivi ; multiparamétrique ; néoplasie ; *Vibrio splendidus* ; histologie

HIGH MORTALITY OF MUSSELS IN NORTHERN BRITTANY – EVALUATION OF THE INVOLVEMENT OF PATHOGENS, PATHOLOGICAL CONDITIONS AND POLLUTANTS

Charles M.[1,2,*], Bernard I.[3], Villalba A.[4,5,6], Oden E.[2], Burioli E.A.V.[2], Allain G.[7], Trancart S.[2], Bouchart V.[2], Houssin M.[1,2]

[1] Normandie Université, Université de Caen Normandie, FRE BOREA, CNRS-7208, IRD-207, MNHN, UPMC, UCN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex 4, France

[2] LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

[3] Eureka Modélisation, 22740 Lézardrieux, France

[4] Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar (CIMA), Xunta de Galicia, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

[5] Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Spain

[6] Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE), University of the Basque Country (UPV/EHU), 48620 Plentzia, Basque Country, Spain

[7] Armeria, 31B rue de la Concorde, 56670 Riantec, France

ABSTRACT

In 2014, a high and unusual mass mortality of mussels occurred in several important production areas along the French coasts of the Atlantic and English Channel. In the first quarter of 2016, mass mortalities hit farms on the west coast of the country once again. These heterogeneous mortality events elicited a multi-parametric study conducted during the 2017 mussel season in three sites in northern Brittany (Brest, Lannion and St. Brieuc). The objective was to assess the health status of these mussels, follow mortality and attempt to identify potential causes of the abnormal high mortality of farmed mussels in northern Brittany. Brest was the most affected site with 70% cumulative mortality, then Lannion with 40% and finally St. Brieuc with a normal value of 15%. We highlighted a temporal 'mortality window' that opened throughout the spring season, and concerned the sites affected by mortality of harmful parasites (including pathogenic bacteria), neoplasia, metal contamination, and tissue alterations. Likely, the combination of all these factors leads to a weakening of mussels that can cause death.

Keywords: Mytilus edulis; multi-parametric; neoplasia; *Vibrio splendidus*; *Marteilia*; hemocytic infiltration

[*] Corresponding author: Maud Charles, LABÉO Frank Duncombe, Pôle Recherche, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France.
E-mail: maud.charles@outlook.fr ;

INTRODUCTION

Mussels play a key role in the aquatic environment and are considered to be important ecosystem engineers by providing a suitable habitat for a species rich community (Buschbaum *et al.*, 2008). Due to their intense filtration activity, they modify aquatic habitat, making it more suitable for their own species and other for organisms (Borthagaray & Carranza, 2007). Mussels are also an important food source for many aquatic and terrestrial animals including humans, making them a product with high economic value. The blue mussel industry is important in Europe, a main producer of mussels globally, and France is second in Europe with a production of around 80,000 tons per year, most from aquaculture (FAO, 2018). In France, Brittany is a commercially important area for shellfish farming and is the second mussel producing region with 17,500 tons of *Mytilus* spp. produced in 2016 (CNC, 2016).

In 2014, France was affected by high and unusual mass mortality of mussels, both juveniles and adults, affecting several important production areas along the French coast of the Atlantic and English Channel. Production losses reached 50 - 100% depending on the sites (Béchemin *et al.*, 2015; François *et al*., 2015; Allain & Bernard, 2016; Lupo *et al.*, 2016).The phenomenon again affected farms on the west coast of France in the first quarter of 2016 (FAO, 2016). Unlike mortality events in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), very few massive mortalities of *Mytilus* spp. occurred along the French coast until the winter of 2014 (Brienne, 1964; Blateau, 1989; Guichard *et al*., 2011).

One of the proposed causes of mortality is pathogenic bacteria in the genus *Vibrio* (Béchemin *et al*., 2015). Vibrios are among the major bacterial pathogens of marine organisms and have been identified as pathogens of several bivalve molluscs (Beaz-Hidalgo *et al*., 2010; Lemire *et al*., 2015; Eggermont *et al*., 2017). During mussel mortality events, different *Vibrio splendidus* strains were isolated from moribund mussels in France and were linked to mortality (Travers *et al*., 2015; Ben Cheikh *et al*., 2016). Of the sites studied, the Bay of Brest, located at the extremity of the Brittany Peninsula, is one of the locations where mussels suffered massive mortality in 2014 and beyond. Estimated losses were 30% to 80%, depending on the year. *Vibrio* strains and pathogenic bacteria belonging to the Splendidus clade were identified and associated with these mortalities (François *et al*., 2015; Lupo *et al.*, 2016). Other researchers have suggested that the cause of mussel mortalities is disseminated neoplasia. This disease is well documented in marine bivalves all over the world (Peters, 1988; Elston *et al.,* 1992; Landsberg, 1996; Carballal *et al*., 2015) and, in some bivalve species including the mussel *Mytilus trossulus*, spreads by transmission of cancerous cells between individuals (Metzger *et al.*, 2015, 2016). Some scientists observed chromosomal abnormalities associated with neoplasia in *Mytilus trossulus* (González-Tizón *et al*., 2000) while advanced neoplastic disease

was associated with significant mortalities of *Mytilus* sp. (Moore *et al*., 1991), including *M. trossulus* in Washington and Oregon (USA) and in British Columbia (Canada) (Elston *et al.,* 1992). In France, Benabdelmouna & Ledu (2016) and Benabdelmouna *et al*. (2018) presented evidence of the involvement of genomic abnormalities in mortality outbreaks in blue mussels and linked them to disseminated neoplasia. In addition, some cases of disseminated neoplasia in *Mytilus edulis* from Lannion (northern Brittany, France) were observed in mid-October 2016 by Burioli *et al.* (2017) during a mortality event.

Following heterogeneous mortality events of mussels that occurred in Brittany in the past years (Allain & Bernard, 2016; Bernard & Allain, 2017), the Regional Shellfish Committee of North Brittany (CRCBN) set up mortality monitoring in 2017 with coupled samplings over a period of 8 months. The initial focus was on the detection of neoplasia and on the involvement of a specific strain of *V. splendidus*. Nevertheless, it is known that the magnitude of mortality in bivalves can be modulated by several biotic factors, including the presence of pathogens (Carrasco *et al*., 2015), and by abiotic factors such as chemical contaminants (Coles *et al.,* 1995; Pipe & Coles, 1995; Dailianis, 2010; Moschino *et al.,* 2016), water temperature and animal conditioning (Almada-Villela *et al*., 1982; Seed & Suchanek, 1992; Gosling, 1992, 2003). In an exploratory process, a field study conducted in partnership with mussel farmers was conducted *in situ,* wherein analyses, including biometry (condition index), histopathological examination, determination of bacterial flora, detection of bivalve mollusc pathogens and measurement of trace elements in mussel tissues, were carried out in three different sites in northern Brittany. Our objective of this *in situ* study was to identify potential causes responsible for the abnormal high mortality of farmed mussels in northern Brittany.

MATERIALS AND METHODS

1. Sampling sites and mussels

Three primary mussel production sites in northern Brittany were selected for this study: the bays of Brest (Finistère, France), Lannion (Côtes-d'Armor, France) and St. Brieuc (Côtes-d'Armor, France) (Figure 31). In each bay, one mussel farming company was involved in the study, representing approximately 8% of the mussel farmers in the Bay of St. Brieuc, approximately 25% of those located in the Bay of Brest, and the only farmer working in the Bay of Lannion. In each site, mussel farmers had introduced 7-mo-old mussels (23.51 ± 4.62 mm in length) in the fall 2016 (Sept./Oct.) for their 2017 production season. These mussels were used in this study and were monitored until September 2017. The mussels of Brest originated in La Plaine-sur-mer (Loire-Atlantique, France), those of Lannion in Pénestin (Morbihan,

France) and those of St. Brieuc in Noirmoutier (Vendée, France). The maximum distance between the origination sites is 60 km. The aim of this field study was to monitor and analyse mussels that were representative of those cultivated by the mussel farmers in their area, which depended exclusively on where mussel farmers obtained the spat.

The identification of species was determined from 400 mussels (50 per date and per site) sampled only for this purpose (Table 4). The determination of the species was performed by genotyping on a set of ancestry informative SNPs (Simon *et al.,* 2018).

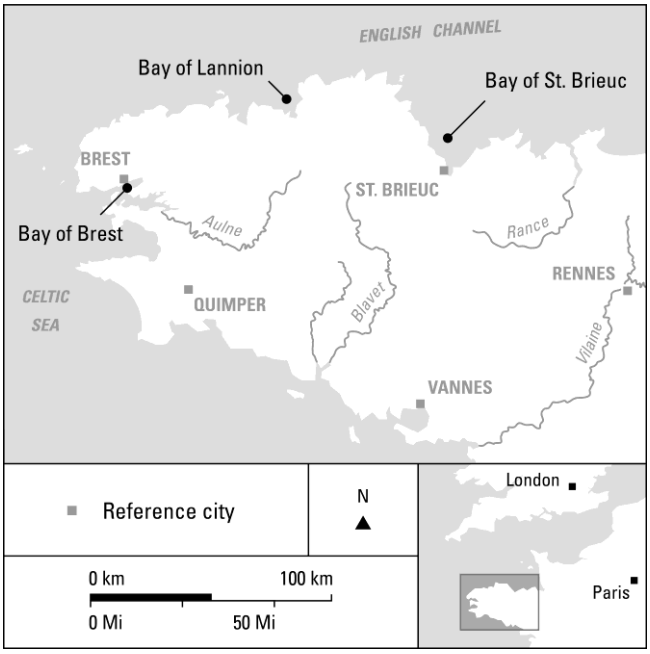


Figure 31: Location of the three sampling sites: the bays of Brest, Lannion and St. Brieuc.

Table 4 : Information on study sites, sampling dates and number of mussels used for each analysis.

Site	Latitude	Longitude	Farming method	Sampling date				Species identification	Histological examination	Other analyses (biometry, bacteriological, molecular, and chemical analyses)
				Feb.	Apr.	May	Sept.			
Bay of Brest	48°20'22.5"N	4°19'48.4"W	*Bouchot*	27/02/2017	24/04/2017	30/05/2017	20/09/2017	50 per date (total=200)	50 per date (total=200)	20 per date (total=80)
Bay of Lannion	48°44'44.8"N	3°35'24.9"W	Longlines	24/02/2017		17/05/2017		50 per date (total=100)	50 per date (total=100)	20 per date (total=40)
Bay of St. Brieuc	48°33'07.6"N	2°38'55.6"W	*Bouchot*	27/02/2017		28/05/2017		50 per date (total=100)	50 per date (total=100)	20 per date (total=40)

2. Mortality and temperature monitoring

In each site, 30 baskets of 100 mussels were prepared (Figure 32A) and fixed on intertidal mussel stakes ("*bouchot*"; Figure 32B) or subsurface longlines (for Lannion) at the beginning of the study. Every month, two baskets per site were collected and live mussels were counted for mortality monitoring. For Brest and St. Brieuc, in order to limit the time dedicated to counting during the tide, different baskets were counted each time; while for Lannion, because the tide is not a constraining factor, the same mussels were counted and put back into the baskets. Thus, each month, 200 mussels per site were counted to estimate mortality. Temperature sensors (HOBO Pendant®) were placed in the baskets containing mussels. These recorded the temperature around the animals (either water temperature or air temperature depending on tide) every 30 min.



Figure 32: Pictures of (A) the preparation of the baskets each containing 100 mussels and (B) the fixing of the baskets on the intertidal mussel stakes ("bouchot"). © Regional Shellfish Committee of North Brittany (CRCBN)

3. Sampling for analysis

Sampling for analysis was carried out with different frequency among sites: February, April, May and September 2017 for Brest, and February and May 2017 for Lannion and St. Brieuc (Table 4). At each sampling, 50 mussels per site were collected from baskets for histology, and 20 additional mussels for biometry, molecular biology, bacteriological and chemical analyses (performed on the same animals). The collected mussels were transported in thermal bags to the laboratory and either analysed immediately or held in a refrigerator (4 °C) overnight and analysed the next day.

4. Biometry

All mussel samples were individually weighed (wet flesh and shell separately after drainage of intervalvar water) with a precision scale (± 0.01 g). A condition index (C.I.) was calculated as follows (Davenport & Chen, 1987):

$$C.I. = \frac{Wet\ meat\ weight}{Shell\ weight}\ X\ 100$$

5. Histological examination

For dissection, shells were opened by cutting the adductor muscle and the soft tissues were removed. An approximately 5 mm thick transverse section of mussel tissue containing mantle lobes, visceral mass (gut, digestive gland) and gills was excised, placed into histological cassettes and transferred to Davidson's fixative for 48 h before being transferred to 70% ethanol. Fixed tissues were then dehydrated through an ascending ethanol series and embedded in paraffin wax. Thick sections, 5 µm, were obtained using a rotary microtome and then stained with Harris' hematoxylin and eosin (HHE) (Howard *et al.*, 2004). Histological sections were examined for all symbionts, including phoresis, commensalism, parasitism and mutualism (Kinne, 1980), and pathological conditions under light microscopy. For each sampling date indicated in Table 4, 50 histological slides corresponding to the 50 sampled mussels were examined.

6. Bacteriological analysis

Analysis was conducted to compare the bacterial flora of mussels from each of the three sites on two different dates (February and May). For each of the six batches, tissues of five live mussels (to avoid the emergence and overexpression of opportunistic bacteria due to tissue degradation in dead animals) were pooled and mashed with scalpels and 200 µL of Artificial Sterilized Sea Water (ASSW) was added to 50 mg of the homogenate. After stirring and pulse centrifugation to pellet cellular debris, ten-fold dilutions of supernatant were made and 100 µL of 1:100 and 1:10,000 dilutions were sown on Zobell marine agar (Agar and ASSW enriched with 0.5% peptone, 0.1% yeast extract, and 0.01% ferric phosphate, pH 7.6; Oppenheimer & ZoBell, 1952) and incubated for 48 h at 22 °C. For each pool, 20 predominant bacterial colonies with different phenotypes were re-isolated in order to verify their purity. DNA extraction was performed by heating a colony placed in 250 µL of purified water (DNA/nuclease free-water) for 10 min at 95 °C. Successful extraction was confirmed by DNA quantification with NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA USA). Then, strains were characterized by molecular analysis (see below).

7. Molecular analyses

The first step to determine the bacterial profile of the mussel batches consisted in discriminating between strains related to the *V. splendidus* clade (*V. splendidus*-related species) and other marine bacteria, as some vibrio strains belonging to this Splendidus clade are known to be pathogenic for molluscs. One TaqMan® real-time PCR, targeting the *16S rRNA* gene of *V. splendidus*-related strains (PCR1) (Oden *et al*., 2016), was carried out on a Smart Cycler® (Cepheid, USA); the primers used for PCR1 were *SpF1*

5'ATCATGGCTCAGATTGAACG3' and *SpR1* 5'CAATGGTTATCCCCCACATC3' (Nasfi *et al*., 2015) and the probe *SpProbe* 5'CCCATTAACGCACCCGAAGGATTG3'. The reaction volume of 25 µL contained 12.5 µL of Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgium), 0.5 µL of each primer (20µM), 0.5 µL of probe (10 µM), 9 µL of purified water and 2 µL of extracted DNA (replaced with 2 µL of purified water in the negative control). The thermal cycling profile was 95°C for 10 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and 62 °C for 30 s. When PCR1 was positive, a conventional PCR targeting the housekeeping genes *mreB* of *V. splendidus*-related strains (PCR2) was performed because it is the most discriminant gene for the identification of closely related strains among the Splendidus clade (Oden *et al.,* 2016). The primer pair for PCR2 was *mreB*-F 5'CTGGTGCTCGYGAGGTTTAC3' and *mreB*-R 5'CCRTTYTCTGAKATATCAGAAGC3′. For colonies not identified as members of the Splendidus clade (PCR1 negative), another conventional PCR targeting the *16S rRNA* gene (PCR3) (Burioli *et al*., 2018) was done; the primer pair for PCR3 was *16S27*-F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' and *16S1492*-R 5'ACCTTGTTACGACTTCAC3'. For the conventional PCR, typical 25-µL reaction mixtures contained 12.5 µL of Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgium), 0.5 µL of each primer (20 µM), 9.5 µL of purified water and 2 µL of DNA template (replaced with 2 µL of purified water in the negative control). Conventional PCR amplifications were carried out in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, France) and the thermal program was as follows: 10 s at 95°C; 30 cycles for 10 s at 95°C, 30 s at 55°C, 40 s at 72°C and a final extension of 3 min at 72°C. PCR products were then analysed with QIAxcel® Advanced System (Qiagen, Courtaboeuf, France) and those with the expected size were sent to Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) to be purified and sequenced. Species were identified using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignement Search Tool (BLAST) with individual *16S rRNA* sequences, and *mreB* sequences were aligned using a multiple sequence alignment Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE). Phylogenetic analyses were performed in MEGA7 (Kumar *et al*.,, 2016) using the Neighbor Joining method (Tamura *et al*, 2013) and the maximum composite likelihood model with a bootstrap of 1000 replications; sequences of the *mreB* gene from 44 different reference bacterial strains from the Splendidus clade were used (see *2.1.* in Oden *et al*., 2016). *V. aestuarianus* 02/041, *V. ordalii* 12B09 and *V. penaeicida* AQ115, were provided from the Genomic of *Vibrio* Research Department (CNRS Roscoff, France) and used as the Splendidus clade outgroup.

In parallel, the presence of known bivalve pathogens (*Bonamia* spp., *Haplosporidium nelsoni*, *Marteilia* sp., *Mikrocytos mackini*, *Nocardia crassostreae*, Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV-1), *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. harveyi*, and *V. splendidus*) was investigated by PCR on DNA extracts from mussel tissues (Additional file 1).

Additional file 1: Supplementary Materials and Methods

Real-time PCR screening for bivalve mollusc known pathogens

For each mussel, a pool of minced tissues from gills, mantle, and digestive gland was subjected to DNA extraction using a QIAamp DNA minikit® (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol for blood or body fluids, except for elution performed in 60 µL Qiagen elution buffer AE. The quality of the extracted DNA was checked with NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA USA). Within the same batch, the individual extracts were pooled in groups of 5 to have 4 replicates per batch for each PCR done. The known bivalve pathogens investigated by TaqMan® real-time PCR and classical PCR were: *Bonamia* spp., *Haplosporidium nelsoni*, *Marteilia* sp., *Mikrocytos mackini*, *Nocardia crassostreae*, Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV-1), *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. harveyi*, and *V. splendidus* (the true species *V. splendidus* of the Splendidus clade named here Splendidus cluster) (Table 5). Amplification reactions were performed in a total volume of 25 µL using a SmartCycler® (Cepheid, USA). Each reaction contained 12,5 µL of a Premix Ex Taq® 2 X Takara®(Lonza, Verviers, Belgium), 9 µL of purified water, 2 µL of DNA sample (replaced with 2 µL of purified water in the negative control) and 0.5 µL of each primer (20 µM) and probe (10 µM) or SYBR Green (for *N. crassostreae*). Each assay included negative and positive control reactions. The thermal cycle profile consisted of 95 °C for 10 s followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 60° for 30 sec (or 62 °C for *V. splendidus* or 64 °C for *V. harveyi*). Beforehand, for each real-time PCR developed for this study, the inclusivity and exclusivity were tested. Moreover, in order to exclude false-positive results, when a signal was obtained, the amplicon was sent to Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) to be purified and subsequently sequenced; only then, after using the NCBI BLAST, confirmation of the targeted pathogen could be made.

Table 5 : Target genes, primers (forward (Fw) and reverse (Rv)) and probe (Pr) used for detection of known bivalve molluscs pathogens.

Name of pathogens	Target gene	Oligo-nucleotides sequences (5'-3')	References
Bonamia sp.	*28S rRNA*	Fw TCCCTGCCCTTTGTACACA Rv CTCTTATCCACCTAATTCACCTCAG Pr TxR-CGCCCGTCGCTTCTACCGATT-BHQ2	Present paper
Haplosporidium nelsoni	*SrRNA*	Fw CACGCGCGCTACAATGT Rv CGAGATTACCCGGCCTTCT Pr FAM-CACGCAACGAGTTCAACCTTGCC-BHQ1	Present paper
Marteilia sp.	*ITS1*	Fw CACACTACTCTTCGCTTTCGAT Rv GACTACCCGTGCCGAACA Pr Cy3-TCGCAAACAGGAAGCGGCTCTC-BHQ1	Present paper
Mikrocytos mackini	*28S rRNA*	Fw GGTGGCCGAATGACGTAGT Rv GCCTATGACAGCACGAAGCA Pr Cy5-CCGCTTCGGCGTGCAGTCTC-BHQ2	Present paper
Nocardia crassostreae	*16S-23S rNA ITS*	Fw CCTCGATACCGCCGAAGAA Rv CAACACACCCGCATCAAA	Carrasco *et al.* (2013)
OsHV-1	*B region*	Fw GTCGCATCTTTGGATTTAACAA Rv ACTGGGATCCGACTGACAAC Pr TxR-TGCCCCTGTCATCTTGAGGTATAGACAATC-BHQ2	Martenot *et al.* (2010)
V. aestuarianus	*dnaJ*	Fw GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA Rv CAATTTCTTTCGAACAACCAC Pr TxR-TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC-BHQ2	Saulnier *et al.* (2009)
V. tubiashii	*vtpA*	Fw GGTACGGACTATCCGGGATT Rv TTCACCGCTGAGTTGTTCAT Pr Cy3-ATCGTCGATAAATCAGGCACAACCTGT-BHQ1	Present paper
	vth	Fw CGGTTGATATTCGCGTCAA Rv GTGTGAAACCCTGCGAAGTA Pr Cy5-TATCACAGATGCGCTCGGTTCAGTC-BHQ2	Present paper
V. harveyi	*16S rRNA*	Fw CGAGCGGAAACGAGTTATCTG Rv CTCACCAACTAGCTAATCCCACCTA Pr TxR-CCGCATAATACCTACGGGTCAAAGAGGG-BHQ2	Present paper
V. splendidus (Splendidus cluster)	*toxR*	Fw AGCAGCGGCTGAAATTGCA Rv GGCCGCAGTTGGTGTTGTT Pr FAM-CAATGACTGAAGCTGTCGAGCCC-BHQ1	Oden *et al.* (2018)

8. Chemical analyses of flesh

The objective of chemical analyses was to assess if one site was more contaminated than others by one or more chemical compounds, which might explain why mortality was higher in one than in the others. For cost reasons, there were limitations in the number of samples that could be analysed. Because mortality began to increase in February, we chose to analyse and compare the three sites during that month rather than in May.

Presence of trace metal compounds (Pb, Hg, Cd, Co, Mo, Sn, Cr, Cu, Ni, Zn, Fe, Al, Mn and Ti) and non-metallic trace elements (As and Se) in mussel flesh was quantitatively determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS Triple Quad 8800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) after wet digestion through high-quality grade mineral acids (HNO3, Analpure®, Analytika® , Prague, Czech Republic) and oxidants (H2O2, Normapur®,VWR international, Radnor, Pennsylvanie, USA), following previously described protocols (Squadrone et al., 2016). All analyses were calibrated against analytical standards. The limit of quantitation was 0.02 mg/kg for elements analysed by ICP-MS. All concentrations are given on a wet weight (w. w.) basis.

9. Data analysis

Half-stock index

To compare mortality phenomena over time, the half-stock index (Bernard *et al*., 2018) is more suitable than using a cumulative mortality rate since it allows visualization of what is happening at a given time. Indeed, to compare different mortality episodes, it is preferable to consider the exponential aspect of population decrease. Thus, if λ is the mortality rate, supposed constant $N(t)$ the population at t time, and N_0 the population at the beginning of the study, then: $N(t) = N_0^{e^{-\lambda t}}$. Between two successive counts in t_{i-1} and t_i, there is only one λ which describes these two points:

$$\lambda = \frac{ln\,(N_{i-1}) - ln\,(N_i)}{t_i - t_{i-1}}$$

To obtain a more tangible index, the time (in days) needed to halve the population was used: $d_{0.5} = ln\,(2) / \lambda$. Therefore, this index corresponds to the number of days it takes to halve the population with the measured mortality rate, in a very similar way to half-life of radioactive elements. The lower this index, the higher the mortality rate and decrease of the stock. In the absence of mortality, this index tends towards infinity. For a better graphical representation, a maximum value was assigned to this index equal to 1500 (which corresponds to a loss of 15% over 1 year).

Statistical analysis

The half-stock index has been used to analyse and compare instantaneous mortality with different sampling intervals. It has also been used as the variable response to link the variation of mortality with the prevalence of pathological observations. This relationship was tested using a Spearman correlation test. Temperatures presented here have been smoothed in order to represent annual variation using generalized additive models with smoothing term with a moving window corresponding to one month.

Regarding biometry data, replicates were averaged, and the values were tested for normality (Shapiro). Then, a first ANOVA was used to compare the C.I. of Brest mussels at the four sampling dates, and a second to compare the C.I. of mussels from the three sites on both dates (February and March). When a significant difference was obtained, paired comparisons by Tukey's *post hoc* test were performed to identify which C.I. were different from the others. Statistical significance was accepted for $*p < 0.05$. The association between the C.I. and observed mortality was evaluated using a Pearson correlation test. Statistical analyses and graphical representations were performed by using R software, version 3.5.1 (https://www.r-project.org/) and 'dplyr', 'tidyr' and 'ggplot2' packages.

RESULTS

1. Mussel species, temperature monitoring and mortality

For species identification, a dataset of 81 common markers was obtained (for more details, see Simon *et al*, 2019), which allowed identification of all mussels as the species *M. edulis*.

Regarding thermal profiles (Figure 33), Lannion appears to be a rather temperate site compared to those of Brest and St. Brieuc, which showed wider temperature variation, especially higher temperatures in summer. From February to August, the temperature of Lannion rose from 9 to 18 °C, that of St. Brieuc from 9 to 20 °C and that of Brest from 8.5 to 20 °C. The first abnormal mortalities were observed at the very end of winter and early spring 2017 (Figure 33) in the most western site. Indeed, Brest was the most affected site as it suffered continuous mortality as illustrated by the half-stock index until mid-summer (Figure 33B**)**. The site had nearly 70% cumulative mortality at the end of the study (Figure 33A**)**. Lannion was less severely affected than Brest –but more than St. Brieuc– with a progressive decreasing trend in the half-stock index leading to a final cumulative mortality of almost 40%. St. Brieuc experienced some sporadic mortality peaks, but not considered abnormal. At the end of the study, a cumulative mortality of about 15% was obtained, which was a typical value for institutions (Council Directive 95/70/EC abrogated by 2006/88/CE) and mussel farmers. Furthermore, mortality decreased significantly or even stopped in mid-summer when temperatures exceeded 18 °C.

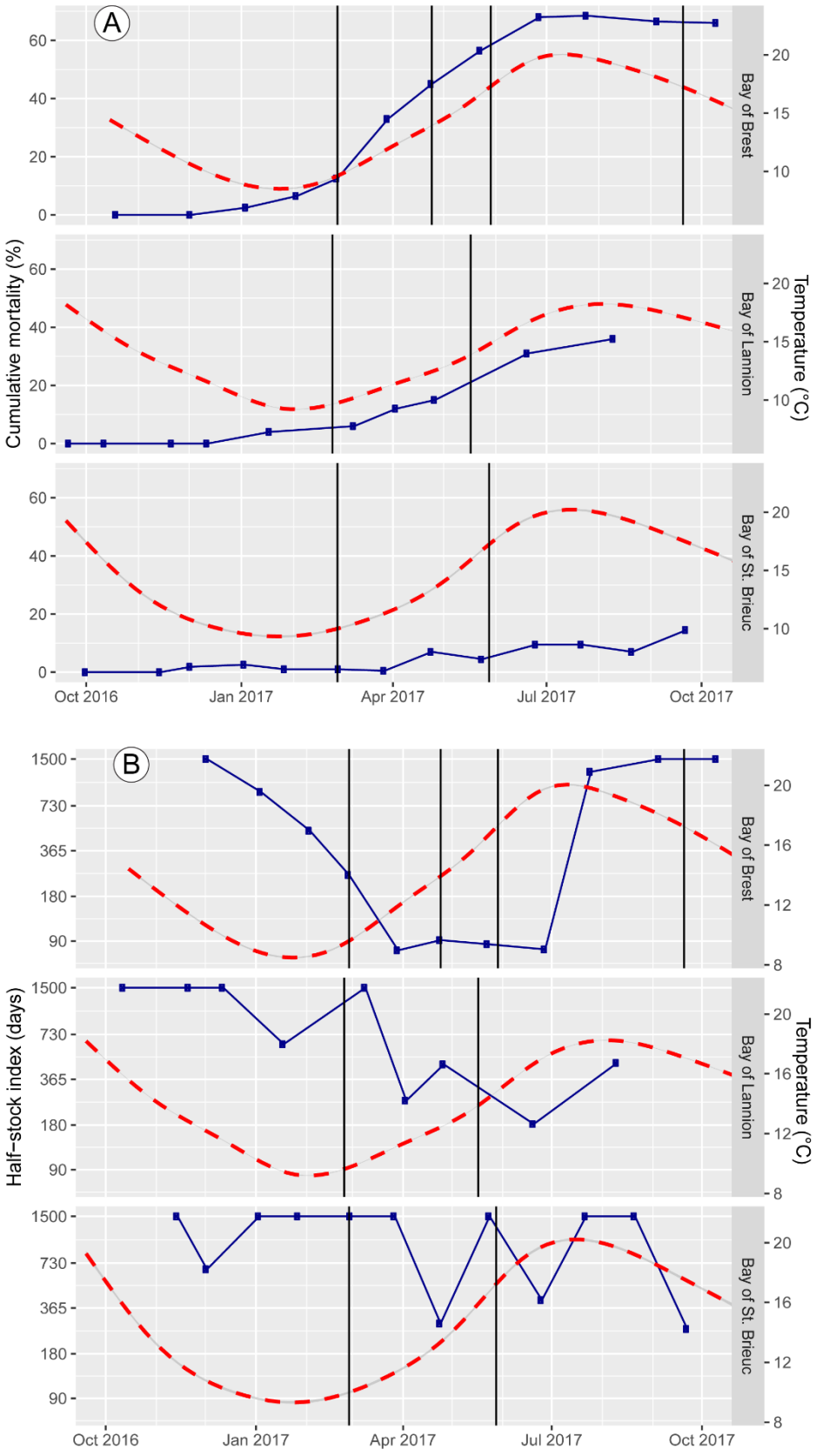


Figure 33 : Variation of temperature (broken line) and: (A) cumulative mortality (%) observed over the duration of the study based on monthly mortality monitoring (continuous line with dots); (B) half-stock indices (days) calculated monthly to visualize the occurrence of mortalities for each month (line with dots). The vertical black lines correspond to the dates of sampling for analyses.

2. Biometry

When the C.I. of Brest mussels at the four sampling dates between February and September 2017 were compared, despite an upward trend in the April index, no significant difference was observed (ANOVA, $p > 0.05$) (Figure 34). When the C.I. of mussels from the three sites on both dates (February and May 2017) were compared, no significant differences was observed in February but in May, the C.I. of mussels from Lannion were significantly higher than those of Brest mussels (ANOVA, $p < 0.05$ and Tukey's *post hoc* test) (Figure 35). There was no significant difference between the two C.I. in February and in May for the same site and no significant link appeared between observed mortality and C.I. (Pearson correlation, $p > 0.05$).

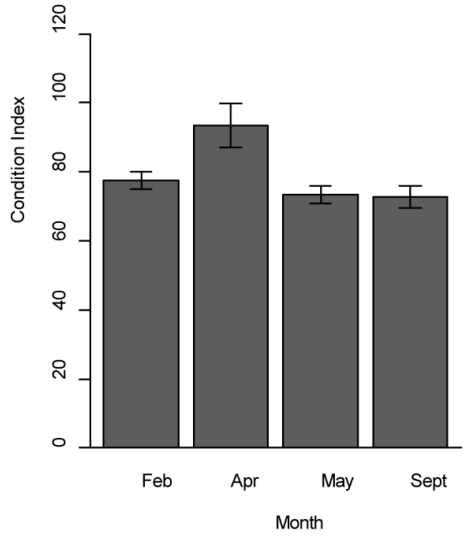


Figure 34: Evolution of the Condition Index (C.I.) of the Brest mussels on four dates (February, April, May and September 2017). Values are means ± SEM (ANOVA, $p > 0.05$).

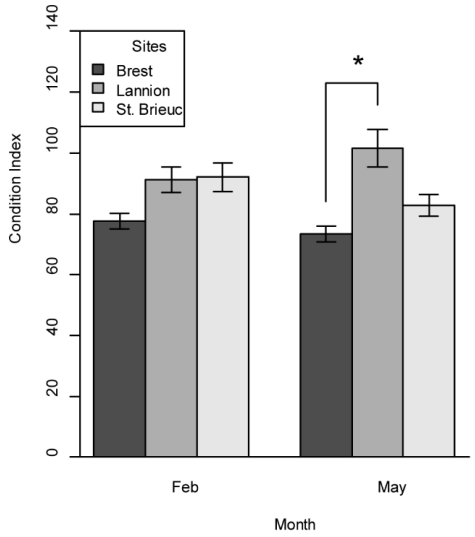


Figure 35: Comparison of the Condition Indices (C.I.) of mussels from the 3 sites (Brest, Lannion, St. Brieuc) on both dates (February and May 2017). Values are means ± SEM (ANOVA, *$p < 0.05$ and Tukey's *post hoc* test).

3. Histological examination

Histopathological examination showed the occurrence of various symbionts and pathological conditions. Regarding symbionts, the different stages characterising parasites of the genus *Marteilia* were observed in the stomach and digestive diverticula epithelia (Figure 36A), from primary cells enclosing some secondary cells in the stomach and digestive diverticula epithelium to fully developed stages in digestive diverticula, in which secondary cells included tertiary cells and had refringent granules in their cytoplasms. Occasionally, early stages of *Marteilia* sp. were observed in the gills, associated with heavy inflammatory response. Two types of ciliates were also observed, one type resembling *Ancistrum mytili* in the gills (Figure 36B) and intracellular ciliates in the epithelium of digestive tubules (Figure 36C). Trematode sporocysts enclosing developing cercariae were observed in the connective tissue of the mantle and the visceral mass (Figure 36D). *Mytilicola* sp. copepods were found in the intestinal lumen Figure 36E).

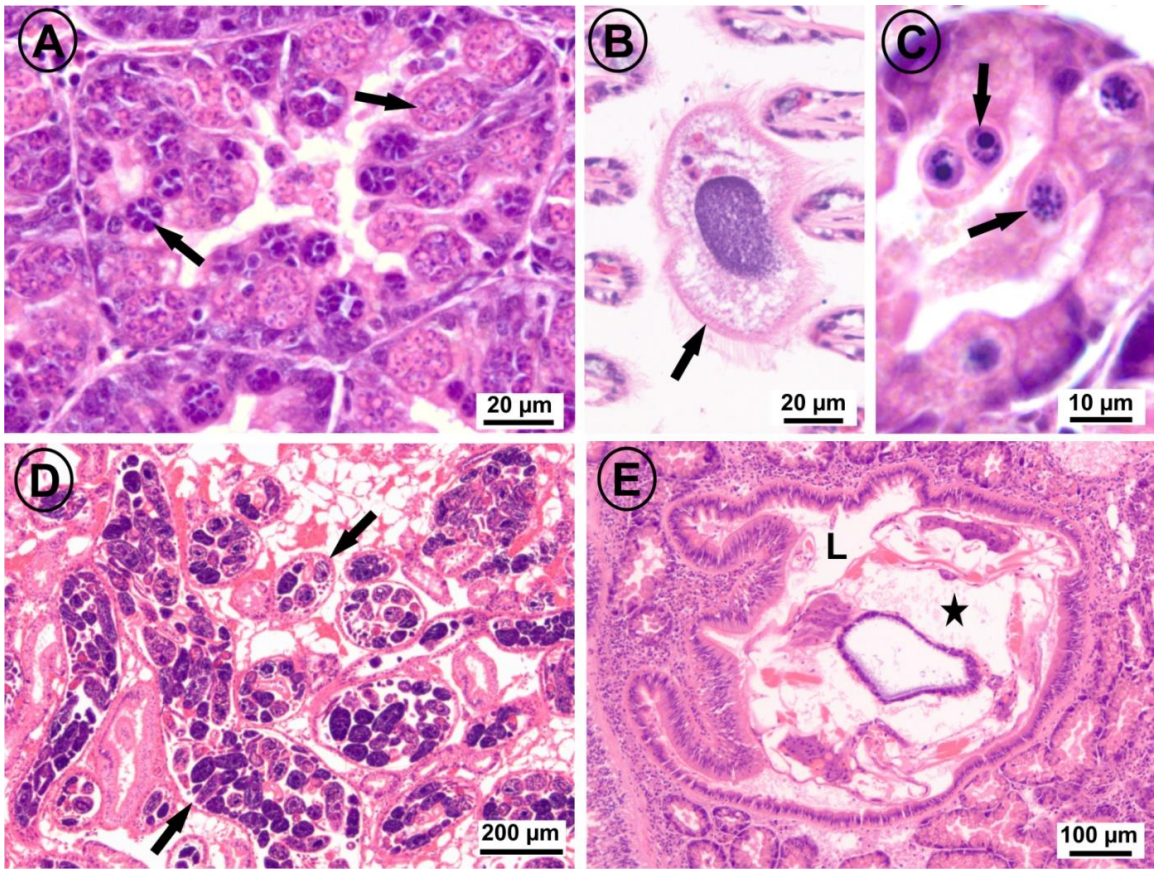


Figure 36: Micrographs of histological sections showing symbionts found in *Mytilus edulis*. A: section of the digestive gland showing different developing stages of *Marteilia* sp. (arrows) in the epithelium of digestive tubules. B: section through the gills showing a a cell of the ciliate *Ancistrum mytili* (arrow). C: section through the digestive gland showing various intracytoplasmic ciliates (arrows) in the epithelium of a digestive tubule. D: section through the mantle showing trematode sporocysts (arrows) enclosing cercariae. E: section through the visceral mass showing a copepod *Mytilicola* sp. (star) in the intestinal lumen (L).

Regarding other pathological conditions, cases of heavy hemocytic infiltration of the connective tissue of different organs were detected, but without any identifiable inducing agent (Figure 37A). The occurrence of large masses of hemocytes, mostly granulocytes, surrounded by several layers of flattened, epithelioid cells, were also observed in the connective tissue of various organs (Figure 37B). This type of inflammatory structure is usually called a granulocytoma and its occurrence was not linked to any detectable agent. Finally, cases of disseminated neoplasia, characterised by the infiltration of the connective tissue by abnormally large cells that also proliferate through the circulatory system Figure 37C) were observed. The nucleus of the abnormal cells was significantly larger than that of normal cells, with at least one patent nucleolus, showing frequent mitotic figures that indicated a high division ratio (Figure 37D).

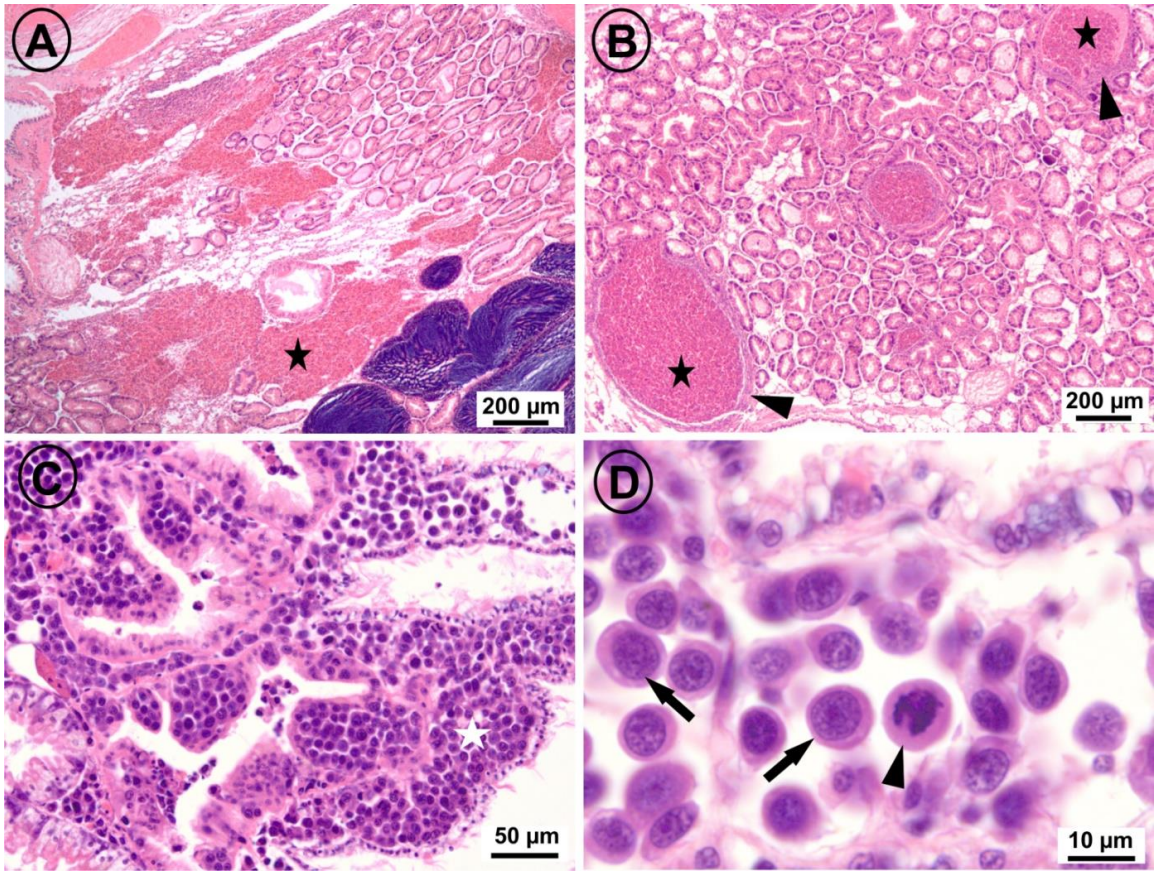


Figure 37: Micrographs of histological sections showing pathological conditions of *Mytilus edulis*. A: section through the visceral mass showing heavy hemocytic infiltration (star) of the connective tissue. B: section through the digestive gland showing granulocytomas consisting of large masses of hemocytes (stars) surrounded by layers of flattened, epithelioid cells (arrowheads). C: section through the visceral mass showing the connective tissue heavily infiltrated with masses of neoplastic cells (star). D: Higher magnification of the previous micrograph showing abundant neoplastic cells (arrows) in a hemolymph sinus: a cell in mitotic process is pointed out with an arrowhead.

The prevalence of symbionts and pathological conditions in each site is shown in Figure 38. Regarding those with potentially the most serious consequences (granulocytomas, hemocytic infiltration, disseminated neoplasia, trematode sporocysts and *Marteilia*), Brest was the most affected site (Figure 38A). Indeed, it was the only site in which 4 out of 5 serious pathological conditions occurred in February (granulocytomas: 2.9%; hemocytic infiltration: 14.3%; trematode sporocysts: 11.4% and *Marteilia*: 22.9%) and in May (granulocytomas: 4.1%; hemocytic infiltration: 26.5%; trematode sporocysts: 2.0% and *Marteilia*: 22.5%). It was also the only site affected with *Marteilia* sp., which occurred over the entire study period and had a prevalence peak in April with 36% of individuals infected (Figure 38B). In February, Lannion and St. Brieuc were affected by granulocytomas with similar prevalence (6.7% and 6.5%, respectively), twice that of Brest, and twice as many individuals showed trematode sporocysts at St. Brieuc (6.5%) than at Lannion (3.3%). In May, a low percentage of Lannion mussels had disseminated neoplasia (2.4%), while it was not detected in St. Brieuc. It is important to note that St. Brieuc had no sign of hemocytic infiltration, neither in February nor May. In contrast, St. Brieuc was the most affected by two less damaging symbionts, ciliates and *Mytilicola* sp., both in February and May. The prevalence of hemocytic infiltration increased in Brest from February to May, while it remained almost constant at Lannion. Figure 38B illustrated these observations for Brest; indeed, there was an increase in hemocytic infiltration and *Marteilia* between February and April, then a gradual decrease from April to September. Furthermore, 18% of mussels from Brest showed disseminated neoplasia in April, while it was not found in February or May, and its prevalence was 2% in September. In Brest, the prevalence of most symbionts and the other pathological were highest in April.

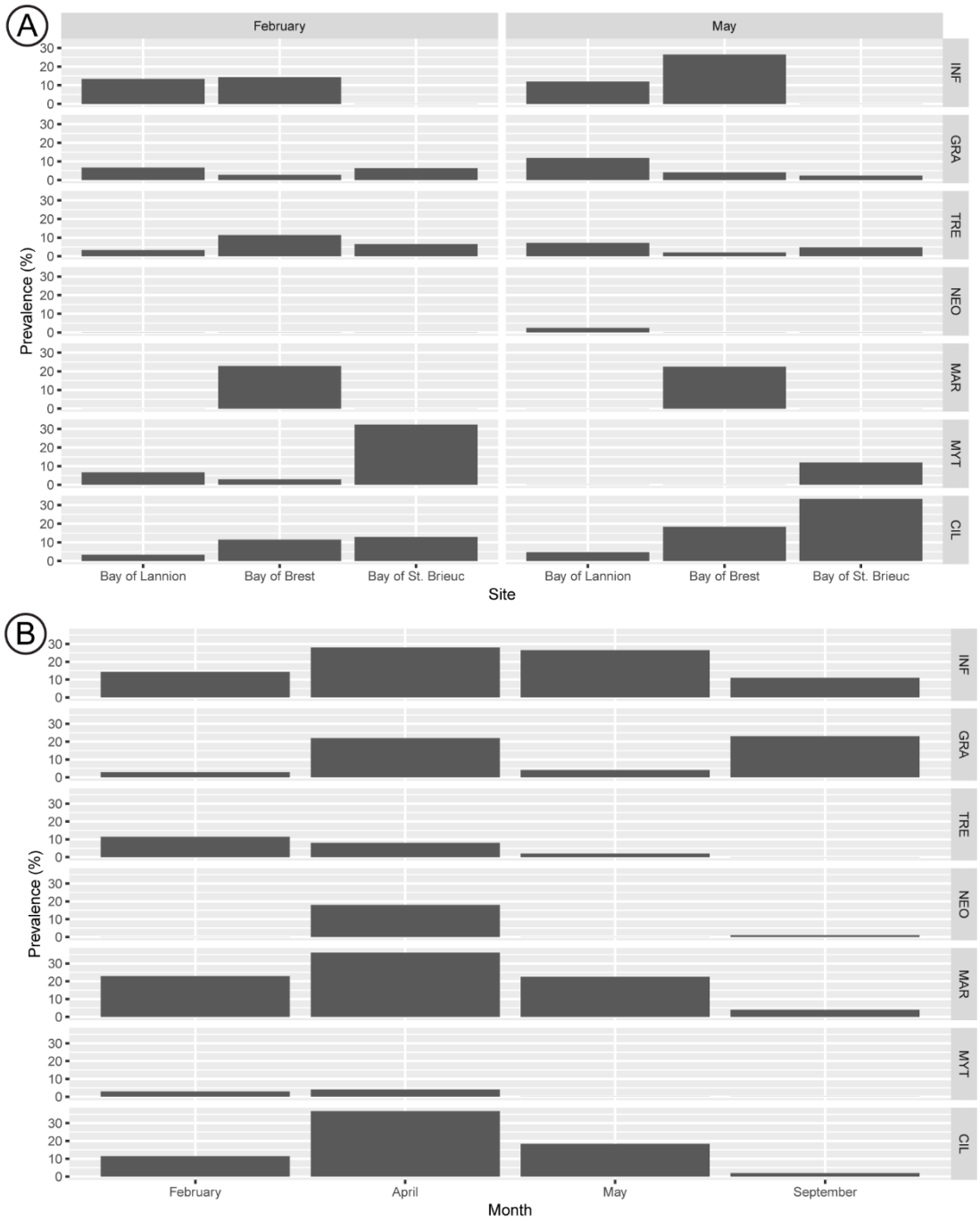


Figure 38: Prevalence (%) of the most remarkable histopathological observations: granulocytomas (GRA), inflammation/haemocytic infiltration (INF), disseminated neoplasia (NEO), trematode sporocysts enclosing cercariae (TRE), *Marteilia* sp. (MAR), *Mytilicola* sp.(MYT) and ciliates (CIL) identified (A) in the 3 bays (Brest, Lannion, St. Brieuc) on both dates (February and May 2017); (B) in Brest on four dates (February, April, May and September 2017).

The prevalence of the symbionts and other pathological conditions showed an inverse relationship with the half-stock index. When testing the link between the prevalence of the different pathological conditions and the half-stock index (Spearman correlation test; Figure 39), only hemocytic infiltration was significantly positively correlated to the intensity of mortality ($p^* < 0.05$). Nevertheless, the p-value of Marteilia –equal to 0.08– was influenced by its

absence in Lannion and St. Brieuc; in Brest, the higher the prevalence of Marteilia, the lower the half-stock index.

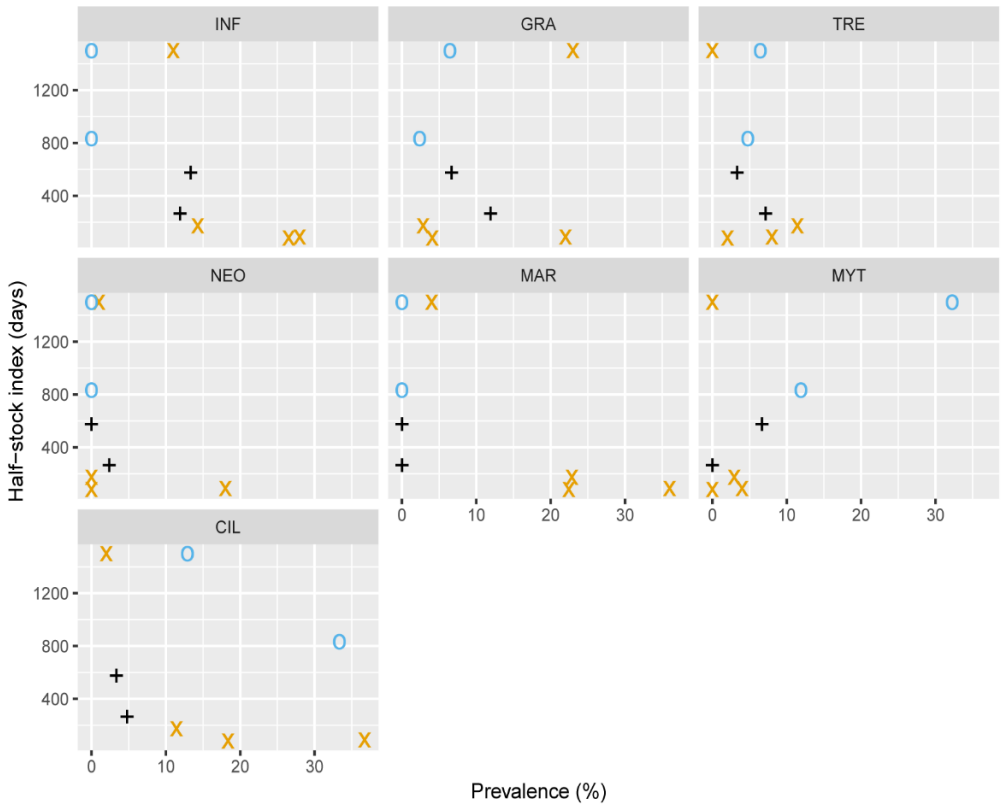


Figure 39: Link between the prevalence (%) of symbionts and histopathological conditions and the half-stock index (days) for each site: Brest (letter x), Lannion (plus sign) and St. Brieuc (open circle). INF: haemocytic infiltration; GRA: granulocytomas; TRE: trematode sporocysts enclosing cercariae; NEO: disseminated neoplasia; MAR: *Marteilia* sp.; MYT: *Mytilicola* sp.; CIL: ciliates.

4. Molecular analyses

Bacterial profiles

Following the identification of the 120 isolated bacterial strains from tissue culture, it was noted that bacterial diversity was relatively higher in May than in February (Figure 40). In February, between four (Brest & Lannion) and five (St. Brieuc) different species per site were present among the 20 strains isolated compared to seven (Brest & St. Brieuc) and nine (Lannion) different species in May. However, despite this difference in diversity, two bacteria remained dominant: *V. splendidus* and *Pseudoalteromonas* sp. *V. splendidus* prevalence in February was 42% in Brest, 35% in Lannion and 80% in St. Brieuc; in May, prevalence was 30% in Brest, 0% in Lannion and 23% in St. Brieuc. In February *Pseudoalteromonas* sp. prevalence was 21% in Brest, 55% in Lannion and 5% in St. Brieuc; while in May, prevalence was 45% in Brest, 42% in Lannion and 29% in St. Brieuc. Among the 30 strains of *V. splendidus* isolated

in the three February batches –7 in Lannion, 15 in St. Brieuc and 8 in Brest– all had a different *mreB* sequence, except for three strains found in St. Brieuc (1) and in Brest (2), which had an identical sequence. When comparing bacterial profiles with the occurrence of mortalities, no difference appeared; *V. splendidus* was found in high abundance in almost all sites, as was *Pseudoalteromonas* sp. to a lesser extent, with or without mortalities.

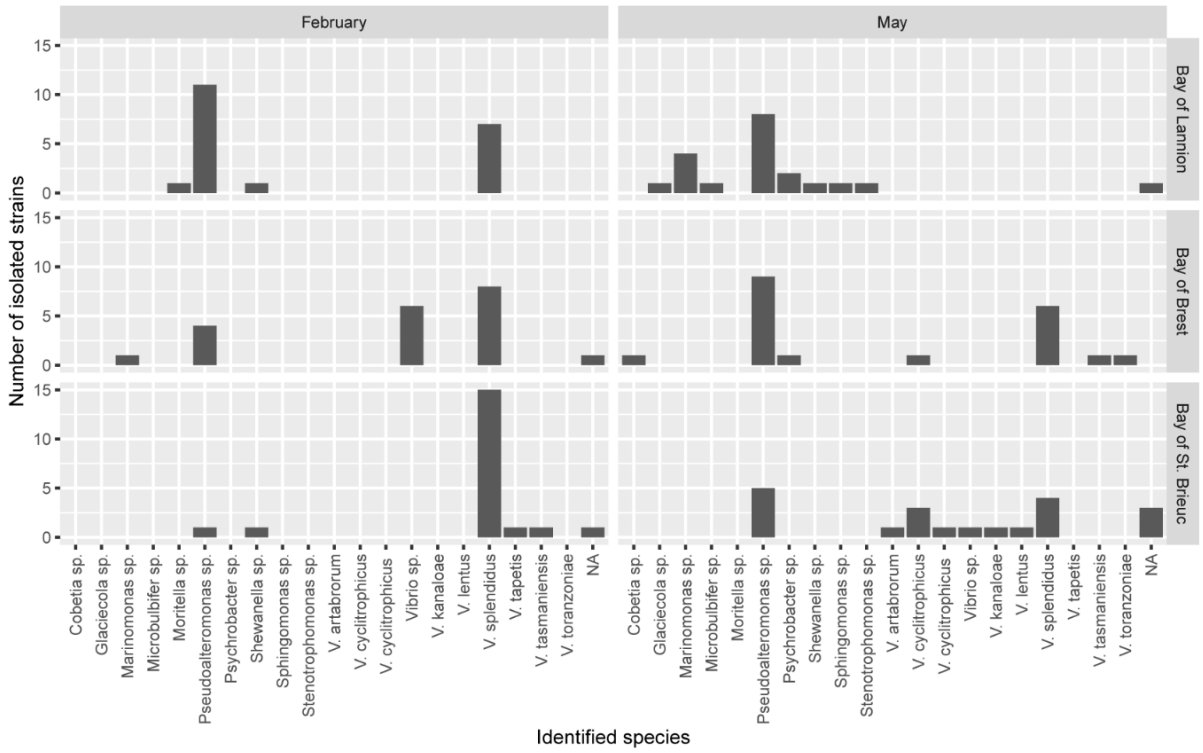


Figure 40: Bacterial profiles in samples from the 3 bays (Lannion, Brest, St. Brieuc) collected in February and May 2017.

Presence or absence of known pathogens of bivalve molluscs

Among the four pools of DNA extracts from tissues of each of the nine batches we investigated presence of 10 known pathogens, *Bonamia* spp., *Haplosporidium nelsoni*, *Marteilia* sp., *Mikrocytos mackini*, *Nocardia crassostreae*, OsHV-1, *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. harveyi*, and *V. splendidus* belonging to Splendidus cluster. *V. splendidus* was detected in all the batches from each site, while *Marteilia* sp. was recorded in all batches from Brest (from February to September), which confirmed the histological results. All the other TaqMan® real-time PCR results were negative.

5. Chemical analyses of flesh

Table 6 shows trace element concentrations in the mussel tissues and the maximum level (ML) set by the Commission Regulation ((EC) No. 1881/2006 amended by (EC) No. 629/2008 and (EC) No. 420/2011) for regulated chemical compounds in the relevant foodstuffs category of bivalve molluscs. Comparing the three sites in February, mussels from St. Brieuc had concentrations of chromium (Cr), molybdenum (Mo), nickel (Ni) and titanium (Ti) overall 2-4x higher than those of Brest and Lannion. The Lannion site was distinguished by iron (Fe) and aluminum (Al) concentrations that were more than 2x lower than the other two sites. In contrast, lead (Pb) concentration was highest in Brest, more than 5x higher than that of the mussels from Lannion and St. Brieuc, and exceeding the ML. Regarding temporal variation of chemical compounds in Brest mussels, Pb concentration was similar in February and April with a twofold decrease in September; Fe and Al concentrations showed noticeable decrease over time. The highest concentrations were found in winter and a general decrease was observed throughout the study period.

Table 6: Trace element concentrations (mg/kg w.w.) in mussel tissues collected from three bays in northern Brittany: Brest (BRE), Lannion (LAN) and St. Brieuc (STB), in February 2017, and in Brest in April and September 2017. Limit of detection: < 0.002 mg/kg). *ML: Maximum Level set by the Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 amended by (EC) No. 629/2008 and (EC) No. 420/2011.*

	February			April	September
Chemical compounds	**STB**	**LAN**	**BRE**	**BRE**	**BRE**
Cd (ML: 1.0)	0.07	0.07	0.13	0.14	0.10
Hg (ML: 0.5)	0.01	0.02	0.04	0.03	0.02
Pb (ML: 1.5)	0.32	0.23	1.62	1.54	0.70
Co	0.15	0.09	0.21	0.12	0.07
Cu	1.42	1.35	1.43	1.36	1.59
Cr	3.80	1.49	0.99	0.54	0.09
Fe	175.98	62.28	157.48	85.65	34.10
Mn	3.15	1.79	2.69	1.81	1.22
Mo	0.84	0.37	0.23	1.32	0.14
Ni	2.31	1.00	0.65	0.49	0.12
Zn	13.7	15.84	15.85	18.73	12.32
Ti	5.90	1.57	1.91	0.95	0.38
Sn	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.19
Al	173.11	65.85	143.72	69.09	22.70
Se	1.28	1.48	1.39	1.04	0.85
As	3.16	3.99	3.15	6.42	3.41

DISCUSSION

An *in situ* study combining various analytical procedures was performed to explore causes of mussel mass mortality. The experimental design for field work involved assuming the culture procedures and using the mussel batches of the professional mussel farmers, taking advantage of their activity to avoid any element or circumstance different from the common practice that could distort the usual mussel performance through on-growing. This approach provided an accurate representation of what was occurring on the farms and was chosen as a first exploration assuming that more refined experimental designs eventually may be needed while taking advantage of the results of this first approach.

1. Temperature, conditioning and mortality

Mytilus edulis is known to resist extreme temperatures (Aarset, 1982; Seed & Suchanek, 1992; Almada-Villela *et al*., 1982), however, the thermal profiles observed in our sites were not extreme or unusual. The narrower temperature range observed in Lannion was probably due to the farming method because mussels on subsurface longlines are always submerged and undergo less marked temperature variation than mussels on intertidal stakes. Results showed that a 'mortality window' opened in all sites during the spring season; similar observations also have been reported recently in France by other researchers (Benabdelmouna *et al*., 2018; Dégremont *et al*., 2019). This period corresponded to the spawning season of mussels. Gonad development usually begins in October/November, and by the end of the winter the gonads are ripe (Gosling, 2003). All energy accumulated during the quiescent period is used to fuel gametogenesis and finally spawning; thus, when mussels spawn, they are in poor condition during the remainder of the spring period, with low glycogen content (Najdek & Sapunar, 1987). Mussel growth is primarily influenced by the reproductive stage and food availability (Gosling, 1992) but growth capacities also have been linked to site and animal origin (Dickie *et al.,* 1984). The higher C.I. of mussels from Lannion in May could be explained by (i) their better growth capacities due to their origin, (ii) the greater trophic richness of the site, and (iii) the subtidal farming –which allows them continuous access to trophic resources. Indeed, Prou and Goulletquer (2002) showed that mussels grown on longlines had higher growth performance than mussels grown on *bouchot*. However, this did not prevent mortality. Primary production, and thus food availability, are reduced during winter periods when seawater temperatures are below 10°C (Cloern, 1996) and mussels undergo long-time starvation periods (Harbach & Palm, 2018). *Mytilus* sp. can handle longer food restriction periods and maintain its shell size by using energy from its own tissue (Dare & Edwards, 1975; Riisgård *et al*., 2014). However, no link between C.I. of mussels and mortalities obtained in site was found.

These various data and observations clearly illustrate that this transition period between winter and spring –corresponding to the spawning period– is stressful for mussels and decisive in their survival. Thus, spawning stress could contribute to mussel weakening and to an increased mortality rate to some extent. However, considering the very similar C.I. observed between the different sites studied –between those with high mortality and those with low mortality– this parameter alone cannot explain abnormal mortality.

2. Mussel symbionts

Villalba *et al.* (1997) classified mussel symbionts in three groups according to their pathogenicity. Among those identified in this study, ciliates are in the first group with unnoticeable pathogenic effects, *Mytilicola* sp. are in the second group that may damage the host, but are not lethal, and *Marteilia* sp. and trematodes are in the third group with potentially lethal effects.

Figueras *et al.* (1991) observed that, even at the highest densities of infestation, ciliates caused no detectable tissue damage in gills or in digestive tubules. More recent detailed studies of the intracellular ciliates in digestive tubules reported similar conclusions (Fichi *et al*. 2018). Our results are consistent with those reports, no associated inflammation or abnormal mortality was detected in St. Brieuc, the site most affected by ciliates. Regarding *Mytilicola* sp., Brienne (1964) and Blateau (1989) observed weight loss in French mussels infested with this copepod at the end of winter and early spring (breeding period); the mortality it caused was related to the decrease in mollusc vitality. Nevertheless, in most cases, despite a high infestation intensity reported in English and Spanish mussels, it is evident that the host population can sustain the infestation indefinitely (Davey, 1989; Robledo *et al.,* 1994). Again, our results were consistent because the highest prevalence of this copepod was recorded in St. Brieuc and no abnormal mortalities were observed over the period at this site; the mortality peak observed in May could be attributed to weakness due to the breeding season, which could be intensified by the presence of *Mytilicola* sp. as observed by Brienne (1964) and Blateau (1989).

Lauckner (1983) found that digenetic Trematoda were the most frequent and important metazoan parasites of bivalves. Indeed, trematode sporocysts and metacercaria were capable of causing a wide range of harmful consequences in their hosts (lesions, compression of tissues, castration, and deep weakness) that can lead to death when infestation is heavy (Robledo *et al.,* 1994; Laruelle *et al.*, 2002). Bakhmet *et al.* (2017) found a metabolic level supported by significant growth deficiency in parasitized *M. edulis*. This also was observed in Normandy (France) by Le Breton & Lubet (1992), as well as a variation in parasitism over time as we observed in Brest, and an increase in mortality between January and July.

No significant statistical link was established for *Marteilia* sp., but the p-value close to 0.05 should be highlighted as it was entirely influenced by results from Brest. The presence of *Marteilia* sp. only in the most affected site should not be neglected, especially because it not only severely harms flat oysters, *Ostrea edulis*, but also *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (Villalba *et al.* 1993; Villalba *et al.* 1997; Fuentes *et al*., 1995; Arzul *et al*., 2014). Indeed, several studies have shown that high mortality rates observed in certain mussel populations in Spain and France were positively correlated with the presence of this parasite (Villalba *et al*., 1993; Garcia *et al.,* 2005). Marteiliosis leads to the arrest of growth due to the degradation of digestive cells, loss of glycogen in tissues and resulting in considerable weight loss of the mollusc (Grizel & Tigé, 1973). This disease could explain the lower C.I. in Brest. Marteiliosis also causes a general weakening of the host, promoting opportunistic parasite development (bacteria, ciliates) that could cause secondary infestations (Grizel, 1985). For Brest mussels, no significant changes were observed between the C.I. for weight calculated in February and those calculated in September. This is not typical because mussels should be fleshy at the end of summer and require accumulated energy reserves for gonadal development and winter survival. Previous studies in flat oysters showed that mortality due to *Marteilia* sp. was observed just after the breeding period during which the animal consumes a lot of energy. Marteiliosis also is known to cause hemocytic infiltration and occasionally granulocytomas, which cause the destruction of the pathogen but also of the host tissues (Villalba *et al*., 1993). These effects were observed in Brest. The drastic decrease in prevalence observed in Brest between May and September could be explained by death of infected mussels. Histological examination does not allow discriminating between the congeneric species *Marteilia refringens* and *M. pararefringens*; although both species have been detected in mussels, *M. pararefringens* is more frequently reported (Kerr *et al*. 2018). The infected samples analysed with the real time PCR procedure showed infection with *Marteilia* sp.

Each of the symbionts and parasites detected in the study have a varying degree of negative effect on their hosts. A single non-lethal parasite may cause some damage but not death, but the cumulative effect of different non-lethal parasites may have an impact on the survival of the host. This is particularly true during a harsh season and at a key stage in the life cycle of the mussel. It is clear from our data that *Marteilia* was one of the major factors contributing to mortalities in Brest.

3. Lesions and alteration: hemocytic infiltration, granulocytomas and neoplasia

Some cases of hemocytic infiltration (positively correlated with mortality) and granulocytomas were not linked to a specific pathogen. It should be noted that abnormal is the most frequent alteration and this is considered to be an important biomarker of lesion and inflammation in bivalves (Cuevas *et al.,* 2015). Cuevas *et al*. (2015) showed that mussels from

the most impacted sites (by metallurgic and shipyard activities) endured the most significant deleterious effects showing inflammation. Also, Sheir & Handy (2010) established a potential link between hemocytic infiltration and lesions with the presence of xenobiotics. Lowe & Moore (1979) stated that granulocytomas reflect symptoms of long-term exposure to contaminants; the same observation was made about a potential correlation between neoplasia and water pollution because neoplastic disorders have been reported in bivalves collected from polluted areas (Lauckner, 1983; ICES, 2017).

In our study, pollution alone cannot explain the presence of granulocytomas. In May, they were more frequent in Lannion, the site with the lowest concentrations of chemical compounds. In addition, the highest prevalence of granulocytomas in Brest were observed in April and September while in these two months, the records of trace elements showed lower concentrations, more specially for lead. Finally, the prevalence of granulocytomas recorded in St. Brieuc was close to that of the other two sites and hemocytic infiltration and neoplasia were not recorded, while the concentration of all trace elements, except for lead, was higher in this site than in the others. Villalba *et al.* (2001) reported association of cockle, *Cerastoderma edule,* mortality with lesions resulting from heavy inflammatory reaction without a clearly identified cause, and with disseminated neoplasia. We observed inflammations with heavy hemocytic infiltrations correlated with mortality in Brest and Lannion, but not always associated with a specific cause. Disseminated neoplasia is a progressive disease insofar as neoplastic cells proliferate and replace normal hemocytes in circulation and could lead to death (Elston *et al.*, 1988; Ciocan & Sunila, 2005). Because hemocytes are cells with a key role in many physiological functions (digestion, excretion, nutrition, defense mechanisms; Cheng, 1984; Fisher, 1986, 1988), heavily affected mussels have reduced abilities and usually die (ICES, 2017). Indeed, mussels affected by disseminated neoplasia had, after the decrease in the number of normal circulating hemocytes, a weakened defense system and showed reduced bacterial clearance (Kent *et al.,* 1989). Mass mortalities of various bivalve species have been associated with disseminated neoplasia (see reviews by Elston *et al*., 1992; Carballal *et al.*, 2015). In France, Benabdelmouna & Ledu (2016) observed that genomic abnormalities, namely aneuploidy of the hemolymph cells, were significantly correlated with *Mytilus* sp. mortalities observed in 2015 in the French Atlantic coast. Furthermore, Benabdelmouna *et al.* (2018) linked the occurrence of a significant percentage of aneuploid hemolymph cells to disseminated neoplasia and concluded that this disease could be viewed as a major cause of morbidity and mortality for French mussels. Elston *et al.* (1988) followed the evolution of this disease over 4 months in *M. trossulus*; they reported a relatively long dynamic progression of the disease in the early stages (2-3 months) and then a quick evolution when disseminated neoplasia leads to rapid death. This is consistent with the mortality dynamics observed in our study and the absence, or possibly undetected early-stage cases of disseminated neoplasia

in February. A relatively high prevalence of 18% was observed in Brest in April and therefore most certainly contributed to a percentage of mortality during this period and/or may also have been an aggravating factor with an already present pathology; but abnormal mortalities began in February with no sign of disseminated neoplasia being observed at that time. Lannion presents a similar pattern; in May few cases were found with a prevalence of 2.4% but no signs in February. We hypothesize that if histological observations on Lannion mussels had been made in April, a higher rate of neoplastic mussels would have been observed and may have played a role in the observed mortality percentage.

We showed that inflammation and hemocytic infiltration were correlated with mortality, but it was not always possible to link them to an identified cause. In Brest, pollution could have a role (see below) but for Lannion, the cause(s) remain unknown.

4. Chemical contamination

First, and in relation to what has been previously discussed, when food availability is low and competition between individuals is high, mussels increase their levels of water uptake through their gills. This leads to congestion and accumulation of useless substances in their tissues, including pollutants, which could result in increase of mortality rates (Dailianis, 2010). It is known that anthropogenic compounds and heavy metals play roles in defence capacities of bivalve molluscs and could increase susceptibility to disease (Coles *et al.,* 1995; Pipe & Coles, 1995; Morley, 2010). In addition, the effects of environmental contaminants sometimes correspond to a direct toxic action on tissues or cells (Gagnaire *et al.,* 2004).

Some of the elements analyzed, Hg, As, Cd, Pb and Sn, have no known biological function and, except for Sn, are included in the list of the ten chemicals of major public health concern as part of International Programme on Chemical Safety (World Health Organisation, 2010). These elements are natural trace components of the aquatic environment, but their levels increase due to agricultural, industrial and mining activities. Even low metal concentrations may threaten the health of aquatic and terrestrial organisms, humans included (Sarmiento *et al*., 2011). Among all the metallic elements that Moschino *et al.,* (2016) have measured in mussel tissues (As, Cd, Cr, Pb, Al, Fe, Hg, Cu, Ni, Zn) during an *in situ* study over several years, a positive correlation between mussel mortality rate and Pb, Fe and Al was observed. Furthermore, the average concentrations they measured in the mussel tissues for these three elements were comparable with ours. It should also be noted that for Fe and Al, relatively similar high concentrations were found in St. Brieuc and Brest, while for lead, only mussels from Brest were above the threshold. Several biomarkers representative of the health status of the aquatic environment have been identified in mussels (Depledge, 1994; Dailianis, 2010), and it was shown that mussels have lower defense mechanisms against metal oxidative challenge and toxicity than oysters. Indeed, Funes *et al*. (2006) have shown that activities of

antioxidant enzymes are insufficient (compared to those observed in the Pacific oyster, *C. gigas*), which means that mussels are not sufficiently protected from the oxidative stress associated with metal pollution. In addition, Viarengo *et al.* (1991) and Petrović *et al.,* (2004) observed seasonal variations in antioxidant responses related to physiological processes and showed inhibition of these defense mechanisms in winter related to the reproductive period and gonad resorption.

From the Chemical Contamination Observation Network of Ifremer (ROCCH), the Bay of Brest is known to be one of the sites most affected by lead contamination on the French coast for many decades (the first most contaminated on the west side of France) (Belin *et al*., 2013). According to these authors and local authorities (*com. pers*.), the high Pb concentrations found in Brest mussels are mainly explained by the presence of silver lead mines around the Aulne river (surface area: 1842 km²) several kilometers upstream (at Poullaouën and Huelgoat, Finistère, France). The river provides more than 63% of the bay's freshwater supply (Auffret, 1983).

Lacroix *et al.* (2015) observed differences in physiological responses to contaminants between native Brest Bay and imported mussels. Non-natives were more sensitive and showed more sensitive biomarker responses. Therefore, it can be supposed that mussels caught in a more open and less contaminated marine area will be strongly impacted and stressed when they arrive in a more polluted area. Lacroix *et al.* (2017) also observed an altered physiological state, early spawning, in mussels in a polluted area (Bay of Brest) compared to those on the Atlantic coast of Brittany (under oceanic influence) suggesting that their health is compromised at this period. Therefore, the pollution in Brest is an additional deleterious factor to others previously discussed and could be an explanation for the heavy hemocytic infiltrations not found to be linked to a specific pathogen. However, this is probably not the case for Lannion, an unpolluted site.

5. Bacterial profiles

Species belonging to the genus *Pseudoalteromonas* are widely distributed in marine environments globally. Some studies have shown a positive role of *Pseudoalteromonas* sp. biofilms in the settlement of mussel, *Mytilus coruscus* larvae (Yang *et al.,* 2013; Li *et al*., 2014). On the other hand, Venkateswaran & Dohmoto (2000) identified a species of *Pseudoalteromonas* which play a natural antifouling role due to the products it excretes, which prevent fixation of mussel byssal threads. However, no pathogenic or lethal role has been demonstrated by this species on bivalves. Species of the genus *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* are part of the normal microflora of temperate water marine animals and their proportion increases during the spoilage of the bivalves (Gram & Huss, 1996; Madigan *et al*., 2014). Also,

Lokmer & Wegner (2015) showed that host-associated microbial communities are linked to abiotic and biotic factors.

The genus *Vibrio* includes a ubiquitous, diverse and abundant temperate coastal marine bacterial community (Thompson *et al*., 2004). The species of the genus *Vibrio* show a very high diversity; more than 110 species have been identified, each with different relationships with their hosts, ranging from symbiosis to significant pathogenicity (Travers *et al.,* 2015). Among those that appear to be pathogenic to bivalves, species belonging to the Splendidus clade are systematically highlighted. For example, Béchemin *et al.* (2015) identified *V. splendidus*-related species in moribund mussels during mussel mass mortality outbreaks in summer 2014 in France; these isolates appeared to be capable of inducing mortality under laboratory conditions. Also, Ben Cheikh *et al.* (2016, 2017) observed that a pathogenic strain of *Vibrio splendidus* clade inhibits the immune response in *M. edulis* by altering hemocyte function and viability and causes hemocytic infiltration and granulocytomas. The high genotype diversity of the bacteria belonging to the Splendidus clade and the dynamic nature of microbial communities complicates considerably efforts to elucidate the role of *V. splendidus* clade bacteria in vibriosis (Kwan & Bolch, 2015). In addition, *Vibrio* studies are culture dependent and specialists themselves admit that they do not know if the dynamics they observed in bacteria populations reflect physiological changes in a viable but non-cultivable state or fluctuations in density with environmental parameters (Thompson *et al*., 2004). Knowledge of their role as animal pathogens and their mechanisms of action in pathogenesis has been limited. Indeed, Bruto *et al*. (2018) recently showed that, within the Splendidus clade, virulence represents an ancestral trait, but it has been lost from several populations. They identified two *loci* necessary for virulence and can now associate virulence in bivalves with one or many specific *V. splendidus* strains. Thus, simply finding some *V. splendidus* strains in mussels is no longer sufficient to incriminate them during a mortality episode. Accordingly, since *V. splendidus* was found in all sites, no matter the mortality rate, assessing whether these two virulence genes are present or not in our isolates would be highly interesting.

To explain abnormal mortalities, to identify a ‘biotic disease’ with one identifiable lethal pathogen (virus, bacteria or parasite) is desired, but there is evidence that surrounding conditions (abiotic factors like pollution, temperature and seasons), as well as the presence of multiple pathogens and parasites affecting the condition of animals are inseparable and cannot be considered individually. Because many factors could be involved, it is complicated to understand precisely mortality factors that have very high inter-site and inter-annual variability. Some factors can lead to gradual changes that progressively disrupt animal homeostasis while others can cause acute mortality. Dare (1976) concluded that mortality in mussel populations resulted from an interaction between several physical and biological factors. Similarly, Lokmer & Wegener (2015) argued that, in addition to the presence of pathogens, environmental factors

have a strong impact on disease efficacy and mortality. In addition, it seems that genetics could also have an impact on mortality (Dickie *et al*., 1984; Mallet *et al.,* 1987; Dégremont *et al*., 2019).

Our experimental design, using different mussel stocks corresponding to different geographic sources in the different experimental sites, did not allow evaluating the influence of the genetic background on the mussel mortality, that is to say if mussel stocks from different geographic sources would show different susceptibility to mortality outbreaks. Mussels on the French Atlantic coast have complex genetic structure (Bierne *et al.,* 2003; Fly *et al*., 2015; Michalek *et al.,* 2016, Simon *et al*, 2019).

Obviously, the possibility of missing an unknown and yet undetectable or uncultivable pathogen should not be excluded. Furthermore, a complex 'pathosystem' between two or more pathogens, as shown by De Lorgeril *et al.* (2018), may also exist and would require an integrative and holistic approach to be understood as recommended by these authors in the case of multi-factorial diseases.

CONCLUSION

This multi-parametric field study, carried out on commercially cultivated mussels, was a first approach to identifying potential causes of mortality in northern Brittany. We completed a first sorting and identified important factors for future experimental studies. In Brest, the presence of *Marteilia*, inflammatory lesions and pollution, with additional weakening factors such as the breeding period, explains part of the mortalities. In Lannion, no relevant parasites or pollution were found, although heavy inflammatory lesions were observed; thus, further research is required to explain those hemocytic infiltrations and to determine the cause(s) of the mortality observed in this site.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Yann Deydier (CRCBN) for technical support in the collection of mussels, María J. Brianes, María I. Meléndez and Elena Penas for their technical assistance with histology (CIMA), and Patrick Céron for design of the map. Many thanks to Annette Byrne for the proofreading of English and Dr. Drego for the finishing touches.

The Regional Shellfish Committee of North Brittany (CRCBN) and the laboratory LABÉO financially supported this study. Maud Charles received co-funding from the Normandy region and from the laboratory LABÉO Frank Duncombe.

REFERENCES

Aarset, A. V. (1982). Freezing tolerance in intertidal invertebrates (a review). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *73*(4), 571–580. https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90264-X

Allain, G., & Bernard, I. (2016). *Les mortalités de moules en 2014 et 2015 vues par les professionnels. Compte-rendu de la phase 1 : synthèse sur l'émergence, la propagation et l'installation des mortalités* [Technical Report]. Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne nord. 28 pp.

Almada-Villela, P. C., Davenport, J., & Gruffydd, L. D. (1982). The effects of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *59*(2–3), 275–288. https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90121-6

Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., Robert, M., Joly, J. P., Garcia, C., & Bouchoucha, M. (2014). Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*, *141*(02), 227–240. https://doi.org/10.1017/S0031182013001418

Auffret, G. A. (1983). *Dynamique sédimentaire de la Marge Continentale Celtique* [PhD Thesis]. Université de Bordeaux I. 391 pp. Retrieved from https://archimer.ifremer.fr/doc/00034/14524/

Bakhmet, I., Nikolaev, K., & Levakin, I. (2017). Effect of infection with Metacercariae of *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae) on cardiac activity and growth rate in blue mussels (*Mytilus edulis*) *in situ*. *Journal of Sea Research*, *123*, 51–54. https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.03.012

Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2010). Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, *2*(1), 34–43. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x

Béchemin, C., Soletchnik, P., Polsenaere, P., Le Moine, O., Pernet, F., Protat, M., Fuhrman, M., Quéré, C., Goulitquer, S., Corporeau, C., Lapègue, S., Travers, M.-A., Morga, B., Garrigues, M., Garcia, C., Haffner, P., Dubreuil, C., Faury, N., Baillon, L., Baud, J.-P., & Renault, T. (2015). Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais. *Bulletin épidémiologique - Santé animale et alimentaion*, (67), 6–9.

Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D., & Le Foll, F. (2016). First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Developmental & Comparative Immunology*, *57*, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.014

Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., & Le Foll, F. (2017). Infection dynamics of a V. *splendidus* strain pathogenic to *Mytilus edulis*: *In vivo* and *in vitro* interactions with hemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, *70*, 515–523. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.047

Benabdelmouna, A., & Ledu, C. (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*, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001

Benabdelmouna, A., Garcia, C., Ledu, C., Lamy, P., Maurouard, E., & Dégremont, L. (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

Bernard, I., & Allain, G. (2017). *Mortalités des moules en Bretagne nord : bilan des connaissances* [Technical Report]. Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne nord. 37 pp.

Bernard, I., Charles, M., Allain, G., Burioli, E. A. V., Villalba, A., Le Foll, F., Deydier, Y., Houssin, M. (2018). *Bilan de l'observatoire des mortalités de moules en Bretagne Nord pour la saison 2016-*

2017 et premiers éléments sur les organismes pathogènes présents [Technical Report]. Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne nord. 26 pp.

Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F., David, P. (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology, 12*, 447–461. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x

Blateau, D. (1989). Expériences de traitement des moules (*M. edulis*) de bouchots de la baie du Mont Saint-Michel parasitées par *Mytilicola intestinalis* - Septembre 1987 et 1988 [Technical Report]. 20 pp. Retrieved from Ifremer website: https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1943/

Borthagaray, A. I., & Carranza, A. (2007). Mussels as ecosystem engineers: Their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecologica*, *31*(3), 243–250. https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.10.008

Brienne, H. (1964). Observations sur l'infestation des moules du pertuis breton par Mytilicola intestinalis Steuer. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 28*(3), 205–230. Retrieved from Ifremer website: https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4029/

Bruto, M., Labreuche, Y., James, A., Piel, D., Chenivesse, S., Petton, B., Polz, M., & Le Roux, F. (2018). Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *The ISME Journal*, *12*(12), 2954–2966. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3

Burioli, E. A. V., Charles, M., Bernard, I., Pitel, P. H., & Houssin, M. (2017). *First description of disseminated neoplasia in Mytilus edulis in northern Brittany (France) and development of a rapide diagnostic tool* [Scientific Poster]. Presented at the 2nd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR), Sète, France. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10832.20488

Burioli, E. A. V., Varello, K., Lavazza, A., Bozzetta, E., Prearo, M., & Houssin, M. (2018). A novel divergent group of Ostreid herpesvirus 1 µVar variants associated with a mortality event in Pacific oyster spat in Normandy (France) in 2016. *Journal of Fish Diseases*, *00*, 1–11. https://doi.org/10.1111/jfd.12883

Buschbaum, C., Dittmann, S., Hong, J.-S., Hwang, I.-S., Strasser, M., Thiel, M., Valdivia, N., Yoon, S.-P., & Reise, K. (2008). Mytilid mussels: global habitat engineers in coastal sediments. *Helgoland Marine Research*, *63*(1), 47–58. https://doi.org/10.1007/s10152-008-0139-2

Carballal, M. J., Barber, B. J., Iglesias, D., & Villalba, A. (2015). Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 83–106. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.004

Carrasco, N., Roozenburg, I., Voorbergen-Laarman, M., Itoh, N., & Engelsma, M. Y. (2013). Development of a real-time PCR for detection of the oyster pathogen *Nocardia crassostreae* based on its homogeneous 16S–23S rRNA intergenic spacer region. *Journal of Invertebrate Pathology*, *114*(2), 120–127. https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.07.002

Carrasco, N., Ford, S., & Anderson, R. (2015). Pathogens and disease processes in marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 1-256. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.09.005

Cheng, T. C. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. *In*: Cheng, T. C. (Ed.) *Invertebrate Blood. Comparative Pathobiology*, *Vol. 6*, 111-146. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4766-8_5

Ciocan, C., & Sunila, I. (2005). Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania. *Marine Pollution Bulletin*, *50*(11), 1335–1339. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.042

Cloern, J. E. (1996). Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics*, *34*(2), 127–168. https://doi.org/10.1029/96RG00986

CNC, 2016. *La production française* [Online Access]. http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx

Coles, J. A., Farley, S. R., & Pipe, R. K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms*, *22*, 59–65. https://doi.org/10.3354/dao022059

Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 [Online Access]. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN

Commission Regulation (EC) No. 629/2008 [Online Access]. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0629&qid=1548169909864&from=FR

Commission Regulation (EC) No. 420/2011 [Online Access]. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0420&from=EN

Council Directive 95/70/EC [Online Access]. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31995L0070&qid=1548169109196&from=FR

Council Directive 2006/88/CE [Online Access]. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0088&from=FR

Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic Toxicology*, *162*, 152–164. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011

Dailianis, S. (2010). Environmental impact of anthropogenic activities: The use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. *In*: MacGevin, L. E. (Ed.) *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact, Chap. 2*, 43-72. Nova Science Publishers Inc, New York.

Dare, P. J., & Edwards, D. B. (1975). Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy Estuary, North Wales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *18*(2), 89–97. https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90066-0

Dare, P. J. (Ed.) (1976). *Settlement, growth and production of the mussel, Mytilus edulis L., in Morecambe Bay, England,* 1-25. Her Majesty's Stationery Office, London.

Davenport, J., & Chen, X. (1987). A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Molluscan Studies*, *53*(3), 293–297. https://doi.org/10.1093/mollus/53.3.293

Davey, J. T. (1989). *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Cyclopoida): A ten year survey of infested mussels in a Cornish Estuary, 1978–1988. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *69*(04), 823–836. https://doi.org/10.1017/S0025315400032197

De Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M., Pérignon, A., Régler, D., Lorga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzon, D., Gueguen, Y., & Mitta, G. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3

Dégremont, L., Maurouard, E., Rabiller, M., Glize, P. (2019). Response to selection for increasing resistance to the spring mortality outbreaks in *Mytilus edulis* occurring in France since 2014. *Aquaculture, 511*. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734269

Dickie, L.M., Boudreau, P.R., Freeman, K.R. (1984). Influences of Stock and Site on Growth and Mortality in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41*, 134–140.

https://doi.org/10.1139/f84-013

Depledge, M. H., & Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, *3*(3), 161–172. https://doi.org/10.1007/BF00117081

Eggermont, M., Bossier, P., Pande, G. S. J., Delahaut, V., Rayhan, A. M., Gupta, N., Islam, S. S., Yumo, E., Nevejan, N., Sorgeloos, P., Gomez-Gil, B., & Defoirdt, T. (2017). Isolation of Vibrionaceae from wild blue mussel (*Mytilus edulis*) adults and their impact on blue mussel larviculture. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(4), 11. https://doi.org/10.1093/femsec/fix039

Elston, R. A., Kent, M. I., & Drum, A. S. (1988). Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *4*, 135–142. https://doi.org/10.3354/dao004135

Elston, R. A., Moore, J. D., & Brooks, K. (1992). Disseminated neoplasia of bivalve mollusc. *Reviews in Aquatic Science, 6,* 405–466.

FAO, 2016. Demand for European mussels within the EU on the decline. *In*: *GLOBEFISH - Information and analysis on world fish trade* [Online Access]. http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/450826/

FAO, 2018. Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series. *In*: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [Online Access]. http://www.fao.org/fishery/

Fichi, G., Carboni, S., Bron, J. E., Ireland, J., Leaver, M. J., & Paladini, G. (2018). Characterisation of the intracellular protozoan MPX in Scottish mussels, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758. *Journal of Invertebrate Pathology*, *153*, 99–108. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.022

Figueras, A. J., Jardon, C. F., & Caldas, J. R. (1991). Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, *99*(1–2), 17–33. https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90285-F

Fisher, W. S. (1986). Structure and Functions of Oyster Hemocytes. *In*: Bréhelin, M. (Ed.) *Immunity in Invertebrates, Chap. 3,* 25-35. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Fisher, W. S. (1988). Environmental influence on host response: Environmental influence on bivalve hemocyte function. *American Fisheries Society Special Publication, 18*, 225-237.

Fly, E.K., Hilbish, T.J., Wethey, D.S., Rognstad, R.L. (2015). Physiology and biogeography: The response of European mussels (*Mytilus* spp.) to climate change. *American Malacological Bulletin, 33*, 136–149. https://doi.org/10.4003/006.033.0111

François, C., Garcia, C., Lupo, C., Travers, M.A., Morga, B., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Serpin, D., Dubreuil, C., Chollet, B., Baillon, L., Lapegue, S., Renault, T. (2015). *Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins* (p. 60) [Technical Report].

Fuentes, J., Villalba, A., Zapata, C., & Alvarez, G. (1995). Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, *21*, 221–226. https://doi.org/10.3354/dao021221

Funes, V., Alhama, J., Navas, J. I., López-Barea, J., & Peinado, J. (2006). Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, *139*(2), 214–223. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.016

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2004). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, *16*(4), 501–512. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007

Garcia, C., Arzul, I., Chollet, B., Francois, C., Goubet, A., Joly, J.-P., Miossec, L., Robert, M., Cuvelier, N., Lefebvre, A., Le Gagneur, E., Ropert, M., Mouillard, G., Gerla, D., Le Gal, D., Rocher, G., Langlade, A., Bedier, E., Nourry, M., Martin, J.-L., Constantini, L., Masson, J.-C., & Martin, A.-G. (2005). *Bilan 2004 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques marins* (p. 68) [Technical Report]. Retrieved from Ifremer website: https://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19702/

González-Tizón, A., Martínez-Lage, A., Ausio, J., & Méndez, J. (2000). Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. *Genome*, *43*(2), 409–411. https://doi.org/10.1139/g99-138

Gosling, E. (Ed.) (1992). *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 25*, 590 pp. Elsevier Science, Amsterdam.

Gosling, E. (Ed.) (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture,* 454 pp. Fishing News Books, Oxford.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 121–137. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8

Grizel, H., & Tigé, G. (1973). *La maladie de la glande digestive d'Ostrea edulis Linne. Actes CIEM, CM 1973/K:13* [Symposium Deed]. Presented at the « Comité des crustacés, coquillages et benthos ». Retrieved from https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5929/

Grizel, H. (1985). *Etude des récentes epizooties de l'huître plate Ostrea edulis Linne et de leur impact sur l'ostreiculture bretonne* [PhD Thesis]. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Retrieved from https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2581/

Guichard, B., François, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Saulnier, D., Pépin, J.-F., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Chollet, B., Faury, N., Haffner, P., Robert, M., Renault, T. (2011). *Bilan 2010 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins* (p. 22) [Technical Report]. Retrieved from Ifremer website: https://archimer.ifremer.fr/doc/00059/17050/14599.pdf

Harbach, H., & Palm, H. W. (2018). Development of general condition and flesh water content of long-time starved *Mytilus edulis*-like under experimental conditions. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation Bioflux*, *11*(2), 8.

Howard, D. W., Lewis, E. J., Keller, B. J., & Smith, C. S. (2004). *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans, 2nd edition,* 5218 pp. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum National Ocean Service National Center for Coastal Ocean Science, 5, Oxford.

ICES, 2017. Originals by Alderman, D. J., Green, M. (*No. 11*) and Balouet, G. (*No. 12*) Revised by Tristan Renault and Susan Ford. 2017. *Disseminated neoplasms in bivalves*. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish, *No. 67*, 6 pp. http://doi.org/10.17895/ices.pub.2098

Kent, M. L., Elston, R. A., Wilkinson, M. T., & Drum, A. S. (1989). Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hemic neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*, *53*(3), 378–386. https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90103-1

Kerr, R., Ward, G. M., Stentiford, G. D., Alfjorden, A., Mortensen, S., Bignell, J. P., Feist, S. W., Villalba, A., Carballal, M. J., Cao, A., Arzul, I., Ryder, D., & Bass, D. (2018). *Marteilia refringens* and *Marteilia pararefringens* sp. nov. are distinct parasites of bivalves and have different European distributions. *Parasitology*, *145*(11), 1483–1492. https://doi.org/10.1017/S003118201800063X

Kinne, O. (Ed.) (1980). *Diseases of marine animals. Vol. 1: General Aspects, Protozoa to Gastropoda*, 466 pp. John Wiley & Sons, Brisbane.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Kwan, T., & Bolch, C. (2015). Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, *116*(1), 37–46. https://doi.org/10.3354/dao02905

Lacroix, C., Richard, G., Seguineau, C., Guyomarch, J., Moraga, D., & Auffret, M. (2015). Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus* spp.) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbor (France). *Aquatic Toxicology*, *162*, 126–137. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.008

Lacroix, C., Duvieilbourg, E., Guillou, N., Guyomarch, J., Bassoulet, C., Moraga, D., & Auffret, M. (2017). Seasonal monitoring of blue mussel (*Mytilus* spp.) populations in a harbor area: A focus on responses to environmental factors and chronic contamination. *Marine Environmental Research*, *129*, 24–35. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.008

Landsberg, J. H. (1996). Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *Journal of Shellfish Research*, *15*(2), 203–230.

Laruelle, F., Molloy, D. P., & Roitman, V. A. (2002). Histological analysis of trematodes in *Dreissena polymorpha*: their location, pathogenicity, and distinguishing morphological characteristics. *Journal of Parasitology*, *88*(5), 856–863. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0856:HAOTID]2.0.CO;2

Lauckner, G. (1983). Diseases of Mollusca: Bivalvia. *In:* Kinne, O. (Ed.) *Diseases of Marine Animals*, *Vol. 2: Introduction, Bivalvia to Scaphopoda*, 477-961. John Wiley & Sons, Brisbane.

Le Breton, J., & Lubet, P. (1992). *Resultats d'une intervention sur une parasitose a Proctoeces maculatus (Trematoda, Digenea) affectant la mytiliculture de l'ouest Cotentin* [Technical Report] *14*, 107–118. Retrieved from https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/922/

Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., & Le Roux, F. (2015). Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME Journal*, *9*(7), 1523–1531. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233

Li, Y.-F., Guo, X.-P., Yang, J.-L., Liang, X., Bao, W.-Y., Shen, P.-J., Shi, Z.-Y., & Li, J.-L. (2014). Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture*, *433*, 434–441. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.031

Lokmer, A., & Wegner, K. M. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*, *9*(3), 670–682. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160

Lowe, D. M., & Moore, M. N. (1979). The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Marine Pollution Bulletin*, *10*(5), 137–141. https://doi.org/10.1016/0025-326X(79)90081-X

Lupo, C., Amigo, A.O., Fleury, E., Robert, S., Garcia, C., Baillon, L., Béchemin, C., Canier, L., Chollet, B., Déchamps, L., Dubreuil, C., Faury, N., François, C., Godfrin, Y., Lapègue, S., Morga, B., Travers, M.-A., Tourbiez, D., Masson, J.-C., Vérin, F., Cordier, R., Gangnery, A., Louis, W., Mary, C., Pénot, J., Chevé, J., Dagault, F., Jolivet, A.L., Le, D., Lebrun, L., Bellec, G., Bouget, J.-F., Cochennec-Laureau, N., Palvadeau, H., Grizon, J., Chabirand, J.-M., Pépin, J.-F., D'Amico, F., Maurer, D., Orsoni, V., Bouchoucha, M., Roy, V.L., Pouvreau, S., Queau, I., Lamoureux, A. (2016). *Bilan 2015 du dispositif national de surveillance de la santé des mollusques marins* (p. 126) [Technical Report].

Madigan, T. L., Bott, N. J., Torok, V. A., Percy, N. J., Carragher, J. F., De Barros Lopes, M. A., & Kiermeier, A. (2014). A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Food Microbiology*, *38*, 219–227. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.005

Mallet, A.L., Carver, C.E.A., Coffen, S.S., Freeman, K.R. (1987). Mortality Variations in Natural Populations of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44*, 1589–1594. https://doi.org/10.1139/f87-192

Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J. P., & Houssin, M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*, *170*(1–2), 86–89. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.003

Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal Transmission of Clonal Cancer Cells Causes Leukemia in Soft-Shell Clams. *Cell*, *161*(2), 255–263. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042

Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., Muttray, A. F., Baldwin, S. A., & Goff, S. P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, *534*(7609), 705–709. https://doi.org/10.1038/nature18599

Michalek, K., Ventura, A., Sanders, T. (2016). *Mytilus* hybridisation and impact on aquaculture: A minireview. *Marine Genomics, Cells to Shells: The genomics of mollusc exoskeletons, 27*, 3–7. https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.008

Moore, J. D., Elston, R. A., Drum, A. S., & Wilkinson, M. T. (1991). Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *58*(2), 231–243. https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90067-Z

Morley, N. J. (2010). Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquatic Toxicology*, *96*(1), 27–36. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.017

Moschino, V., Del Negro, P., De Vittor, C., & Da Ros, L. (2016). Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): A five-year study using transplanted mussels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *128*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.006

Najdek, M., & Sapunar, J. (1987). Total and methyl-mercury content in bivalves, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck and *Ostrea edulis* Linnaeus: Relationship of biochemical composition and body size. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *39*(1), 56–62. https://doi.org/10.1007/BF01691789

Nasfi, H., Travers, M. A., de Lorgeril, J., Habib, C., Sannie, T., Sorieul, L., Gerard, J., Avarre, J.-C., Haffner, P., Tourbiez, D., Renault, T., Furones, D., Roque, A., Pruzzo, C., Cheslett, D., Gdoura, R., & Vallaeys, T. (2015). A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(3), 461–475. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1800-y

Oden, E., Burioli, E. A. V., Trancart, S., Pitel, P. H., & Houssin, M. (2016). Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus* sp. during mortality events. *Aquaculture*, *464*, 420–427. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.024

Oden, E., Trancart, S., Pitel, P. H., & Houssin, M. (2018). Development of a Taqman® Real-Time PCR for the rapid discrimination of the *Vibrio splendidus* species among the *Splendidus* clade. *Aquaculture*, *491*, 101–104. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.018

Oppenheimer, C. H. and ZoBell, C. E. (1952). The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res*., *11*, 10-18

Peters, E.C. (1988). Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*, *18*, 74–92.

Petrović, S., Semenčić, L., Ozretić, B., & Ozretić, M. (2004). Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia).

Marine Pollution Bulletin, *49*(9–10), 713–720. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.05.004

Pipe, R. K., & Coles, J. A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, *5*(8), 581–595. https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80043-3

Polsenaere, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Gohin, F., Robert, S., Pépin, J.-F., Stanisière, J.-Y., Dumas, F., Béchemin, C., & Goulletquer, P. (2017). Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *Journal of Sea Research*, *123*, 39–50. https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.03.005

Prou, J.M., Goulletquer, P. (2002). The French Mussel Industry: Present Status and Perspectives. *Bull. Aquac. Assoc. Can. 103*, 17–23.

Riisgård, H. U., Larsen, P. S., & Pleissner, D. (2014). Allometric equations for maximum filtration rate in blue mussels *Mytilus edulis* and importance of condition index. *Helgoland Marine Research*, *68*(1), 193–198. https://doi.org/10.1007/s10152-013-0377-9

Robledo, J. A. F., Caceres-Martinez, J., & Figueras, A. (1994). *Mytilicola intestinalis* and *Proctoeces maculatus* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *14*(3), 89–91.

Sarmiento, A. M., DelValls, A., Nieto, J. M., Salamanca, M. J., & Caraballo, M. A. (2011). Toxicity and potential risk assessment of a river polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *Science of The Total Environment*, *409*(22), 4763–4771. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.043

Saulnier, D., De Decker, S., & Haffner, P. (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*, *77*(2), 191–197. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.021

Seed, R., & Suchanek, T. H. (1992). Population and community ecology of *Mytilus*. *In*: Gosling, E. (Ed.) *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, *Chap. 4*. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture,* 87–169. Elsevier Science, Amsterdam.

Sheir, S. K., & Handy, R. D. (2010). Tissue Injury and Cellular Immune Responses to Cadmium Chloride Exposure in the Common Mussel *Mytilus edulis*: Modulation by Lipopolysaccharide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *59*(4), 602–613. https://doi.org/10.1007/s00244-010-9502-9

Simon, A., Bierne, N., Welch, J. J. (2018). Coadapted genomes and selection on hybrids: Fisher's geometric model explains a variety of empirical patterns. *Evolution Letters, 2*(5): 472-498. https://doi.org/10.1002/evl3.66.

Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Prearo, M., Pastorino, P., Serracca, L., Ercolini, C., & Abete, M. C. (2016). Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution*, *215*, 77–83. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.096

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., & Polz, M. F. (2004). Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(7), 4103–4110. https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4103-4110.2004

Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 11–31.

https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010

Venkateswaran, K., & Dohmoto, N. (2000). *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(2), 565–574. https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-565

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., & Livingstone, D. R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *100*(1–2), 187–190. https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90151-I

Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J., & Azevedo, C. (1993). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms*, *16*, 61–72. https://doi.org/10.3354/dao016061

Villalba, A., Mourelle, S., Carballal, M., & López, C. (1997). Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, *31*, 127–139. https://doi.org/10.3354/dao031127

Villalba, A., Carballal, M., & López, C. (2001). Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, *46*, 213–216. https://doi.org/10.3354/dao046213

World Health Organization, 2010. Ten chemicals of major public health concern. *In*: *Health impacts of chemicals*. *In*: *International Programme on Chemical Safety* [Online Access]. https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/

Yang, J.-L., Shen, P.-J., Liang, X., Li, Y.-F., Bao, W.-Y., & Li, J.-L. (2013). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, *29*(3), 247–259. https://doi.org/10.1080/08927014.2013.764412

Župan, I., & Šarić, T. (2014). Growth and condition index - two important factors in mussel farming. *MESO*, *16*(3), 275–278.

2. Résultats supplémentaires du suivi des moules de Bretagne Nord

a. Mortalités et données biométriques

Les taux de mortalité cumulée au moment de l'échantillonnage et à la fin du suivi (octobre 2017), ainsi que les données de biométrie de chacun des lots supplémentaires étudiés dans ce suivi, mais non valorisé dans l'Article 1, sont indiqués dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Mortalité cumulée par lots supplémentaires à la date de l'échantillonnage et à la fin du suivi (octobre 2017) et moyennes des données biométriques.

Lot	Mortalité cumulée au moment de l'échantillonnage	Mortalité cumulée à la fin du suivi (octobre 2017)	Longueur (mm) (±SEM)	Largeur (mm) (±SEM)	Hauteur (mm) (±SEM)	Poids de chair (g) (±SEM)	Poids de coquille (g) (±SEM)
L4	33 %	70 %	43.75±0.86	22.90±0.34	19.90±0.61	1.86±0.12	5.16±0.28
L5	33 %	70 %	66.73±1.58	33.84±1.13	29.80±1.18	8.56±0.67	16.75±1.19
L7	14 %	40 %	39.02±0.60	21.22±0.30	14.84±0.28	1.83±0.08	2.34±0.32
L8	3 %	7 %	40.50±0.50	19.71±0.26	14.33±0.24	1.90±0.08	4.16±0.29
L11	2 %	16 %	38.56±0.49	18.92±0.21	13.63±0.22	1.82±0.08	1.90±0.06
L12	7 %	14 %	44.69±0.69	23.78±0.34	18.93±0.45	2.26±0.17	6.91±0.50
L14	5 %	18 %	43.49±0.61	21.38±0.25	15.45±0.26	2.62±0.12	2.77±0.10
L15	18 %	20 %	44.27±0.72	20.69±0.33	16.08±0.29	2.26±0.15	2.50±0.11
L17	30 %	30 %	49.20±0.99	23.04±0.38	17.74±0.33	4.48±0.32	4.28±0.20
L18	40%	40 %	64.17±1.19	29.52±0.64	23.18±0.42	8.85±0.58	7.60±0.36
L19	40%	40 %	56.45±0.84	25.16±0.38	19.56±0.33	6.30±0.34	5.10±0.23
L20	40%	40 %	57.56±0.79	26.13±0.35	20.15±0.32	7.51±0.43	5.17±0.17

D'une manière générale, tous les sites étudiés sur la saison de production 2017 ont pu être classés en 3 catégories en fonction de la mortalité observée. D'abord la rade de Brest se distingue des autres secteurs avec un taux de mortalité final élevé avoisinant les 70 %. Ensuite, viennent la baie de Lannion, l'Aber-Wrac'h et Pénestin, trois sites qui ont été modérément touchés, avec des taux de mortalités cumulées compris entre 30 % et 40 %. Enfin, la dernière catégorie rassemble les trois autres baies de l'Arguenon, de La Fresnaye et du Mont-Saint-Michel, qui ont été faiblement touchées, avec des pourcentages de mortalité finale compris entre 7 % et 20 %[74].

[74] Des taux de mortalité inférieurs à 20 % sont considérés comme « normaux » ou « admissibles » par les mytiliculteurs et les institutions. Cela ne constitue alors pas une « hausse de la mortalité » (Directive européenne 2006/88/CE).

Dans le cas de ces lots supplémentaires, la comparaison des données biométriques entre les sites ne s'avère pas être cohérente dans la mesure où les espèces ne sont pas les mêmes entre les moules sauvages (*M. galloprovincialis*) et les moules d'élevage (*M. edulis*). Aussi, les performances de croissance entre les moules cultivées sur bouchots sont différentes de celles cultivées sur filières, ce qui est particulièrement visible pour les moules de la baie de Lannion qui sont significativement plus grandes et charnues que les autres (ANOVA, p-value* < 0,05). Enfin et surtout, nous n'avons, pour ces sites, qu'une seule date d'échantillonnage et donc aucune comparaison au cours du temps n'est possible. Toutefois, d'une manière globale, aucune tendance n'apparait entre les mortalités observées et l'indice de condition des animaux.

b. Paramètres abiotiques : températures et contaminants

i. Températures

Le suivi de la température (Figure 41) a permis d'identifier des sites tempérés comme la baie de Lannion et l'Aber-Wrac'h, qui ne dépassent pas les 18 °C en été, et des sites avec des amplitudes de températures importantes comme la rade de Brest, la baie du Mont-Saint-Michel et la baie de Saint-Brieuc qui vont jusqu'à des températures de 20 °C. Les baies de La Fresnaye et de l'Arguenon se positionnent entre ces deux profils thermiques. Comme énoncé dans l'Article 1, hormis une fenêtre de mortalité commune qui s'ouvre au printemps, les profils thermiques ne peuvent, à eux seuls, expliquer les différences de mortalité. Cela est particulièrement remarquable pour la rade de Brest, la baie de Saint-Brieuc et la baie du Mont-Saint-Michel qui partagent toutes trois un profil thermique très similaire mais qui subissent des mortalités significativement différentes.

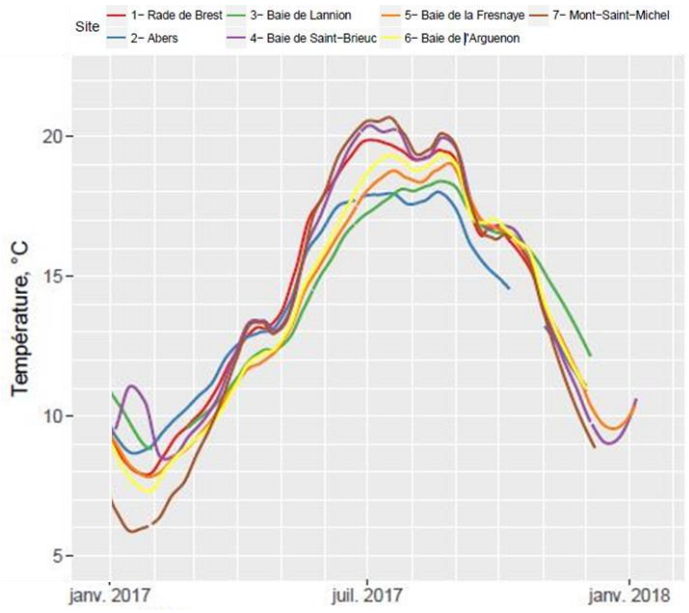


Figure 41 : Evolution des températures entre janvier 2017 et janvier 2018 (Bernard *et al.*, 2018).

ii. Contaminants

Les mesures d'éléments traces réalisées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) sur les moules de certains lots supplémentaires (Tableau 8) n'indiquaient aucune concentration particulière laissant supposer une possible contamination en éléments traces et qui aurait pu impacter les animaux. Toutefois, les moules de l'Aber-Wrac'h (L7) – site révélant un taux de mortalité de 40 % – avaient des concentrations importantes en fer (Fe) et en aluminium (Al) ; cependant, des valeurs similaires avaient été mesurées dans les moules de Saint-Brieuc (voir *supra*, Table 6, Article 1, p. 109), un site exempt de mortalité.

Tableau 8 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en éléments traces mesurés par ICP-MS dans les tissus de moules des lots supplémentaires. Limite de détection < 0,002 mg/kg ; NA : non disponible (manque de tissus) ; ND : non détecté ; DET : détecté.

Eléments traces	L4	L5	L7	L8	L9	L18
Cd (TN = 1,0)	0,2	0,2	0,08	0,09	0,09	0,09
Pb (TN = 1,5)	0,37	0,72	0,32	0,27	0,18	0,13
Hg (TN = 0,5)	0,020	0,019	0,015	0,009	0,011	0,007
Co	0,11	0,07	0,09	0,07	0,05	0,04
Cu	1,15	1,57	1,43	1,23	0,97	1,56
Cr	0,51	0,27	1,38	0,80	0,10	0,08
Fe	48,86	30,88	109,10	64,71	32,68	28,35
Mn	1,07	0,93	1,88	1,64	1,01	0,89
Mo	0,36	0,40	0,29	19,68	9,90	0,21
Ni	0,38	0,15	0,93	0,54	0,16	0,11
Zn	41,14	47,45	16,89	14,13	12,62	15,36
Ti	0,20	0,27	3,24	1,69	0,62	0,63
Sn	<0,02	0,04	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Al	20,45	11,89	118,84	60,87	23,99	23,29
Se	0,86	0,92	1,54	1,05	0,71	0,72
As	6,18	5,68	3,30	6,37	5,61	3,28

TN : Teneur maximale fixée par le règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission européenne, modifié par les règlements (CE) n° 629/2008 et (CE) n° 420/2011

Parallèlement, la recherche de pesticides polaires a été réalisée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (LC/Q -TOF)[75] et aucun composé n'a été détecté. Toutefois, concernant les pesticides organochlorés, la recherche a été faite par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS) (Tableau 9) et l'une des observations, qui peut être faite, est que les deux seuls lots dans lesquels aucun pesticide organochloré n'est détecté sont ceux issus de Saint-Brieuc (L2 et L8).

Tableau 9 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en pesticides apolaires mesurés par GC-MS/MS dans certains des lots de l'étude. NA : non disponible (manque de tissus) ; ND : non détecté.

	L1	L2	L3	L4	L5	L7	L8	L9	L18
2,4 DDT	ND	ND	NA	ND	0,0002	ND	ND	ND	ND
4,4 DDT	0,0007	ND		0,0007	0,0007	0,0004	ND	0,0005	0,0003
4,4 DDD	0,0003	ND		0,0003	0,0004	0,0003	ND	ND	0,0002
4,4 DDE	0,0003	ND		0,0002	0,0004	ND	ND	ND	ND

[75] Méthode analytique qui permet de détecter plusieurs centaines de molécules (pesticides, antiparasitaires, résidus médicamenteux, alkylphénols, parabènes, …) sans les quantifier.

c. Microscopies électronique et optique

i. Microscopie électronique à transmission

Effectuer des observations de tissus de moules en MET semblait être un procédé intéressant dans le contexte des mortalités inexpliquées et dans la démarche de recherche d'un organisme pathogène inconnu. Cependant, le coût important et les contraintes imposées par cette technique (notamment en termes de temps, de logistique et de qualité des échantillons biologiques) ont fait que seuls les trois premiers lots ont pu être inclus pour des observations en MET (ces lots font malgré tout probablement partie des plus intéressants dans la mesure où ils ont été prélevés en pleine période de déclenchement des mortalités, au moins pour Brest). De plus, comme mentionné dans le protocole (Fiche technique n°1, p.251), de très petites coupes de tissus doivent être réalisées réduisant ainsi considérablement la couverture d'observation des tissus de l'animal. Ne sachant pas quel organe pouvait être la cible d'un potentiel nouveau pathogène, les principaux tissus (manteau, glande digestive et branchies) ont été sélectionnés. Par ailleurs, la qualité des tissus à fixer doit être irréprochable, ce qui a constitué une grande difficulté pour travailler sur des tissus de moules juste moribondes. En effet, la dégradation des tissus, chez les moules, se fait en à peine quelques heures selon les conditions, et les tissus ont tendance à se liquéfier très rapidement, ce qui a fortement contribué à la difficulté d'observer les tissus de moules en MET.

Toutefois, un protocole a été mis au point et optimisé avec D. Goux du Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio3) (SF 4206 ICORE) et des observations de bonne qualité ont ainsi pu être effectuées sur certains des tissus des trois premiers lots. Aucune anormalité n'a été constatée mais ces résultats sont préliminaires et des observations plus approfondies mériteraient d'être réalisées.

ii. Histopathologie et cytopathologie

Les observations et constats faits dans l'Article 1 concernant l'histopathologie sur les moules de Brest, Lannion et Saint-Brieuc sont tout à fait généralisables aux lots supplémentaires de l'étude. En effet, concernant l'histologie (Fiche technique n°2, p.253) réalisée sur les lots additionnels provenant de la rade de Brest (moules d'élevage et sauvages), d'importantes réactions inflammatoires accompagnées d'infiltrations hémocytaires aigües ont également été constatées, de même que la présence de granulocytomes, de sporocystes de trématodes et des parasites *Mytilicola* sp, et *Marteilia* sp. En ce qui concerne les moules des lots supplémentaires de Lannion, elles avaient également les mêmes

caractéristiques histopathologiques que celles décrites dans l'article 1 (sporocystes de trématodes, granulocytomes et infiltrations hémocytaires).

En résumé, les principales conditions histopathologiques généralement observées dans les lots étudiés sont illustrées dans la Figure 42. Parallèlement, les moules issues de l'Aber-Wrac'h – site modérément touché par les mortalités comme Lannion – n'étaient concernées par aucune de ces conditions histopathologiques ; seule la présence de nombreux ciliés branchiaux a été observée. Cependant, l'histologie n'a été réalisée que sur 5 individus ce qui représente une faible proportion de l'échantillon. Enfin, dans les moules qui provenaient des sites épargnés par les mortalités (baies de Saint-Brieuc, de l'Arguenon, de La Fresnaye et du Mont-Saint-Michel), ont été observés : le parasite *Mytilicola* sp. dans le tractus digestif, quelques métazoaires dans le pied, des ciliés dans les branchies, des sporocystes de trématodes et des granulocytomes dans le manteau. Cependant, aucune réaction inflammatoire n'était observée. Toutefois, un cas de néoplasie disséminée a été observé parmi les individus de Saint-Brieuc prélevés en mai.

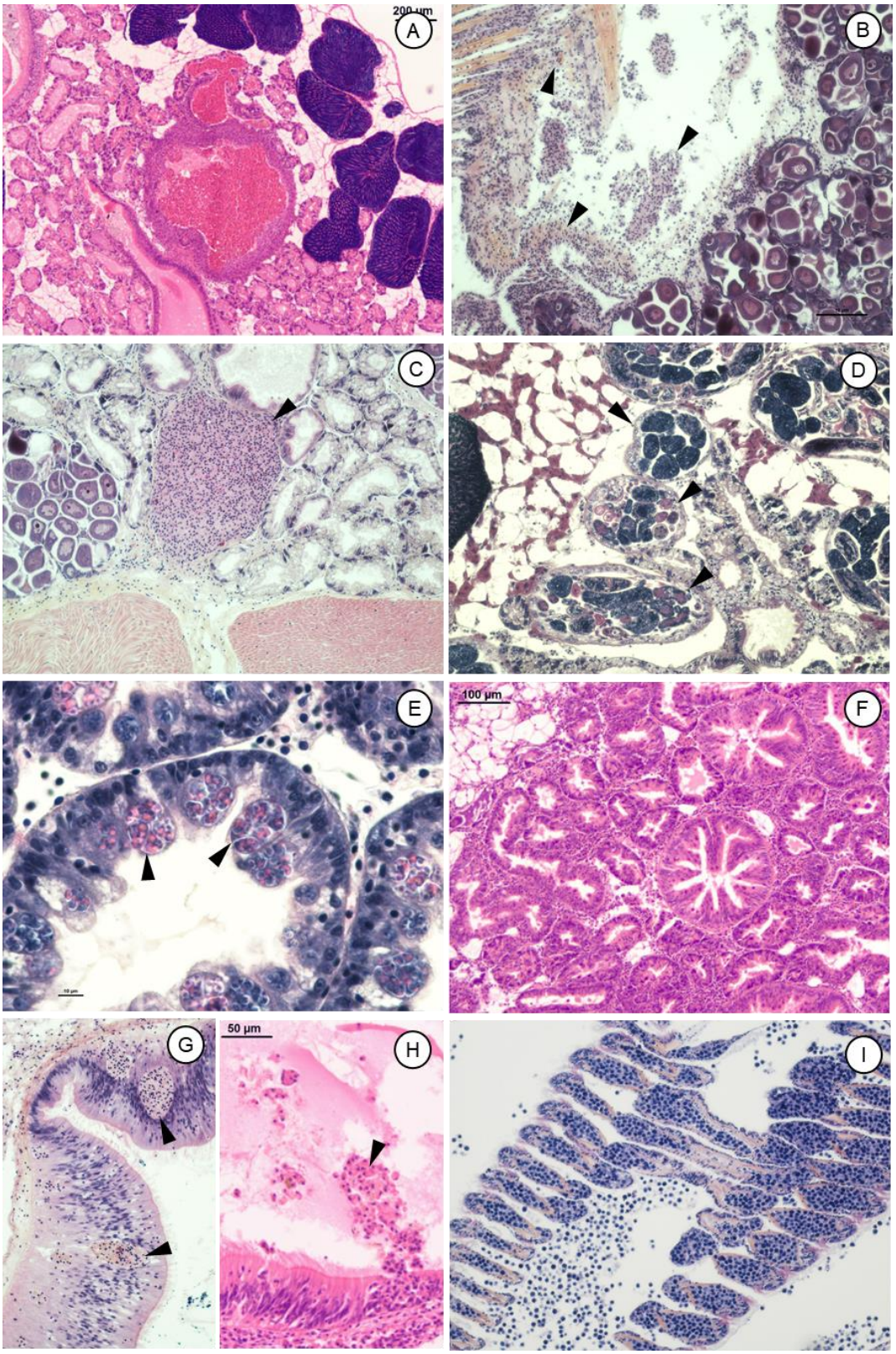


Figure 42 : Micrographes des principales conditions histopathologiques. (A) Masse viscérale montrant une large lésion dans la glande digestive avec une accumulation importante d'hémocytes et la destruction des structures digestives ; (B) Infiltrations hémocytaires ; (C) Granulocytomes ; (D) Sporocystes de trématodes ; (E) Glande digestive infestée par *Marteilia* sp. (F) Infiltration hémocytaire aigue du tissu conjonctif de la glande digestive ; (G) Epithélium stomacal contenant des « paquets » d'hémocytes en migration vers le lumen ; (H) Libération d'un « paquet » d'hémocytes dans le lumen ; (I) Néoplasie disséminée : invasion des branchies par des hémocytes néoplasiques.
Les micrographes (A), (F) et (H) ont été pris par Antonio Villalba (Centro de Investigacións Mariñas).

L'observation de l'hémolymphe par cytologie (Fiche technique n°3, p.255) a permis d'apprécier la qualité des hémocytes normaux (Figure 43 A & B) et de détecter la présence d'hémocytes néoplasiques (Figure 43 C & D). Cela a d'ailleurs permis de constater quelques anomalies hémocytaires chez deux individus – deux moules sauvages de Brest – pour lesquelles l'observation histologique n'avait pas laissé supposer de néoplasie disséminée.

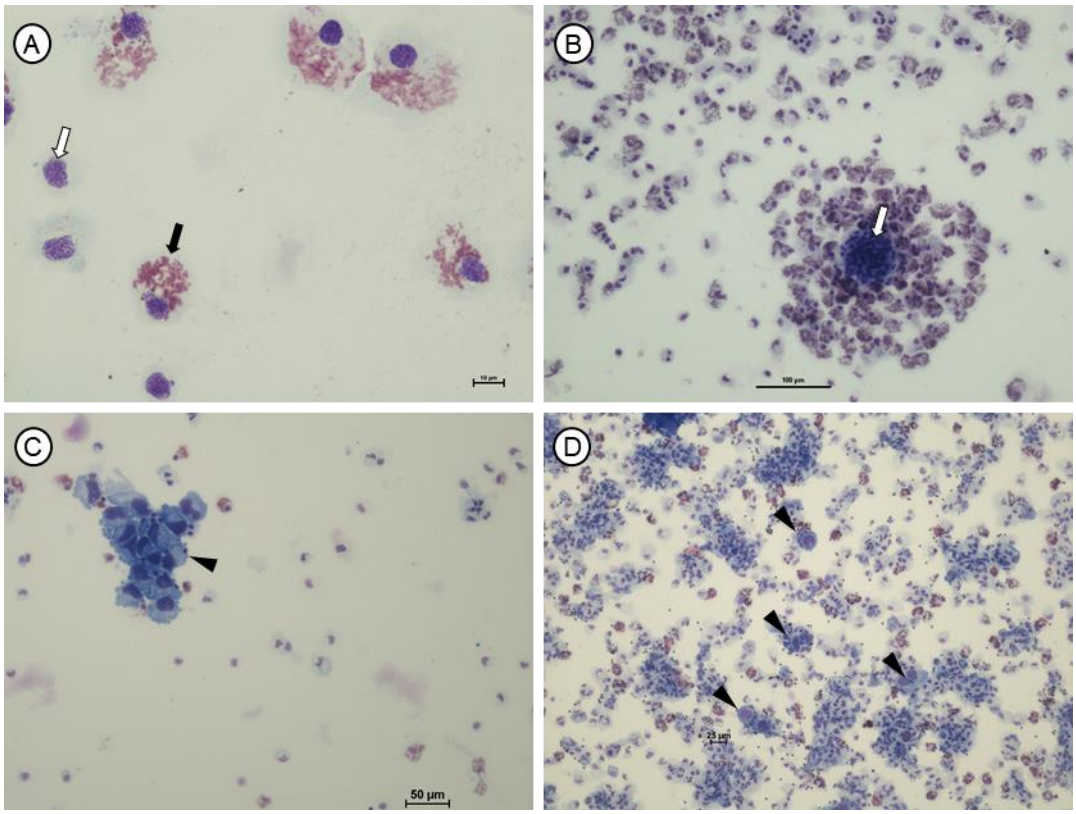


Figure 43 : Micrographes de cytologies normales (A & B) et pathologiques (C & D). (A) Hémocytes normaux : hyalinocytes (flèche blanche) et granulocyte (flèche noire) ; (B) Comportement normal d'agrégation des hyalinocytes (flèche blanche) ; (C) Regroupement de quelques hémocytes néoplasiques, particulièrement bien visibles car la préparation contient peu d'hémocytes normaux ; (C) Hémocytes néoplasiques disséminés au sein de nombreux hémocytes normaux. Coloration : MGG

d. Bactériologie

i. Profil bactérien

Les analyses bactériennes réalisées sur les lots supplémentaires de l'étude permettent de compléter et d'agrémenter les observations faites dans l'Article 1. Entre février et octobre 2017, plus de 350 souches ont été isolées et identifiées. Les profils bactériens de chacun des lots ont été regroupés en fonction de l'intensité de la mortalité observée sur le site (Figure 44).

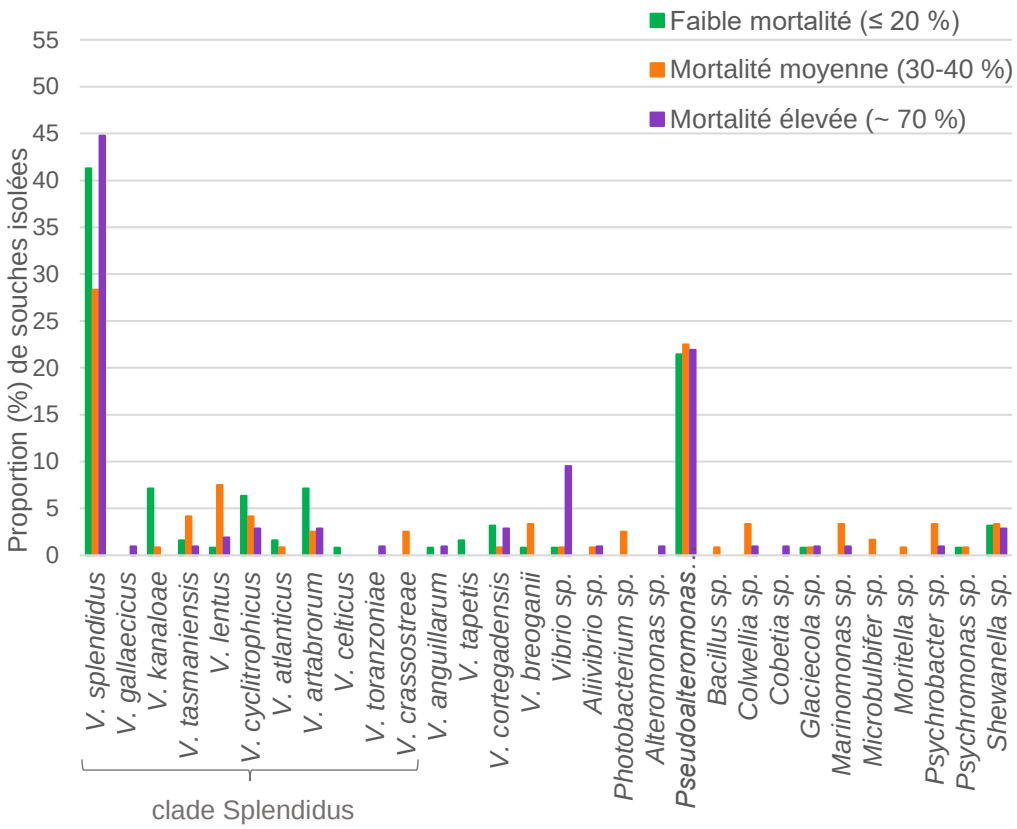


Figure 44 : Proportion (%) des espèces bactériennes isolées entre février et octobre 2017 en fonction de l'intensité de la mortalité observée.

Les deux espèces bactériennes les plus représentées sont *V. splendidus* et *Pseudalteromonas* sp. et ce, quelle que soit l'intensité de la mortalité observée dans le site. De ce fait, aucun lien n'a pu être établi entre la présence spécifique d'une espèce bactérienne et la mortalité observée dans les sites. Toutefois, il apparait que les proportions dans la diversité de la communauté bactérienne sont plus déséquilibrées dans les moules des sites à mortalité élevée que dans les autres. Ceci est particulièrement remarquable au niveau de la proportion de *V. splendidus* par rapport aux autres espèces du clade Splendidus. En effet, dans les moules subissant des mortalités élevées (en violet dans la Figure 44), les souches de *V. splendidus* représentent 81 % (47/58) des espèces du clade tandis que dans les sites à mortalité modérée ou faible, elles représentent respectivement 56 % (34/61) et 62 % (52/84). Ainsi, il n'apparait pas y avoir de prolifération particulière d'une espèce par rapport à une autre mais plutôt un déséquilibre dans la communauté microbienne qui s'appauvrit et se trouve dominée par *V. splendidus* dans les sites à mortalité.

ii. Gènes de virulence de Vibrio splendidus

En août 2018, Bruto *et al.* ont publié un article sur le lien entre l'acquisition de gènes spécifiques et la virulence de certains *Vibrio*. D'après ces auteurs, la virulence au sein du clade Splendidus est un caractère ancestral qui s'est perdu dans certaines populations au cours de l'évolution. Néanmoins, ils ont identifié chez certaines espèces de *Vibrio* deux loci nécessaires à la virulence d'une souche : le premier – *R5.7* – code pour une protéine conservée et est répandu au sein du clade Splendidus[76] et le deuxième – *rtxA* – code pour une toxine MARTX et n'est présent que chez l'espèce *V. splendidus* (cluster).

A la suite de cela, le développement de deux PCR sur ces deux gènes de virulence (Fiche technique n°4, p. 257) a été entrepris afin de rechercher leur présence dans les souches de *V. splendidus* isolées dans cette étude. Jusqu'ici, seules les souches isolées dans les moules de Brest, Lannion et Saint-Brieuc en février (L1, L2 et L3) et en mai (L9, L10 et L13) ont été analysées avec ces PCR (Tableau 10).

[76] Pour les populations virulentes puisque ce gène s'est perdu dans les populations non virulentes.

Tableau 10 : Résultats (pos/neg) des PCR classique et temps réel pour les deux gènes de virulence (*R5.7* et *rtxA*) pour les souches de *V. splendidus* isolées dans les lots de moules de Brest, Lannion et Saint-Brieuc en février et mai 2017.

Lot	Site	Date	Souche	PCR temps réel *rtxA*	PCR classique *R5.7*
L1	Lannion	24/02/2017	1	neg	
			2	neg	
			3	neg	
			4	neg	
			5	neg	
			10	neg	
			18	pos	neg
L2	Saint-Brieuc	27/02/2017	1	pos	neg
			2	neg	
			3	pos	neg
			4	**pos**	**pos**
			5	neg	
			7	neg	
			8	**pos**	**pos**
			9	neg	
			11	pos	neg
			12	pos	neg
			14	pos	neg
			16	pos	neg
			18	neg	
			19	pos	neg
			20	neg	
L3	Brest	27/02/2017	1	pos	neg
			3	neg	
			4	pos	neg
			5	neg	
			6	**pos**	**pos**
			11	**pos**	**pos**
			15	**pos**	**pos**
			18	pos	neg
L9	Lannion	17/05/2017	1	neg	
			2	neg	
			5	neg	
			9	neg	
			10	neg	
			11	neg	
			12	neg	
			14	neg	
			18	neg	
			19	neg	
			20	neg	
L10	Brest	29/05/2017	4	pos	neg
			12	neg	
			15	pos	neg
			18	pos	neg
			19	neg	
			20	pos	neg
L13	Saint-Brieuc	28/05/2017	5	neg	
			10	neg	
			14	neg	
			17	pos	neg

Quel que soit le site, aucune des souches de *V. splendidus*, isolées en mai, ne possède les deux gènes de virulence ; en revanche, parmi celles isolées en février, cinq possèdent ces deux gènes dont deux ont été isolées de moules provenant de Saint-Brieuc, site non impacté par la mortalité, et trois isolées de moules de Brest subissant des mortalités aigües. Ainsi, le nombre de souches porteuses de ces gènes est très légèrement supérieur à Brest par rapport à Saint-Brieuc, mais la différence s'illustre une nouvelle fois en termes de proportion. En effet, sur les huit souches de *V. splendidus* isolées en février à Brest, trois sont porteuses tandis qu'à Saint-Brieuc, sur quinze souches isolées, seulement deux sont porteuses. En outre, il est à noter que les séquences des gènes *mreB*[77] de ces cinq souches sont toutes différentes.

iii. Francisella halioticida

L'observation de réactions inflammatoires sans cause identifiée telles que, des infiltrations hémocytaires aigües, des zones de nécrose, et plus spécifiquement les nombreux granulocytomes, restait en suspens. Ainsi, toujours dans une démarche épidémiologique, une documentation sur les causes – autres qu'abiotiques – pouvant expliquer ces granulocytomes a été initiée. Comme mentionné dans l'Article 1 (« *3. Lesions and alteration: hemocytic infiltration, granulocytomas and neoplasia* », p. 112) la présence de granulocytomes a été justifiée par plusieurs auteurs comme une réponse à un stress de nature chimique (Lowe & Moore, 1979 ; Sheir & Handy, 2010 ; Cuevas *et al.*, 2015) mais cela ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique et surtout, de nombreux cas de granulocytomes ont été répertoriés sans qu'il y ait de contamination chimique avérée, et c'est d'ailleurs le cas ici (exception faite de Brest).

Une piste est alors apparue intéressante à suivre au regard de la présence de ces granulocytomes, et c'est ainsi que la recherche de la bactérie *Francisella halioticida* a été entreprise. Succinctement, le genre *Francisella* comprend des coccobacilles pléomorphes, non mobiles, gram-négatifs et généralement intracellulaires facultatifs, qui infectent les animaux (dont l'homme). Au sein du genre *Francisella*, l'espèce la plus connue est *Francisella tularensis*[78] puisqu'elle cause une « pseudo-peste », la tularémie, chez les mammifères terrestres (dont l'homme) (Siebert, 2017). Cette maladie, très contagieuse, est à déclaration obligatoire auprès de l'Agence Régionale de la Santé (ARS)[79] et est répertoriée comme

[77] Séquences permettant de discriminer les souches de *V. splendidus* les unes des autres (voir *supra*, Article 1, « *Molecular analyses* », p. 95).
[78] Avec plusieurs sous-espèces (subsp.) : *F. tularensis* subsp. *tularensis, F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica, F. tularensis* subsp. *novicida/hispaniensis, F. tularensis* subsp. *philomiragia.*
[79] https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-transmissibles-de-l-animal-a-l-homme/tularemie/la-maladie

pouvant être utilisée comme arme biologique. Concernant les autres espèces du genre, peu de connaissances existent sur l'écologie et la taxonomie de ces bactéries ; de nouvelles espèces, ou sous-espèces, sont régulièrement décrites et/ou reclassées. Récemment, chez des animaux marins, deux nouvelles espèces (sp. nov.) pathogènes ont été décrites : *F. halioticida* (Brevik *et al.*, 2011) et *F. marina* (Soto *et al.*, 2018). Cependant, quelle que soit l'espèce, un lien évident avec les milieux aquatiques, qui peuvent agir comme réservoirs, existe ; *F. tularensis* est associée aux milieux d'eau douce tandis que *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. marina* et *F. halioticida* le sont aux milieux halins. *Francisella* sp. avait déjà été répertoriée comme étant une bactérie pathogène qui cause de sérieuses lésions de type granulomes, ou granulocytomes, associées à des mortalités, dans les poissons (Olsen *et al.*, 2006 ; Soto *et al.*, 2009, 2018) et chez l'ormeau (*Haliotis gigantea*) (Kamaishi *et al.*, 2010). C'est d'ailleurs chez *H. gigantea*, que Brevik *et al.* (2011) ont décrit l'espèce pathogène *F. halioticida* et ce n'est que plus récemment, que cette espèce a été identifiée chez la coquille Saint-Jacques japonaise[80] comme étant responsable de lésions (macro- et micro-scopiques) et d'importantes mortalités (Meyer *et al.*, 2017 ; Kawahara *et al.*, 2018, 2019).

Il s'avère que *F. halioticida* est difficilement cultivable car elle très exigeante en termes de composition du milieu de culture et de température d'incubation (Soto *et al.*, 2009). En effet, elle nécessite un milieu spécifique MEA (« *Modified Eugon Agar* » ; Kamaishi *et al.*, 2010) et sélectif complémenté en antibiotiques ainsi que des températures élevées supérieures à 28 °C, en deçà, elle met plus de 4 jours à croitre. Par conséquent, il nous était impossible de l'isoler avec le protocole d'isolation utilisé dans cette étude[81]. Ainsi, la présence de *F. halioticida* a été recherchée par biologie moléculaire (Fiche technique n°5, p. 261) dans les 20 lots de l'étude (Tableau 3, p. 86) et sa présence a été détectée dans des moules de deux lots prélevés en mai à Lannion (L9 ; 20 % de mortalité cumulée au moment du prélèvement et 40 % de mortalité cumulée finale) et à Brest (L10 ; 60 % de mortalité cumulée au moment du prélèvement et 70 % de mortalité cumulée finale). Cependant, la présence n'a pas été détectée dans tous les *pools* des lots[82] (1 *pool* sur 4 pour L9 et 2 *pools* sur 4 pour L10). Pour les *pools* positifs, les amplicons ont été séquencés au laboratoire et un BLAST a été effectué ; les séquences montraient 100 % d'identification (99 % Query Cover) avec les séquences du gène r*poB* de l'espèce *F. halioticida* sp. nov. décrite par Brevik *et al.* (2011) chez l'ormeau (*F. halioticida* Shimane-1 [JF290381.1] et *F. halioticida* Miyagi-1 [JF290374.1]).

[80] *Mizuhopecten yessoensis*, anciennement *Patinopecten yessoensis* ; bien que ce nom ne soit plus accepté (http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=820198), il est encore couramment utilisé.
[81] Voir *supra*, Article 1, « 6. *Bacteriological analysis* », p. 95.
[82] Voir *supra*, Article 1, « *Additional file 1* », p. 97.

e. Apicomplexa

En parallèle de cette étude de suivi des mortalités de moules de Bretagne Nord, un autre travail était mené au laboratoire (Burioli *et al.*, 2019) sur différents stocks de moules de Bretagne et de Normandie. A la suite des analyses cytologiques réalisées dans le cadre de ce travail, la présence d'endoparasites unicellulaires et piriformes a été observée dans le cytoplasme d'hémocytes de moules cultivées à Camaret-sur-Mer et prélevées à la fin du mois d'octobre 2017 (Figure 45). Ils ont été détectés dans 69 moules sur 227 tandis qu'ils n'avaient pas été observés dans la centaine de moules prélevées dans ce même site en plein été (début du mois d'août 2017). Ces parasites avaient une taille moyenne de 9 µm (± 0,2) de longueur et 5 µm (± 0,3) de largeur, un cytoplasme basophile et un noyau toujours en position excentrée, et étaient majoritairement retrouvés dans les granulocytes.

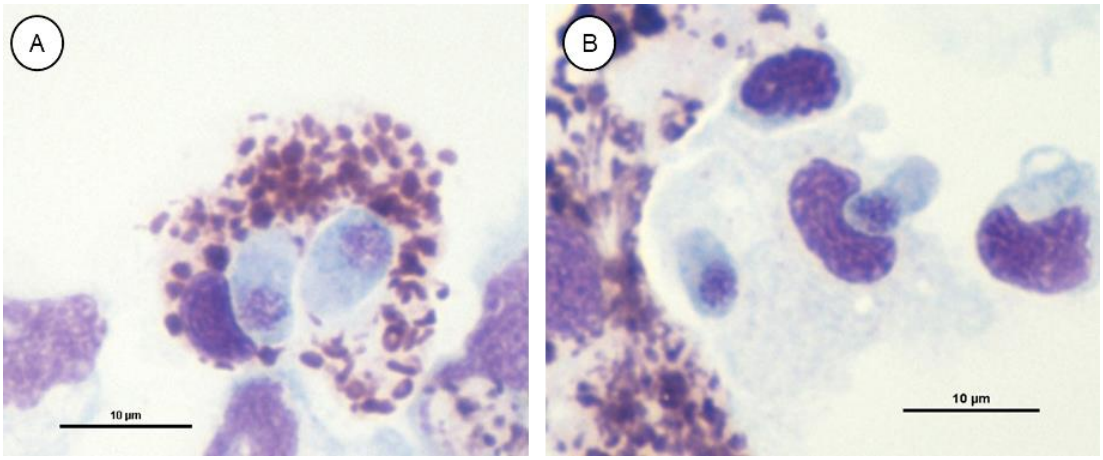


Figure 45 : Zoïtes présents dans le cytoplasme d'un granulocyte (A) et d'un agranulocyte (B) de moules prélevées le 24/10/2017 à Camaret-sur-Mer (29). Coloration MGG. (Burioli *et al.*, in prep)

L'étude de l'ultrastructure de ce parasite a été entreprise par l'intermédiaire de la MET (Fiche technique n°1, p. 251) et a permis d'observer certaines structures caractéristiques des parasites unicellulaires appartenant au phylum des *Apicomplexa* (Figure 46) L'embranchement *Apicomplexa* est un important phylum comprenant environ 6 000 espèces connues (Adl *et al.*, 2007) infectant les animaux dont l'homme. Certaines sont tristement célèbres et bien documentées car responsables de vrais fléaux comme par exemple *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme (malaria), ou encore *Toxoplasma gondii*, responsable de la toxoplasmose (OMS, 2018). Les Apicomplexes sont des parasites obligatoires qui ont un cycle de vie complexe impliquant une reproduction sexuée et asexuée ; ce sont des organismes généralement hétéroxènes mais certaines espèces peuvent être monoxènes. La plupart des Apicomplexes possèdent un complexe apical caractéristique qui leur permet d'entrer dans la cellule hôte de façon active afin de s'y multiplier

(Frénal & Soldati-Favre, 2013). Ce complexe apical est constitué d'un conoïde (structure microtubulaire), de rhoptries et de micronèmes (vésicules de sécrétion contenant des protéines) particulièrement bien visible sur les micrographes de MET (Figure 46B & D).

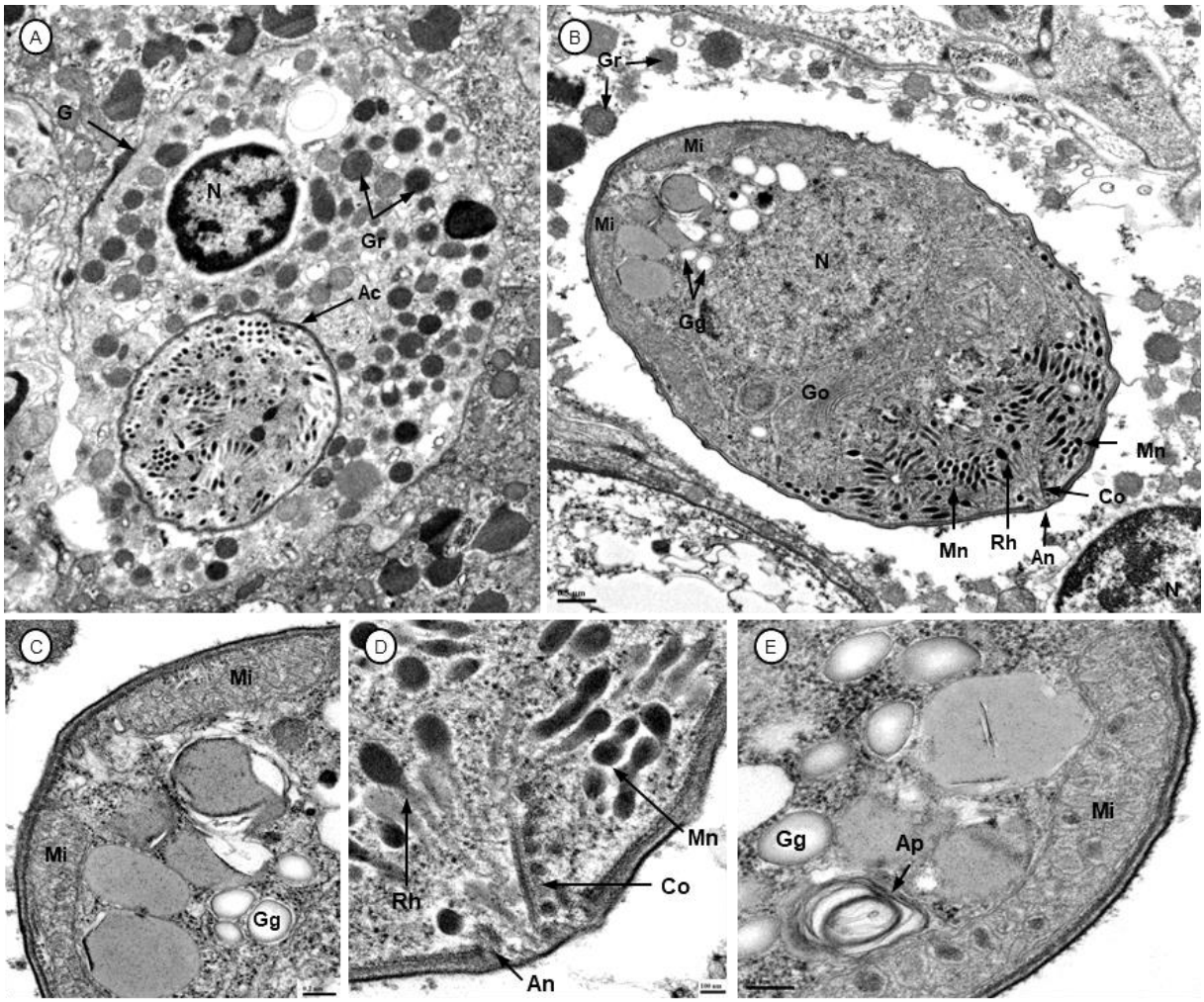


Figure 46[83] : Ultrastructure du parasite Apicomplexe observé dans des hémocytes de moules, *Mytilus edulis*. A : coupe transversale du parasite présent dans le cytoplasme d'un granulocyte ; B : coupe longitudinale du parasite ; C : plus fort grossissement du pôle postérieur avec les deux grandes mitochondries ; D : plus fort grossissement du pôle apical avec le complexe apical ; E : plus fort grossissement sur l'apicoplaste. G = granulocyte, N = noyau, Gr = granules du granulocyte, Ac = parasite Apicomplexe, Mi = mitochondries, Gg = granules glucidiques, Go = appareil de Golgi, Rh = rhoptries, Mn = micronèmes, Co = conoïde, An = anneau polaire, Ap = apicoplaste. (Burioli *et al.*, in prep)

L'identification de l'espèce d'Apicomplexe présente ici a été investiguée par des techniques de biologie moléculaire (Fiche technique n°6, p. 263). La séquence de 1736 pb obtenue et correspondant au gène codant pour la petite sous-unité ribosomale de l'Apicomplexe retrouvé dans les moules de Camaret-sur-Mer en octobre 2017, a été déposée

[83] Les légendes ont principalement été élaborées à partir de celles établies par Dubremetz & Ferguson (2009) sur les clichés originaux de Gustafson *et al.* (1954).

sur GenBank® (MN14811 ; Annexe III, p. 306). Ensuite, un arbre phylogénétique a été construit (Figure 47) et il apparait que la séquence montre une très forte homologie avec l'Apicomplexe retrouvé dans l'hémolymphe du bénitier crocus (*Tridacna crocea*) (AB000912 ; Nakayama *et al.*, 1998), avec deux espèces infectant les pétoncles, *Pseudoklossia pectinis* (MH348778 ; Kristmundsson & Freeman, 2018) et *Margolisiella islandica* (JN227668 ; Kristmundsson *et al.*, 2011). Cet arbre phylogénétique montre que ces Apicomplexes, précédemment identifiés, forment un groupe distinct infectant les bivalves dans lequel le parasite observé ici vient s'intégrer.

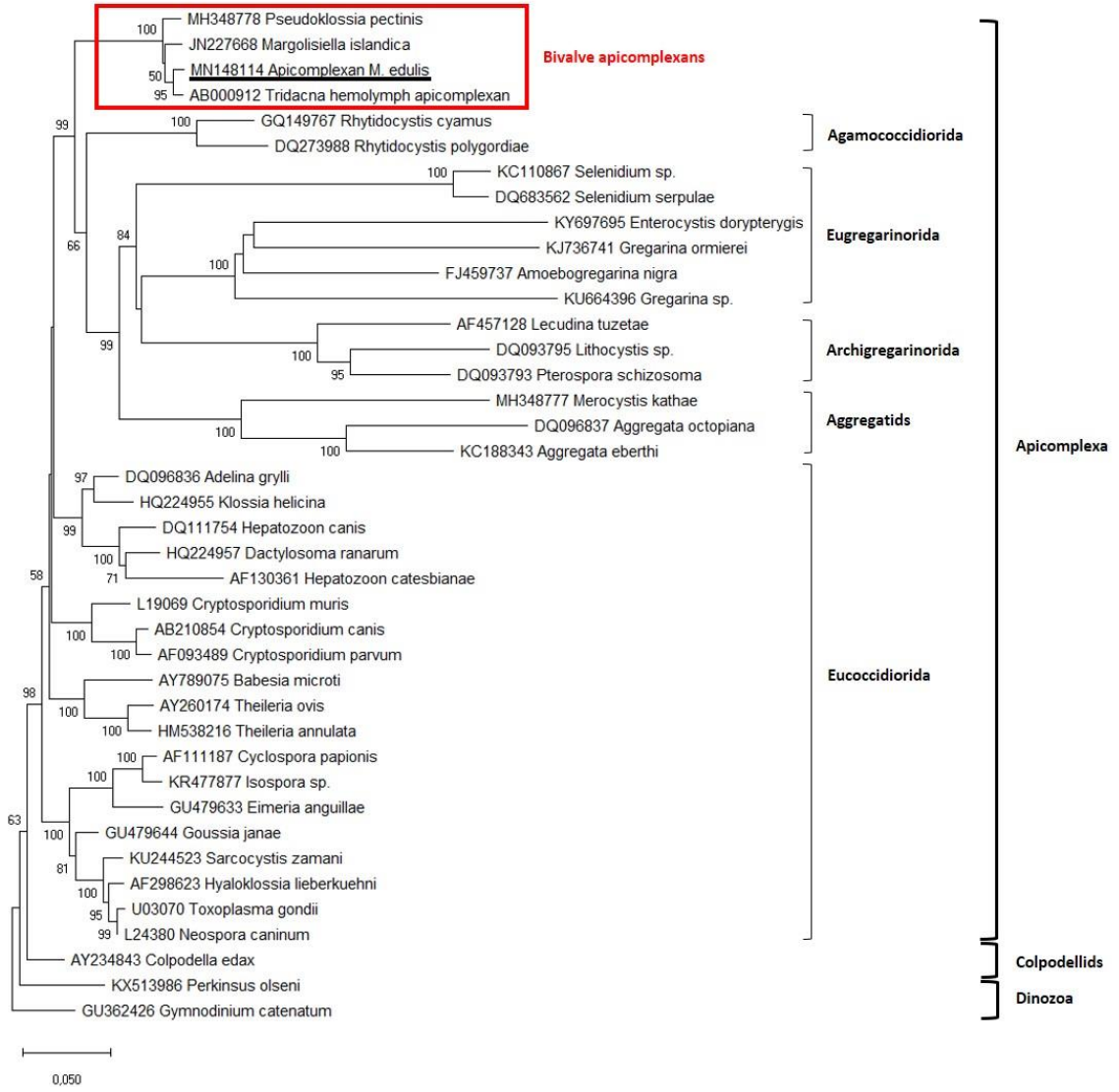


Figure 47 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) de 39 espèces dont 36 appartiennent à l'embranchement des *Apicomplexa*. L'arbre est enraciné par *Gymnodinium catenatum* (Burioli *et al.*, in prep).

A la suite de ces observations, la recherche du parasite a été entreprise dans les 20 lots de l'étude de suivi des mortalités de moules de Bretagne Nord. Le diagnostic a

principalement été fait par biologie moléculaire car, comme explicité à la fin de la Fiche technique n°3 (p. 255), des lames cytologiques de bonne qualité n'étaient pas systématiquement disponibles pour chacun des 20 lots. En outre, les PCR ont l'avantage d'être très sensibles et elles révèlent la présence de l'agent recherché même lorsqu'il est présent en faible quantité, ou lorsqu'il se trouve à une étape de son cycle invisible avec les techniques de microscopie optique.

Les surplus des *pools* d'hémolymphes avaient été conservés à -20 °C ce qui a permis de rechercher le parasite dans les extraits d'ADN de tissus mais également dans les extraits d'hémolymphe. Aucune amplification n'a été observée dans les extraits de tissus ; cependant, dans les 5 extraits d'hémolymphes correspondant à 4 lots prélevés au début de l'automne 2017 (L16, L17, L19 et L20), l'ADN de ce parasite apicomplexe a été détecté. Il était également présent dans les hémolymphes/hémocytes des moules du lot 4 prélevées en avril 2017. D'après ces résultats, il apparait donc que ce parasite ait été présent en 2017 dans des moules de Brest qui subissaient des mortalités importantes (L4 : Camaret-sur-Mer et L16 : Pointe de Rostievec), et dans les moules de Pénestin (L17) et de Lannion (L19 et L20), deux sites qui ont été touchés par des mortalités modérées.

IV. Discussion, conclusions et perspectives

L'approche épidémiologique analytique utilisée dans cette étude a permis d'identifier différents facteurs et paramètres potentiellement impliqués dans la mortalité, ou du moins, dans l'affaiblissement des moules. Une étude multiparamétrique paraissait cohérente dans un contexte où la ou les cause(s) des surmortalités de moules n'avai(en)t pas été identifiée(s). Malgré des défauts manifestes, notamment en termes de stocks suivis, avec des origines et des méthodes de cultures différentes selon les sites, ou encore l'absence de données à l'arrivée des moules sur les sites de production, la volonté première de ce travail était de suivre des moules qui reflétaient les pratiques culturales des mytiliculteurs. Ceci a été réalisé dans une démarche exploratoire et dans le but d'éviter toute discordance avec les pratiques courantes utilisées par le mytiliculteur et ainsi avoir les stocks, les conditions de culture et les performances de production habituelles des moules. L'objectif était justement d'avoir des observations applicables aux moules du mytiliculteur.

En tirant parti des résultats de cette première approche, des plans expérimentaux plus méthodiques pourraient être proposés à l'avenir. Par exemple, déployer différents stocks de moules, ayant une ou plusieurs origines communes dans tous les sites contrastés (typiquement Brest, Lannion et Saint-Brieuc) permettrait une comparaison plus rigoureuse entre les sites, ou encore prélever ces trois sites à des temps plus rapprochés pour suivre une

possible évolution d'une éventuelle maladie. Enfin, cribler les moules à leur arrivée sur les sites de grossissement permettrait d'avoir un T0 avant les mortalités ce qui pourrait être pertinent lors d'un prochain suivi.

Ensuite, du point de vue de la recherche d'organisme(s) pathogène(s), plusieurs pistes apparaissent intéressantes à suivre. D'abord, il serait utile de vérifier le critère de virulence pour les moules, des souches de *Vibrio* porteuses des deux gènes de virulence décrits par Bruto *et al.* (2018). Dans cet optique, il serait nécessaire de réaliser des infections expérimentales avec les cinq souches extraites des moules et identifiées comme porteuses des deux gènes sur des moules, avec des charges bactériennes proches de celles retrouvées dans l'environnement ou dans les tissus de moules (~ 10^{4}/10^{5} UFC/moule ; Eiler *et al.*, 2007 ; Garnier *et al.*, 2007 ; Pfeffer *et al.*, 2003). De plus, il pourrait être intéressant de réaliser des co-infections avec ces souches, à faibles concentrations, pour évaluer l'existence d'un potentiel effet synergique entre les souches, puisque dans l'environnement ces souches sont toujours en « cocktail ». Ceci permettrait de valider l'intérêt de rechercher la présence de ces deux gènes lors de l'isolation de souches de *V. splendidus* à la suite de la mise en culture de tissus de moules subissant des mortalités. Car, comme le montre cette étude, l'isolation quasi systématique de bactéries appartenant à l'espèce ou au clade Splendidus ne permet pas à elle seule de conclure quant à une potentielle implication de celles-ci dans les mortalités observées au sein d'un site. De ce fait, identifier la présence de ces deux gènes dans les isolats de *V. splendidus* pourrait éventuellement permettre d'aller plus loin dans l'interprétation de la présence de ces souches dans les individus moribonds.

D'après Bruto *et al.* (2018), les variations de fréquences entre ces deux loci au sein des populations sont le résultat de différentes pressions de sélection et d'alternatives écologiques, qui sont fonction du rôle des espèces dans le biote. Il pourrait donc être intéressant d'abord de voir si la présence de souches possédant ces deux gènes varie en fonction des sites, des paramètres biotiques et/ou abiotiques ; ensuite d'évaluer leur proportion au sein de la communauté microbienne et enfin, d'étudier le lien qu'il pourrait y avoir avec la mortalité observée au sein du site. En effet, nous avons vu qu'il existe très probablement des souches virulentes de *V. splendidus* aussi bien dans un site à mortalité – Brest – que dans un site qui en est dépourvu – Saint-Brieuc –, mais ceci dans des proportions différentes. Dans ce contexte, il est possible de se questionner sur l'impact de ces souches sur l'hôte au sein d'une flore bactérienne qui, dans certains cas, peut être perturbée. Car comme l'ont montré certains auteurs, notamment chez l'huître (Garnier *et al.*, 2007 ; Lokmer & Wegner, 2015 ; Lasa *et al.*, 2019) et comme le laissent supposer nos résultats sur les profils bactériens, les animaux issus de sites frappés par des mortalités montrent une perturbation dans la structure de leur

communauté bactérienne. Ainsi, cela profite à certains taxa[84] comme les bactéries du genre *Vibrio* et peut conduire à une vibriose. C'est d'ailleurs ce qu'ont montré Lemire *et al.* (2015) chez l'huître, avec le remplacement progressif des bactéries bénignes commensales par des souches de *Vibrio* virulentes dans le cas de mortalités associées à une maladie polymicrobienne.

Ensuite, l'une des perspectives futures importantes à considérer pour l'étude du microbiote des moules, moribondes comme saines (puisqu'encore trop méconnu) est l'analyse par métagénomique (NGS). Ainsi, en séquençant l'intégralité des espèces constituant le microbiome de l'hôte, une comparaison pourrait être faite entre individus sains et moribonds. En conséquence, une observation pourra être faite quant à une possible sur-représentation d'une espèce par rapport aux autres. C'est d'ailleurs ce qu'ont observé Kawahara *et al.* (2018) avec *F. halioticida*, qui était l'espèce bactérienne très largement dominante dans les pétoncles moribondes, alors qu'elle était absente dans les saines. En outre, l'établissement de la diversité de la communauté bactérienne serait plus précis car les études bactériologiques réalisées par l'intermédiaire de cultures sur milieu n'excluent pas la possibilité d'ignorer involontairement certaines espèces non cultivables sur les milieux traditionnellement utilisés. C'est ce que nous avons pu constater pour *F. halioticida*, qui n'a jamais été identifiée à la suite d'un isolement sur gélose. De manière complémentaire, la piste de recherche concernant *F. halioticida* mérite d'être approfondie et étendue à tous les sites de l'étude, voire au-delà. Ces investigations devront être menée que ce soit par métagénomique, mais aussi par hybridation *in situ* (HIS) sur des coupes histologiques comportant des granulocytomes (Meyer *et al.*, 2017 ; Kawahara *et al.*, 2018). Ceci permettrait de confirmer ou d'infirmer l'implication de cette bactérie dans la survenue de cette condition pathologique particulièrement remarquable en histologie et peut-être, plus généralement, dans les mortalités anormales. En effet, les espèces du genre *Francisella* ont été identifiées comme étant responsables de maladies inflammatoires granulomateuses et de surmortalités chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Olsen *et al.*, 2006), chez le Tilapia du Nil (*Oreochromis nilotucus*) (Soto *et al.*, 2009), chez l'ormeau géant (*Haliotis gigantea*) (Kamaishi *et al.*, 2010 ; Brevik *et al.*, 2011) et chez la pétoncle japonaise (*P. yessoensis*) (Meyer *et al.*, 2017 ; Kawahara *et al.*, 2018, 2019) ; elles touchent donc un très vaste rang d'espèces allant des vertébrés aux invertébrés, en passant par les gastéropodes et les bivalves. Ainsi, sa détection dans des moules de Bretagne ne doit pas être ignorée. En outre, dans les cas répertoriés chez les pétoncles, *F. halioticida* cible préférentiellement le muscle or ce tissu n'est que très rarement prélevé, que ce soit pour réaliser l'homogénat de tissu pour l'extraction d'ADN, ou pour effectuer les coupes

[84] Phénomène appelé '*dysbiosis*' par Lasa *et al.* (2019).

histologiques. Ainsi, une attention particulière pour le muscle adducteur postérieur des moules pourrait être nécessaire en vue de rechercher la présence de cette bactérie.

D'ailleurs, cette attention plus fine apportée au muscle adducteur pourrait également être utile pour une étude approfondie du parasite apicomplexe identifié ici. En effet, chez les pétoncles ou la coquille Saint-Jacques (*Chlamys islandica*, *Aequipecten opercularis* et *Pecten maximus*), il semble que l'infection par les Apicomplexes se fasse dans divers tissus (et également dans les hémocytes) mais plus spécifiquement dans le muscle où elle peut parfois même être visible macroscopiquement (Kristmundsson *et al.*, 2011b ; Kristmundsson, Erlingsdóttir & Freeman, 2015). En outre, cibler la néphridie ou le rein pourrait également être cohérent pour des observations histopathologiques dans la mesure où les parasites, *Pseudoklossia semiluna* et *P. pectinis*, ont été observés dans les cellules de l'épithélium rénal respectivement chez des moules canadiennes (Desser, Bower & Hong, 1998) et des coquilles Saint-Jacques françaises (Léger & Duboscq, 1917) ; d'ailleurs, d'après Léger et Duboscq (1917), cela conduisait à une dégénérescence du tissu lors d'infestation intense. C'est également ce qu'ont observé Kristmundsson *et al.* (2015) chez la pétoncle islandaise au niveau du muscle, mais aussi au niveau du tissu conjonctif, de la glande digestive et des gonades ; plus l'intensité de l'infestation était élevée, plus les indices gonadiques, tissulaires et musculaires étaient faibles.

Pourtant, il est assez remarquable que la pathogénicité des Apicomplexes varie considérablement entre les espèces parasites et entre les espèces hôtes. Par exemple en Islande, au cours de ces dernières années, plusieurs études ont clairement identifié les Apicomplexes comme étant la cause des mortalités massives qui touchent les pétoncles (*C. islandica*) (Kristmundsson *et al.*, 2015 ; Kristmundsson & Freeman, 2018). En effet, la progression de l'infection est synchrone aux mortalités des animaux et comme l'infection impacte significativement le développement gonadique, les auteurs suggèrent également un rôle dans l'effondrement des stocks, dû à un recrutement larvaire diminué. Inglis *et al.* (2016) ont fait les mêmes conclusions pour la pétoncle géante (*Placopecten magellanicus*) du *Georges Bank* (plateau au large du Massachusetts) chez qui ils ont associé la réduction de la biomasse et des épisodes de surmortalités à la présence d'un apicomplexe hautement pathogène. Parallèlement à ces observations, Desser *et al.* (1998) ont, quant à eux, observé la présence de l'Apicomplexe *Pseudoklossia semiluna* dans des moules du Canada, avec une prévalence faible entrainant des infections légères mais rien de particulièrement néfaste. Entre ces constats assez contrastés sur l'impact d'une infestation par des apicomplexes et leur rôle dans les mortalités, les observations de Hine, (2002) sur l'huître (*Ostrea chilensis*) en Nouvelle Zélande, apportent un autre angle de vue. En effet, l'auteur a observé que les huîtres étaient presque toutes infectées, au niveau des diverticules digestifs et de l'hémolymphe, mais que sur l'ensemble, seul un tiers des animaux montrait des signes de dommages tissulaires. A la

suite de cela, ils ont constaté une corrélation positive entre l'infection par les apicomplexes et par *Bonamia*, un autre parasite protozoaire bien connu des huîtres. D'après ces auteurs, il s'avère donc que le parasitisme par un apicomplexe, en causant des dommages au niveau des cellules, en perturbant les hémocytes, et en utilisant les réserves de glycogène de l'hôte, augmente la sensibilité des huîtres à un parasite secondaire. Par conséquent, sa détection dans des moules provenant de sites touchés par des mortalités devrait conduire à des recherches plus approfondies sur l'impact direct ou indirect que peut avoir ce parasite sur la santé des hôtes.

En définitive, cette étude multiparamétrique constitue une première approche pour tenter d'identifier les causes potentielles de mortalités massives qui frappent les moules de Bretagne Nord. Elle a permis de faire un premier tri et a ainsi contribué à mettre en évidence différents facteurs très certainement impliqués dans les mortalités, ou du moins, dans la fragilisation significative des animaux. La présence de *Marteilia* sp., de lésions inflammatoires et de pollution à Brest, agrémentées de l'existence de souches vraisemblablement virulentes de *V. splendidus*, de la présence de *F. halioticida* et d'un parasite Apicomplexe, parallèlement associées à des facteurs d'affaiblissement internes à l'hôte – comme la période de reproduction – explique très certainement une grande partie des mortalités. Dans les sites à mortalité modérée, et plus spécifiquement à Lannion, aucune contamination chimique n'a été observée mais la détection de *F. halioticida* et d'un parasite apicomplexe, ainsi que l'observation de lésions inflammatoires aigües, sans qu'aucun lien n'ait pu être établi entre ces différents paramètres, peuvent être des pistes intéressantes à suivre. En effet, l'observation et la détection de ces deux éléments ont été relativement fortuites rendant l'établissement d'une possible association difficile. Ainsi, l'attention mériterait d'être maintenue sur les moules de ces sites qui sont d'ailleurs, encore aujourd'hui, touchées par des mortalités élevées.

PARTIE 1B

-

Déclarations de mortalités en Normandie et dans les Hauts-de-France

I. Introduction et contexte

Lorsqu'un mytiliculteur constate de fortes mortalités ou des mortalités inhabituelles sur les moules qu'il cultive, il se doit de le déclarer auprès de la Direction Départementale des Territoires et de la Mer (DDTM) (Directive 2006/88/CE). Ensuite, la DDTM formule une saisine auprès de l'un des Laboratoires Environnement Ressource (LER) de l'Ifremer, pour la mise en place de la procédure de prélèvement dans le cadre de du REPAMO[85]. Ensuite, les prélèvements sont envoyés dans un laboratoire d'analyses diagnostiques agréé pour les analyses de bactériologie/virologie et d'histologie pour les mollusques marins. LABÉO faisant partie des laboratoires agrées pour la bactériologie et la virologie, nous étions donc informés lorsque des mortalités étaient déclarées dans le bassin de production Normandie-Mer du Nord et les prélèvements réalisés par les agents de l'Ifremer étaient réceptionnés au laboratoire.

II. Objectifs et démarche

A l'image de ce qui a été décrit dans la Partie 1A pour le suivi des moules de Bretagne Nord, l'objectif était d'utiliser une approche multiparamétrique en vue d'identifier les organismes pathogènes ou les conditions pathologiques qui auraient pu expliquer les surmortalités déclarées. Ainsi, comme décrit précédemment dans la première sous-partie, il était prévu de réaliser des analyses de différents types (cytologie, histologie, recherche d'agents pathogènes en biologie moléculaire) ainsi que de la métagénomique (NGS) pour l'étude du microbiome. Pour ce faire, lorsque des mortalités étaient déclarées à la DDTM, et que des prélèvements étaient déclenchés par des agents de l'Ifremer dans le cadre du REPAMO, des prélèvements annexes ont été réalisés par le CRC Normandie-Mer du Nord pour que nous puissions réaliser sur ces lots, nos diverses analyses.

[85] Ce réseau créé en 1992, « assure une mission réglementaire et de service public déléguée par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation *via* la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) » (https://wwz.ifremer.fr/sante_mollusques/).

III.Résultats

Les mortalités de moules déclarées dans le cadre du REPAMO en 2017 et 2018 dans le bassin conchylicole Normandie-Mer du Nord, sont listées dans le Tableau 11 ; la Figure 48 indique la localisation géographique de chacune de ces déclarations. Dans la majorité des cas de déclaration, nous avons pu récupérer des lots prélevés parallèlement par le CRC Normandie-Mer du Nord dans le même intervalle de temps que ceux prélevés par l'Ifremer. Malheureusement, certains lots n'ont toutefois pas pu être récupérés (indiqués par un astérisque dans le Tableau 11). Le lot prélevé chez un mytiliculteur, à Tardinghen en octobre 2018 « hors mortalité », a été réalisé en vue d'effectuer une comparaison avec les moules sauvages, prélevées sur un gisement naturel proche (dans la zone de Wimereux), qui subissaient des mortalités particulièrement importantes[86]. Ainsi, en octobre 2018 pour ce secteur, nous avions deux « types » de lots, un moribond (Wimereux/gisement) et un vivant (Tardinghen/bouchots).

Tableau 11 : Liste des déclarations de mortalités de moules pour le bassin conchylicole Normandie-Mer du Nord, répertoriées dans le cadre du REPAMO pour les années 2017 et 2018. NR : donnée non renseignée. Sources : REPAMO - Bulletins de la surveillance - Janvier à Décembre, 2017 (Canier *et al.*, 2018) et 2018 (Combette, 2018).

	Secteur	Dpt	Date de déclaration	Date de prélèvement	Mortalité lors du prélèvement	Classe d'âge
2017	Oye-Plage	62	17 mars	20 mars	24%	< 1 an
	Donville-les-Bains‡	50	26 avril	26 avril	NR	< 1 an
	Oye-Plage	62	13 octobre	24 octobre	entre 10 % et 50 %	< 1 an
2018	Audinghen/Tardinghen	62	9 mars	14 mars	entre 10 % et 50 %	1 an
	Donville-les-Bains	50	15 juin	19 juin	50%	1 an
	Agon-Coutainville	50	20 juin	16 juillet	NR	1 an
	Chausey	50	11 septembre	25 septembre	NR	1 an
	Audinghen‡	62	14 septembre	15 septembre	entre 10 % et 50 %	juvéniles
	Wimereux (Pointe aux Oies) *[gisement]*	62	12 octobre	15 octobre	NR	tous âges
	Tardinghen	62	12 octobre	13 octobre	hors mortalité	juvéniles
	Dannes (baie de Canche)	62	22 novembre	26 novembre	25%	tous âges

‡ Lots de moules n'ayant pu être récupérés en parallèle des prélèvements REPAMO.

[86] Information reçue de la DDTM du Pas-de-Calais (62) dans le cadre du REPAMO : « Des dépôts très importants de moules sauvages mortes ont été retrouvés début octobre dans la zone de Wimereux (62). Ce phénomène est récurrent mais particulièrement important cette année et se situe au nord d'un gisement naturel. Un prélèvement de moules moribondes a été effectué sur ce gisement ainsi que chez un professionnel proche afin d'effectuer des analyses. »



Figure 48 : Localisation géographique des déclarations de mortalités de moules dans le bassin conchylicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018.

D'une manière générale, nous avons pu constater plusieurs problèmes lors de la réception des lots envoyés au laboratoire dans le cadre du REPAMO. D'abord, les prélèvements étaient presque systématiquement de mauvaise qualité ; en effet, les animaux n'étaient pas moribonds mais incontestablement morts et le processus de décomposition des tissus était, pour la plupart, entamé. Aussi, certaines coquilles étaient même vides, ou totalement remplies de vase (exemple du lot d'Oye-Plage reçu en octobre 2017, Figure 49). Ce fut également le cas pour certaines des moules des lots annexes prélevés par le CRC Normandie-Mer du Nord, ce qui a dans ces cas-là, considérablement réduit les possibilités de prélèvements d'hémolymphe et de réalisation de coupes histologiques. Néanmoins, la présence de sédiment dans les coquilles a donné une indication sur le « contexte » des mortalités et, peut-être, l'une des causes des mortalités (ceci particulièrement dans un secteur connu pour ses problèmes d'envasement). En effet, la première photo de la Figure 49 plus particulièrement, illustre une nette obstruction des branchies qui incontestablement, a dû favoriser la mort de l'animal.

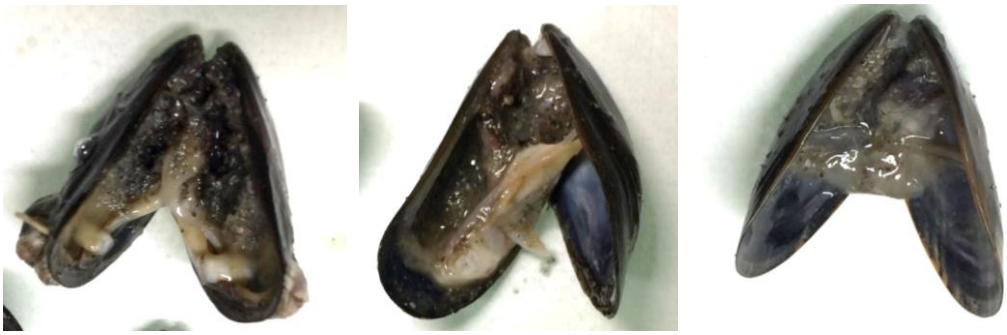


Figure 49 : Moules issues des prélèvements réalisés à Oye-Plage en octobre 2017. La présence de sédiments ou de vase est particulièrement remarquable, ainsi que la dégradation avancée des tissus (plus particulièrement dans le cas de la troisième photo sur laquelle on remarque les tissus liquéfiés).

Les résultats des analyses bactériologiques classiques réalisées dans le cadre du protocole établi par l'Ifremer pour un prélèvement REPAMO ne seront pas détaillés ici ; les résultats sont disponibles dans les « bulletins de la surveillance » (Combette, 2018 ; Canier *et al.*, 2018) ou dans les « bilans du Réseau REPAMO » de l'Ifremer (https://archimer.ifremer.fr). Dans l'ensemble, ils indiquent la présence de *V. splendidus* (clade) dans la quasi intégralité des échantillons.

1. Histologie

La réalisation de coupes histologiques (Fiche technique n°2, p. 253) sur les moules de ces lots n'a pas toujours été aisée étant donné l'état des tissus. Néanmoins, les conditions histopathologiques « typiques » d'un individu en mauvaise santé ont, dans la grande majorité des cas, été observées : infiltrations hémocytaires, granulocytomes, lésions diverses, nécrose ou déstructuration des tissus. Les observations faites pour chacun des prélèvements sont présentées dans le Tableau 12. Lors de la réalisation des coupes histologiques, certains parasites copépodes (*M. intestinalis*) ont été remarqués, mais de manière très sporadique et dans des quantités plus que modérées.

Tableau 12 : Principales observations histopathologiques dans des moules provenant de prélèvements réalisés à la suite de déclarations de mortalités dans le bassin mytilicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018. INF : infiltrations hémocytaires ; GRA : granulocytomes ; LES : lésions diverses ; NEC : zones de nécrose ; NEO : néoplasie hémocytaire (totale ou partielle) ; DES : déstructuration des organes et/ou des tissus.

année	Secteur	mois	INF	GRA	LES	NEC	NEO	DES
2017	Oye-Plage	mars	3/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3
	Oye-Plage	oct.	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2
2018	Audinghen/ Tardinghen	mars	0/4	1/4	3/4	3/4	0/4	3/4
	Donville-les-Bains	juil.	7/10	4/10	2/10	0/10	0/10	0/10
	Agon-Coutainville	juil.	4/5	2/5	1/5	0/5	1/5 (tot.)	1/5
	Chausey	sept.	1/4	0/4	1/4	0/4	1/4 (part.)	0/4
	Wimereux (Pointe aux Oies) *[gisement]*	oct.				*NA*		
	Tardinghen	oct.	5/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	Dannes/baie de Canche	nov.				*NA*		
		m†	**60,6 %** (20/33)	**21,2 %** (7/33)	**48,5 %** (16/33)	**18,2 %** (6/33)	**6,1 %** (2/33)	**18,2 %** (6/33)

m† : moyenne
NA : données non disponibles car réalisation de coupes histologiques impossible

La condition histopathologique la plus retrouvée était la présence d'infiltrations hémocytaires dans plus de 60 % des moules. Des zones de nécrose ont été constatées dans ~ 50 % des cas, ainsi que des lésions diverses et des granulocytomes dans ~ 20 % des animaux. Quelques cas de néoplasie hémocytaire ont pu être observés et à la différence des observations faites dans la Partie 1A, aucun parasite ou sporocyste de trématodes n'ont été observés. Plus généralement l'observation histologique de ces moules provenant de déclarations de mortalités, a permis de constater (ou de confirmer) qu'elles étaient bien, pour la plupart, en mauvaise santé. Cependant, ceci n'a pas permis d'identifier la ou les cause(s) de ces manifestations histopathologiques.

2. Cytologie

Lorsque la qualité des moules le permettait, les hémolymphes étaient prélevées et analysées (Fiche technique n°3, p. 255). Les principales observations faites à la suite des lectures des lames cytologiques sont répertoriées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Principales observations cytologiques sur des hémolymphes de moules provenant de prélèvements réalisés à la suite de déclarations de mortalités dans le bassin mytilicole Normandie-Mer du Nord en 2017 et 2018. NEO : néoplasie hémocytaire (totale ou partielle) ; BAC : présence de bactéries ; GAM : présence de gamètes ou de cellules germinales ; ABS : absence de granulocyte ; BRW : présence de *brown cells*.

année	Secteur	mois	NEO	BAC	GAM	ABS	BRW
2017	Oye-Plage[§]	mars	0/5	5/5	4/5	4/5	4/5
	Oye-Plage	oct.	0/4	3/4	7/7	4/4	1/4
2018	Audinghen/ Tardinghen	mars	*NA*				
	Donville-les-Bains	juil.	0/20	4/20	0/20	4/20	0/20
	Agon-Coutainville	juil.	2/20 (tot.+part.)	1/20	0/20	1/20	0/20
	Chausey	sept.	1/4 (partielle)	1/4	0/4	0/4	0/4
	Wimereux (Pointe aux Oies) *[gisement]*	oct.	*NA*				
	Tardinghen	oct.	*NA*				
	Dannes/baie de Canche	nov.	*NA*				

NA : données non disponibles car prélèvement d'hémolymphe impossible
[§] : 5 *pools* d'hémolymphe (volumes aléatoires entre individus) le reste étant des prélèvements individuels

Comme pour l'histologie, le nombre de moules exploitables pour effectuer des prélèvements d'hémolymphe était généralement faible et la qualité des échantillons n'a pas toujours permis d'avoir des préparations de bonne qualité. Seuls les lots de Donville-les-Bains et Agon-Coutainville (juillet 2018) ont rendu possible l'analyse d'une plus grande quantité d'animaux (une vingtaine) ; néanmoins, ces moules ont été prélevées plus d'un mois après la déclaration de mortalité et lors de la réception, les animaux étaient majoritairement en bon état (du moins après observation macroscopique). Malgré ces effectifs réduits, cela a toutefois permis de constater plusieurs paramètres anormaux. D'abord, quelques cas de néoplasie hémocytaire ont été observés en Normandie ; ensuite, dans la majorité des hémolymphes de moules moribondes, nous avons noté une concentration importante de bactéries ainsi que l'absence de granulocyte. C'est d'ailleurs le principal constat de ces analyses cytologiques réalisées sur des individus issus de mortalités. En effet, il a été assez aisé de remarquer que, plus l'animal était moribond, plus l'hémolymphe était envahie par les bactéries et plus un déséquilibre entre les deux populations hémocytaires (hyalinocytes/granulocytes) était

remarquable. Aussi, dans les deux lots d'Oye-Plage 2017, des *brown cells* ou de nombreuses granules lysosomales ont été observées (Figure 50). Cela donne donc une indication sur l'activité de phagocytose qui a pu se produire, probablement en réponse à l'envahissement du compartiment hémolymphatique par les bactéries.

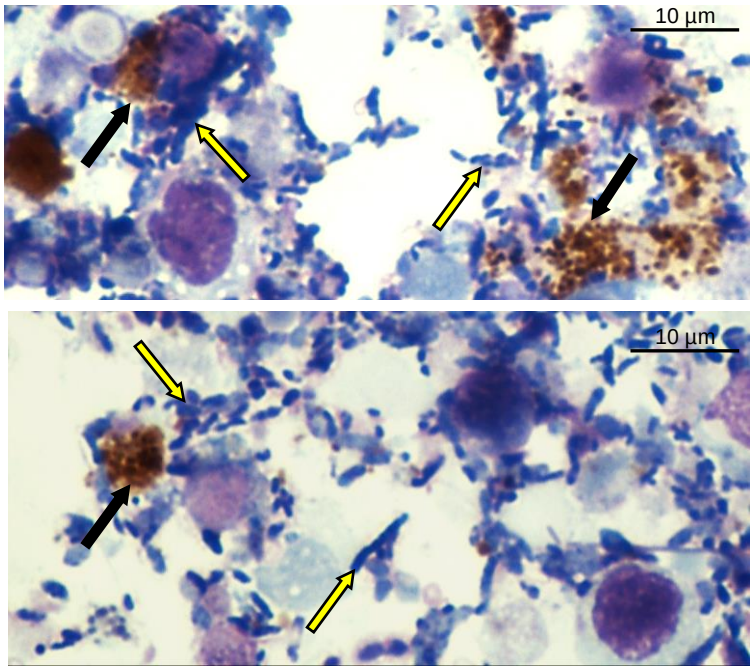


Figure 50 : Préparations cytologiques réalisées avec deux prélèvements d'hémolymphes issues de moules moribondes. Flèches noires : *brown cells* ou granules lysosomales ; flèches jaunes : bactéries. Coloration : MGG

3. Analyses de biologie moléculaire

D'abord, l'un des objectifs pour ces lots était de réaliser des analyses de métagénomique, ce qui n'a malheureusement pas pu aboutir. En effet, bien que la technique soit maintenant bien maitrisée par certains prestataires sur de nombreuses matrices, une matrice « tissus de moules » était, pour eux, assez inhabituelle et ils n'avaient pas de recul sur l'utilisation d'un protocole « standard » pour ce type d'échantillons. Finalement, lorsque le prestataire (Eurofins GATC) a reçu les échantillons et a procédé à l'extraction en vue de réaliser du NGS, les concentrations d'ADN dans les échantillons étaient trop faibles pour procéder à du séquençage haut débit. Deux raisons principales pouvaient expliquer cela : (i) un problème durant le transport vers le laboratoire prestataire (réchauffement des échantillons) ce qui aurait dégradé l'ADN, (ii) une mauvaise qualité initiale des tissus offrant une quantité restreinte d'ADN exploitable. Ces deux hypothèses ne sont pas nécessairement à dissocier

l'une de l'autre et soulignent donc deux points de vigilance à prendre en compte pour de futures analyses.

Ensuite, comme décrit dans la Partie 1A, un parasite apicomplexe ainsi que la bactérie *F. halioticida* ont nouvellement été détectés dans des lots de moules de Bretagne Nord touchées par des mortalités élevées ou modérées[87]. Par conséquent, la recherche de ce parasite et de cette bactérie a été entreprise par des techniques de biologie moléculaire dans ces lots issus de mortalité en Normandie et dans le Pas-de-Calais (Fiche technique n°5, p. 261, Fiche technique n°6, p. 263). Comme déjà mentionné, l'état des tissus, ou encore la quantité de matériel biologique disponible, n'étaient pas toujours satisfaisants ce qui n'a pas systématiquement rendu possible l'extraction des ADN individuellement. De plus, dans le but d'optimiser les analyses, la recherche de l'ADN d'apicomplexe ou de *F. halioticida* a d'abord été faite dans des *pools* d'ADN (de 3 moules en moyenne) puis par extraits individuels lorsqu'ils étaient disponibles. Aussi, dans le cas des lots prélevés en octobre 2018 dans le secteur de Wimereux/Tardinghen, il paraissait intéressant de faire l'analyse sur les extraits d'ADN individuels. Car en effet, le premier prélèvement provenait de moules moribondes sauvages fortement touchées par des mortalités, tandis que le second avait été prélevé sur la concession d'un mytiliculteur à proximité de ces gisements et encore non concerné par des surmortalités, ce qui permettait une sorte de comparaison. Les résultats de la détection d'ADN d'apicomplexe et de *F. halioticida* dans les lots de mortalités 2017 et 2018 sont répertoriés dans le Tableau 14.

[87] Voir *supra* Partie 1A sections III.2.d.iii. (p. 138) et III. 2. e. (p. 140).

Tableau 14 : Résultats des amplifications par PCR classique du gène *rpoB* de la bactérie *Francisella halioticida* et du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) d'un apicomplexe, dans les lots de moules provenant de déclarations de mortalités en 2017 et 2018. Les moules étaient généralement toutes moribondes ou vivantes, parfois les deux états étaient constatés ou alors il était parfois difficile à établir.

				Francisella halioticida		***Apicomplexa***
année	**Secteur**	**mois**	**état**	***pools***	**indiv.**	***pools***
2017	Oye-Plage	mars	morib.	3/4	*NR*	0/4
	Oye-Plage	oct.	morib.	4/4	*NR*	0/4
2018	Audinghen/ Tardinghen	mars	morib.	3/4	*NR*	4/4
	Donville-les-Bains	juil.	mélange	2/4	*NR*	0/4
	Agon-Coutainville	juil.	mélange	2/4	*NR*	0/4
	Chausey	sept.	mélange	0/2	*NR*	0/2
	Wimereux (Pointe aux Oies) *[gisement]*	oct.	morib.	4/4	8/10	*NR*
	Tardinghen	oct.	vivantes	2/4	5/10	*NR*
	Dannes/baie de Canche	nov.	morib.	4/4	10/10	*NR*

NR : amplifications par PCR non réalisées

De manière assez remarquable, l'ADN de *F. halioticida* a été détecté dans tous les lots, excepté dans celui provenant de Chausey[88] ; pour celui du parasite apicomplexe, il a été retrouvé uniquement dans le lot de mars 2018 qui provenait de Audinghen/Tardinghen. Lorsque les PCR étaient positives, les amplicons ont été séquencés au laboratoire, en sens et en antisens, et une séquence contig a été générée (logiciel CodonCode Aligner) ; un BLAST était ensuite réalisé pour chacun de ces contigs. A l'instar des séquences de l'apicomplexe identifié dans Partie 1A (p.142), les séquences d'apicomplexe obtenues ici montraient une très forte homologie avec les parasites apicomplexes identifiés chez d'autres bivalves (identifiants GenBank® : AB000912, MH348778, JN227668). Concernant les séquences contig de *F. halioticida*, elles montraient toutes 99,9 % d'homologie avec l'espèce décrite par Brevik *et al.* (2011) chez l'ormeau (*F. halioticida* Shimane-1 [JF290381.1] et *F. halioticida* Miyagi-1 [JF290374.1]). La construction d'un arbre phylogénétique a été entreprise (Figure 51) afin d'apprécier l'homologie des séquences du gène *rpoB* de cette bactérie retrouvée dans tous ces différents lots issus de mortalités. De manière intéressante, la majorité des séquences sont homologues entre elles (cadre bleu, Figure 51) ainsi qu'à celles de Brevik *et al.* (2011) comme le BLAST nous le laissait supposer. Cependant, deux séquences, issues du même prélèvement, se retrouvent dans un embranchement de l'arbre différent des autres et forment

[88] Par ailleurs, d'après le CRC Normandie-Mer du Nord (com. pers., septembre 2019), les moules du mytiliculteur de Chausey sont plus touchées par de la prédation importante et récurrente, particulièrement en été, que par des mortalités inexpliquées.

un groupe distinct non apparenté (cadre vert, Figure 51). Ces données constituent des premiers résultats qui nécessitent d'être étoffés, notamment avec le séquençage supplémentaire du gène 16S ou avec une MLSA.

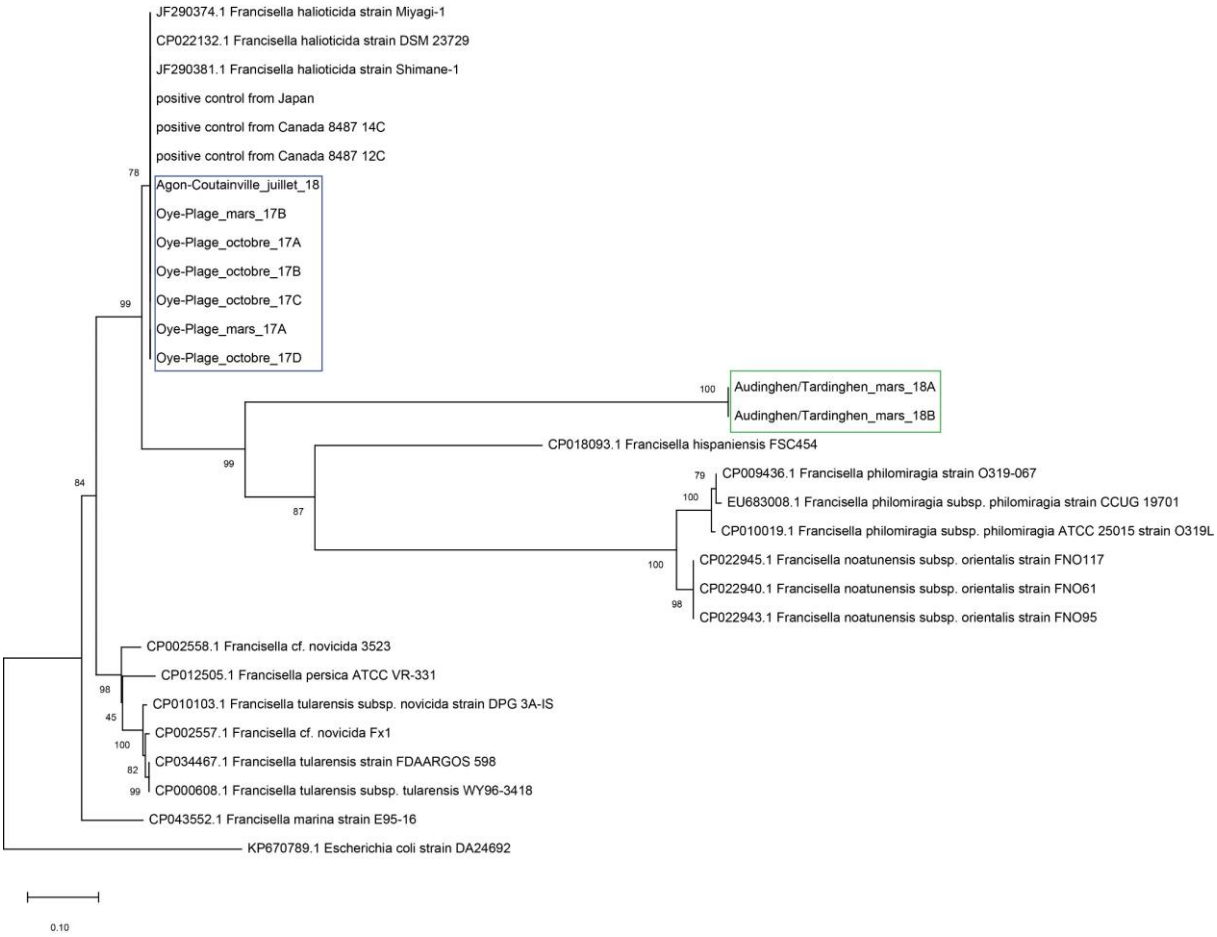


Figure 51 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences du gène *rpoB* de toutes les séquences de *Francisella* spp. disponibles sur GenBank®. L'arbre est enraciné par *Escherichia coli*. (*Bootstrap* = 1000 *replicates*)

IV. Discussion, conclusions et perspectives

Plusieurs des points abordés dans la discussion de la Partie 1A (voir *supra*, section IV, p. 143) sont également valables ici. C'est notamment le cas de la recherche et de l'identification des bactéries du clade *V. splendidus* par des techniques de bactériologie classique[89] en cas de mortalité. En effet, des souches de *V. splendidus* sont présentes dans les moules saines comme moribondes et même si ces bactéries sont généralement retrouvées dans des proportions plus importantes dans les individus moribonds, leur caractère opportuniste ne doit pas être sous-estimé. En outre, le fait d'isoler des souches appartenant au clade Splendidus ne donne pas d'indication précise quant à une potentielle implication

[89] Sur milieux gélosés *marine Zobell agar* ou TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose).

directe dans la mort de l'hôte. Ainsi, il apparait évident que se contenter de rechercher sa seule présence est désormais insuffisant, plus particulièrement dans un contexte où nous savons qu'il existe une importante diversité de souches qui peuvent être très virulentes ou inoffensives. L'identification de facteurs de virulence pour les moules apparait donc plus que nécessaire pour étudier son rôle dans les mortalités et doit faire l'objet d'une attention particulière.

Ensuite, cela ne sera pas redéveloppé ici pour éviter une redondance avec la discussion précédente, mais la réalisation d'analyses métagénomiques pour l'étude du microbiome parait inévitable et essentielle, particulièrement dans un contexte où un caractère infectieux bactérien est suspecté par de nombreux auteurs.

Enfin, nous avons vu que dans tous les lots de moules issus de déclaration de mortalités inexpliquées, *F. halioticida* était présente et parfois, dans 10 individus prélevés sur 10. Ainsi, il pourrait être utile que la présence de cette bactérie soit recherchée dans de futurs échantillons de moules prélevés dans le cadre du REPAMO. Aussi, rechercher la présence de *F. halioticida* dans des échantillons issus de mortalités passées paraitrait cohérent, et ce, pour plusieurs raisons. La première est que, déjà au printemps 2015, l'étude MORBLEU[90] et le réseau Mytilobs mettaient en évidence la présence de nombreux granulomes inflammatoires (ou granulocytomes) dans des moules touchées par des mortalités dans les pertuis charentais sans qu'aucune cause ne soit identifiée (Robert *et al.*, 2016 ; Travers *et al.*, 2016b). De manière contrastée, cette condition histopathologique n'était que sporadiquement présente dans les sites épargnés. Ainsi, les auteurs ont suggéré l'existence d'un lien entre la présence de ces granulocytomes et les mortalités ; ils ont également décrit que la présence de granulocytomes dans les populations était dépendante de l'intensité des mortalités. Ensuite en 2016, Pepin *et al.* (2017) indiquaient que les moules identifiées comme étant de « basse qualité cytogénétique » avant l'épisode de mortalité, présentaient également de nombreux granulocytomes, parfois étendus, ainsi que d'importantes infiltrations hémocytaires. Enfin en 2017, toujours dans le cadre de l'étude MORBLEU, ces anomalies histopathologiques ont une nouvelle fois été remarquées sans que, là encore, les causes ne soient identifiées (Pépin *et al.*, 2018).

La seconde est que depuis 2014, les moules ne sont pas les seuls bivalves à être touchés par des surmortalités. En effet, en avril 2014 dans le pertuis Breton, les coquilles Saint-Jacques d'élevage (*P. maximus*) et les pétoncles noirs sauvages (*Chlamys varia*) ont respectivement subi 20 % et 43 % de mortalité ; *idem* pour les coquilles Saint-Jacques de la baie de Morlaix en juin qui ont connu des mortalités massives (95 %) et pour éleveurs

[90] Action spécifique d'étude des MORtalités de moules BLEUes par l'Ifremer (https://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Etudes-et-Recherche/MORBLEU)

d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) de l'aber Wrac'h qui ont connu 20 % de pertes (François *et al.*, 2015). En avril 2015, les coquilles Saint-Jacques du pertuis Breton sont de nouveau frappées par des surmortalités atteignant 70 % (Lupo *et al.*, 2016) et en mars 2016 ce sont 20 % des pétoncles noirs de la baie de Lannion qui sont perdus (Osta Amigo *et al.*, 2018). Ensuite, *F. halioticida* a d'abord été identifiée chez l'ormeau géant (*Haliotis gigantea*) à la suite de mortalités en 2005, au Japon (Brevik *et al.*, 2011), puis elle a été mise en cause dans les mortalités de coquilles Saint-Jacques asiatiques (*P. yessoensis*) en 2015 en Colombie britannique, au Canada (Meyer *et al.*, 2017). En outre, l'une des maladies que décrivaient Bower *et al.* (1992) dans les années 1980 chez cette même espèce, dans ce même secteur canadien, est très sensiblement similaire ; ce qui conduit à s'interroger sur l'implication de cette bactérie dans des mortalités d'il y a plus de 30 ans. Comme mentionné précédemment, elle a été récemment mise en cause dans des mortalités de pétoncles japonaises au Japon (Kawahara *et al.*, 2018, 2019). Par conséquent, on ne peut ignorer la potentielle implication d'un agent pathogène qui aurait franchi une ou plusieurs barrières inter-espèces et la présence de ces organismes pathogènes dans des espèces « réservoirs ». D'ailleurs, ceci est également valable pour le parasite apicomplexe détecté ici. Bien qu'il n'ait été détecté que dans un seul de ces lots de mortalité, sa présence ne doit pas être ignorée, particulièrement dans la mesure où, comme nous l'avons déjà décrit, il semble être impliqué dans des pathologies, voire des mortalités, chez la pétoncle islandaise, *C. islandica* (Kristmundsson *et al.*, 2011a, 2015; Kristmundsson & Freeman, 2018). Des analyses sont en cours afin, notamment, d'identifier s'il s'agit du même parasite apicomplexe que celui détecté dans certaines moules de Bretagne. En définitive, au vu de la présence de *F. halioticida* dans tous les lots analysés ici et des conditions histopathologiques qu'elle est connue pour provoquer chez d'autres espèces, la participation directe ou indirecte de cette bactérie dans les mortalités de bivalves que connait la France depuis quelques années, est une hypothèse qui mérite d'être étudiée afin d'être confirmée ou rejetée.

Pour finir, le suivi de lots REPAMO prélevés à la suite de déclarations obligatoires de mortalité a permis de mettre en exergue certains manquements qui entravent très certainement l'interprétation des résultats, du moins pour ce qui est des analyses bactériologiques classiques. En effet, bien que l'étude des mortalités de moules se fasse, comme cela le laisse supposer, sur des animaux subissant des mortalités, il semble cohérent de travailler sur des individus tout juste moribonds, et non entièrement morts et dégradés pour ne pas laisser le temps aux organismes opportunistes, comme les espèces du clade Splendidus, de prendre le dessus. Il pourrait d'ailleurs être cohérent de travailler sur des moules encore vivantes présentes dans le plus proche voisinage des moules touchées, les mortalités touchant généralement les élevages par « tâches ». En outre, les délais entre le constat par le mytiliculteur d'une hausse de mortalité, sa déclaration auprès de la DDTM et le

prélèvement réalisé par les agents du REPAMO sont parfois espacés de plusieurs semaines, voire plusieurs mois, ce qui peut, sans conteste, engendrer un décalage dans l'identification d'un potentiel agent infectieux. Par exemple, dans le cas de la déclaration de mars 2017 à Oye-Plage, le mytiliculteur a rempli la « Fiche de déclaration par un conchyliculteur d'une hausse de mortalité de coquillages » le 17/03/2017 et indiquait sur cette fiche, avoir constaté de la surmortalité « début février ». Déjà en 2016, Lupo et Prou avaient souligné l'existence de ces différentiels entre les observations par les professionnels et les déclarations, et avaient proposé des solutions pour améliorer la rapidité de détection. Par conséquent, il est assez regrettable de constater que cela n'a pas véritablement évolué et la question de la sensibilisation des mytiliculteurs à la rapidité d'action de déclaration, et même à la déclaration en elle-même se pose. De la même manière, la déclaration de mortalité à Agon-Coutainville en 2018 a été réalisée auprès de la DDTM le 20 juin et le prélèvement a été effectué le 16 juillet. Supposons que le mytiliculteur avait, à l'instar de son homologue du Pas-de-Calais, observé des mortalités déjà depuis plus d'un mois, soit début mai, alors quel sens y a-t-il à analyser des moules prélevées à la mi-juillet quand les mortalités ont commencé deux mois plus tôt ? Si des observations, mêmes cohérentes sont faites pour les mortalités observées en juillet, alors peuvent-elles l'être pour celles observées en mai ? D'autant que ces épisodes se sont déroulés à deux saisons différentes et que de nombreux processus externes ou internes à l'animal peuvent être intervenus.

Aussi, et cela nous a fait défaut pour l'étude et le traitement de ces lots issus de déclarations de mortalité, il semble important d'avoir un « contexte » des mortalités. Par exemple, nous savons que certains sites mytilicoles de la côte d'Opale sont particulièrement touchés par des déplacements sédimentaires et sont victimes d'importants phénomènes d'ensablement (Michel Ropert, com. pers., août 2019 ; Ropert & Olivési, 2002) ; cela atteint les moules des bouchots causant l'obstruction des branchies et l'asphyxie des animaux. L'augmentation de particules sédimentaires ou la présence de vase a d'ailleurs été identifiée par Lupo *et al.* (2019) comme étant un facteur d'augmentation du risque de mortalité chez *M. edulis*. Ainsi, au regard de la présence d'importantes quantités de sédiments dans quelques-unes des moules, il est probable que ce soit la cause de la mort pour certains des animaux reçus dans le cadre de la déclaration de mortalité en octobre 2017 dans le secteur d'Oye-Plage. Le mytiliculteur exploitant les bouchots de ce secteur est très certainement au fait de cela, ainsi que des conditions météorologiques favorisant ce phénomène, qui auraient pu survenir en amont de l'observation des mortalités. Ceci est également valable pour les cas identifiés de prédation par les mytiliculteurs, d'autant plus lorsqu'ils sont récurrents comme à Chausey, par exemple. De ce fait, ces événements, bien que particuliers et notables puisque qu'ils causent des mortalités et des pertes conséquentes pour les mytiliculteurs, devraient être distingués des mortalités inexpliquées.

PARTIE 2

-

INFECTIONS BACTERIENNES EXPERIMENTALES

I. Introduction et contexte des expérimentations

Déjà évoquée dans cet écrit, la piste d'un agent infectieux bactérien appartenant au clade Splendidus à l'origine des mortalités massives de 2014 et 2016 a plusieurs fois été avancée par différents auteurs[91]. De plus, la description en 2016 par Ben Cheikh *et al.* d'une souche virulente de *V. splendidus,* isolée en mai 2010 dans des moules de Brest subissant des mortalités, ainsi que la confirmation de l'implication de souches virulentes de *V. splendidus* dans les mortalité de 2014 et 2016 par Pepin *et al.* (2017), venaient renforcer cette hypothèse. Parallèlement, dans le cadre de leur étude OPOPOP[92], Bruto *et al.* (2017) ont isolés dans la rade de Brest en 2014[93], plusieurs centaines de souches de *Vibrio* dont certaines se distinguaient par leur caractère virulent. Par exemple, la pathogénicité de certaines souches de *V. crassostreae* a été confirmée sur l'huître et venait appuyer les observations de précédents auteurs (Lemire *et al.*, 2015) ; aussi, cette virulence a été associée à la présence d'un plasmide spécifique (le plasmide pGV1512 ; Bruto *et al.*, 2017). Ensuite, des essais préliminaires d'infections *in vivo* à charges bactériennes élevées ont été réalisés en décembre 2016, sur des moules de Bretagne, avec une centaine de souches de *V. splendidus* ; une quinzaine de ces souches sont alors apparues virulentes pour les moules (Frédérique Le Roux, com. pers., données non publiées, février 2017). Dans ce contexte, il apparaissait cohérent de tester quelques-unes de ces souches, isolées dans un secteur touché par des surmortalités de moules en 2014, et préalablement identifiées comme pathogènes pour les huîtres et les moules.

II. Objectifs et démarche

La majorité des infections expérimentales réalisées sur les bivalves en laboratoire, sont réalisées avec des charges bactériennes relativement élevées et assez éloignées des concentrations retrouvées dans l'environnement, ou même dans les animaux. De plus, il est rare d'avoir des informations sur le moment de l'année durant lequel sont effectuées ces infections, ou même sur les traits biologiques des moules utilisées. Dans la mesure où les mortalités ont été observées à des périodes spécifiques de l'année – fin de l'hiver et début du printemps majoritairement – et avec des variations inter-sites fortes, il est apparu nécessaire de prendre en compte différents paramètres internes et externes aux animaux pouvant influer sur leur réponse lors d'un challenge bactérien. Ainsi, l'objectif de ces infections expérimentales

[91] Voir *supra*, Introduction générale, section II.5.b. (p.71).

[92] « Emergence de pathogènes opportunistes d'huîtres dans des populations naturelles de *Vibrio* – OPOPOP » (https://anr.fr/Projet-ANR-13-ADAP-0007)

[93] Pendant et hors périodes de mortalité, qui sont différentes entre les huîtres et les moules.

in vivo était multiple. D'abord, il consistait à tester le caractère pathogène et virulent de deux souches sélectionnées parmi celles décrites comme virulentes sur des moules de Bretagne, vis-à-vis de moules cultivées en Normandie[94]. Ensuite, il était d'évaluer le rôle du statut physiologique des moules – en lien avec la saison – sur la sensibilité lors d'une même infection bactérienne. Et enfin, estimer l'influence que pouvait avoir l'origine de captage des moules sur leur robustesse face à un challenge bactérien.

Pour ce faire, des infections expérimentales (Fiche technique n°7, p.267) ont été effectuées mensuellement pendant 13 mois pour la première souche testée, *V. crassostreae* 7T4_12, et pendant 9 mois [95] pour la deuxième souche testée, *V. splendidus* 3G1_6. Ces expérimentations ont été réalisées sur des moules qui étaient cultivées en Normandie depuis plus de 18 mois et qui avaient initialement été recrutées dans cinq zones de captage différentes. Pour ces challenges bactériens, deux charges bactériennes ont été testées : une première cohérente avec celles retrouvées dans l'environnement et/ou dans les tissus de moules (10^4 CFU/moule), et une seconde plus élevée (10^7 CFU/moule), qui est plus couramment utilisée lors d'infections expérimentales réalisées en laboratoire.

III.Résultats

Les résultats de ces expérimentations ont fait l'objet d'une présentation orale lors d'un congrès international et d'un article accepté dans un journal à comité de lecture :

- Charles M. 2019. Experimental infection of *Mytilus edulis* by two *Vibrio splendidus*-related strains: evaluation of virulence, the influence of the origin of mussels and season on their sensitivity. *Oral communication – 3rd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR 2019), 26-28 August 2019, Chioggia (Italy)*

  (cf. abstract Annexe IV, p. 308)

- Charles M., Trancart S., Oden E., Houssin M. 2020. Experimental infection of *Mytilus edulis* by two pathogenic *Vibrio splendidus*-related strains: determination of pathogenicity level of strains and influence of the origin and annual cycle of mussels on their sensitivity. *Scientific article – Journal of Fish Diseases.* doi:10.1111/jfd.13094

  Article 2 (voir infra)

[94] Sur la quinzaine de souches de *V. splendidus* (clade) indiquées comme virulentes, la moitié a été testée préliminairement lors d'une expérimentation unique d'infections expérimentales, ce qui a conduit à la sélection des deux souches dont les résultats sont décrits ici.

[95] Il était initialement prévu d'effectuer les expérimentations sur un an, comme pour *V. crassostreae* 7T4_12, mais le matériel biologique utilisé a malheureusement été récolté prématurément par l'exploitant.

1. Article 2

RESUME

Cette étude visait à évaluer la pathogénicité de deux espèces appartenant au clade Splendidus et à évaluer l'influence de l'origine et du cycle de vie annuel des moules sur leur sensibilité lors d'un challenge bactérien. Ainsi, des expérimentations d'infections *in vivo* ont été réalisées avec *Vibrio crassostreae* 7T4_12 et *Vibrio splendidus* 3G1_6, pendant respectivement treize et neuf mois, sur des moules adultes initialement captées en France dans cinq zones de recrutement différentes. Deux concentrations bactériennes ont été testées : l'une correspondant aux charges de *Vibrio* spp. retrouvées dans l'environnement ou dans les tissus des moules (~ 10^5 UFC mL^{-1}) et une autre beaucoup plus élevée (~ 10^8 UFC mL^{-1}). La concentration environnementale n'a eu aucun effet, et ce, quelles que soient la période de l'année, la souche utilisée ou l'origine des moules. En revanche, un effet pathogène a été observé à la plus forte concentration testée mais ceci uniquement à des périodes précises de l'année ; de plus, l'une des origines est apparue plus résistante que les autres. L'état physiologique des moules – en lien avec la saison – semble significatif dans la sensibilité des moules, tout comme leur origine de recrutement. Cette étude est la première à tester la pathogénicité de souches appartenant au clade Splendidus à des concentrations proches de celles retrouvées dans l'environnement, sur l'ensemble du cycle annuel des moules, et en prenant en compte leur origine.

Mots-clés : moules ; *Vibrio splendidus* ; pathogénicité ; cycle annuel ; sensibilité ; origine de captage

EXPERIMENTAL INFECTION OF *MYTILUS EDULIS* BY TWO *VIBRIO SPLENDIDUS*-RELATED STRAINS: DETERMINATION OF PATHOGENICITY LEVEL OF STRAINS AND INFLUENCE OF THE ORIGIN AND ANNUAL CYCLE OF MUSSELS ON THEIR SENSITIVITY

Charles M.[1, 2*], Trancart S.[2], Oden E.[2], Houssin M.[1,2]

[1] Normandie Université, Université de Caen Normandie, UMR BOREA, CNRS-7208, IRD-207, MNHN, UPMC, UCN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex 4, France

[2] LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

ABSTRACT

This study aimed at assessing the pathogenicity of two *Vibrio splendidus*-related species and evaluating the influence of the origin and annual life cycle of mussels on their sensitivity during a bacterial challenge. Thus, *in vivo* infection assays were made with *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and *Vibrio splendidus* 3G1_6, over respectively thirteen and nine months, on adult blue mussels from five recruitment areas in France. Two bacterial concentrations were tested: one consistent with the loads of *Vibrio* spp. in environment and mussel tissues (~ 10^5 CFU mL^{-1}) and another one much higher (~ 10^8 CFU mL^{-1}). The tested environmental concentration has no pathogenic effect whatever the time of year, the strain used and the origin of mussels. However, at the highest concentration, a pathogenic effect was observed only at specific moments, and one of the origins appeared to be more resistant. The physiological state of mussels –depending on the time of year– seemed significant in mussels' sensitivity, as their recruitment origin. This study is the first to test the pathogenicity of *V. splendidus*-related strains at concentrations close to what is found in the wild, over the annual cycle of mussels, and considering their origin.

Keywords:

mussels, *Vibrio splendidus*, pathogenicity, annual cycle, sensitivity, recruitment origin

*Corresponding author: Maud Charles, LABÉO Frank Duncombe, Pôle Recherche, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France.
E-mail: maud.charles@outlook.fr ;

INTRODUCTION

The marine mussels, *Mytilus* sp., are distributed worldwide (Gaitán-Espitia *et al.*, 2016) and constitute food source for aquatic and terrestrial animals including human beings, making them a high economic value product (FAO, 2016). The blue mussel industry occupies an important place in Europe, which is one of the main producers of mussels in the world with almost 600,000 tons per year. France is the second major European producer after Spain, with around 80,000 tons per year, most of them from aquaculture (FAO, 2018). Mussel farming in France is undertaken along the English Channel, the Atlantic, and the Mediterranean coasts and all mussel juveniles are collected –at spring for *Mytilus edulis*– in the wild. Thus, production is exposed to several external biotic and abiotic risks.

Indeed, filter feeding bivalves such as mussels are continually exposed to microbiota from the surrounding seawater and therefore vulnerable to attack from potential pathogens. Up to a recent time, adult mussels were considered to be very resistant to bacterial infections (Eggermont *et al.*, 2014) as well as to disease because of a well-working immune system (Venier *et al.*, 2011; Philipp *et al.*, 2012). *Mytilus edulis* was classified as a resilient cultivated species by mussel farmers insofar as they have only experienced very rare episodes of abnormal mortalities contrarily to what happened to the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Barbosa-Solomieu, Renault & Travers, 2015). In addition, these rare mass mortality events have not been attributed to pathogenic bacteria, but only to unfavourable environmental conditions or toxic algal blooms (Tsuchiya, 1983; Peperzak & Poelman, 2008). Nevertheless, since 2014, several important production areas on the French west coast have been affected by high and unusual mass mortality, resulting in significant losses and considerable economic consequences (Béchemin *et al.*, 2014; Allain & Bernard, 2016; FAO, 2016; Polsenaere *et al.*, 2017).

As the pathogenic bacteria *Vibrio splendidus* has been found in large abundance in French moribund mussels, its involvement was rapidly suggested (Béchemin *et al.*, 2015; François *et al.*, 2015; Eggermont *et al.*, 2017). *Vibrio* spp. are indigenous, saprophytic and very abundant in aquatic environments such as estuaries, coastal waters, marine sediments and aquaculture environments all over the world (Colwell, Kaper & Joseph, 1977; Ortigosa, Esteve & Pujalte, 1989). Some of these gram-negative bacteria are pathogenic to humans and other animals, including molluscs (Barbieri *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2014). Species belonging to the genus *Vibrio* are the most frequently isolated bacteria from molluscs and *V. splendidus* is widely distributed in marine ecosystems (Macián *et al.*, 2000); they are known to have impacted marine shellfish for many years with infectious diseases and have caused mortalities

reported in the history of shellfish aquaculture (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Lemire *et al.*, 2015; Travers *et al.*, 2015). However, knowledge on their ecology and pathogenicity is still scarce.

In France, past mortalities of mussels greatly varied from one year to another, from one season to another and from one site to another (Lupo *et al.*, 2019). However, the French cultural practices, of natural larval recruitment make spat transfers to several growing sites on the Atlantic coast and English Channel, very common; the various growing areas in northern France are almost all supplied with spat from the same locations –roughly between the Loire and Garonne estuaries. Besides, even though mortality events have been reported at different times of the year, the majority of them took place at the end of winter and early spring, when the temperature increased (Soletchnik & Robert, 2016; Travers *et al.*, 2016b; Cochennec-Laureau *et al.*, 2018; Glize & Gourmelen, 2018). It appeared that the etiology of these mortalities is complex; several factors could be involved like environmental conditions, infectious agent, physiology and genetic of the host, as suggested by Goulletquer *et al.* (1998) for mortality observed with *C. gigas.*

The objective of the present work was precisely to assess the influence of some internal and external factors of the host during a bacterial injection challenge. In this way, *in vivo* infection assays were made over a year, with adult blue mussels (*M. edulis*) from five different recruitment areas, by using two *V. splendidus*-related species described as virulent for mussels from Brittany at high concentrations (Le Roux, pers. comm., unpubl. data): *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and *V. splendidus* 3G1_6. The aims of this study were to evaluate (i) the pathogenicity and the virulence of these two strains on mussels by testing two different concentrations: one consistent with the general environmental loads of *Vibrio* spp. in seawater ~ 10^4/10^5 CFU mL^{-1} (Pfeffer *et al.*, 2003; Eiler *et al.*, 2007), also corresponding to the bacterial concentrations that can be reached in *M. edulis* (equal to 2.9 x 10^4 CFU per mL or g according to Garnier *et al.*, 2007), and another one much higher ~ 10^8 CFU mL^{-1}; (ii) the influence of the first farming method used and original spat recruitment area on the sensitivity to *vibrio*sis; (iii) the role of physiological and morphological conditions of mussels –impacted by the season– in susceptibility to bacterial infections.

MATERIALS AND METHODS

1. Bacterial strains and inoculum preparation

The two *V. splendidus*-related strains used for experimental infection were provided from the French institute, Ifremer. As part of their study (ANR 13-ADAP-0007-01 “OPOPOP”), they isolated many strains from a *Vibrio* population assembly isolated from oyster tissues (*C. gigas*) during and outside mortality events that hit oysters and mussels in the bay of Brest (Finistère,

France) in 2014. Among the hundred species isolated, several appeared to be highly pathogenic for oysters (Bruto *et al.*, 2017) and mussels from Brittany (Le Roux, pers. comm., unpubl. data) of which *V. crassostreae* 7T4_12 and *V. splendidus* 3G1_6, that are used in this study, and respectively named S1 and S2 in the rest of the article. Twenty-four hours before infection, the bacteria were grown in fresh liquid sterile marine Zobell at 22 °C. The bacterial inocula were prepared using the fresh bacterial suspensions by diluting it in Artificial Sterilised Sea Water (ASSW) from 1:10 to 1:10,000,000 (serial ten-fold dilutions from 10^{-1} to 10^{-7}). The two dilutions used as inocula for experimental infections were 1:10 (10^{-1}) and 1:10,000 (10^{-4}). Bacterial load of pure bacterial suspension (BL) was defined by enumeration of Colony Forming Units (CFU) according to the standard NF ISO7218:2007 (AFNOR, 2007): BL (CFU mL^{-1}) = $\frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d}$; where Σc is the sum of the colonies counted on the two plates of marine Zobell agar spread with two successive dilutions (10^{-6} and 10^{-7}) that incubated for 48 h at 22 °C; V is the volume that has been spread on plate (0.1 mL) and d is the dilution corresponding to the first dilution retained (10^{-6}).

2. Experimental mussels

Adult mussels used for this experiment were placed on intertidal mussel stakes ('*bouchot*') in the shellfish growing area off the coast of Bricqueville-sur-Mer, Normandy, France (48°55'05.8"N 1°34'23.9"W) since automn 2015. Spats were initially collected in early spring 2015 in five different recruitment areas: the cove of Port-Mânes (Ile Dumet, Loire-Atlantique, France); the Loire Estuary (La-Plaine-sur-Mer, Loire-Atlantique, France); the bay of Bourgneuf (Noirmoutier, Vendée, France); the bay of Aiguillon (Charron, Charente-Maritime, France); the Antioche Sound (Fouras, Charente-Maritime, France) (Figure 52). These five origin groups are respectively named ID, LP, No, Ch, Fo in the rest of the article. The mussels from ID were different from the others: first, larval recruitment and first months of farming were made on longlines (while the others were on *'bouchot'*). Second, they were '*pelisse*' mussels, *i.e.* mussels from the upper layer of the collection rope that grew faster than the others. To leave space for the lower layer mussels, and to prevent these bundles of mussels from coming off, farmer collects and puts them back into 2.5 m long mesh tubes. Like initial collection rope, these nets are then coiled around a wooden pole at the growing area.

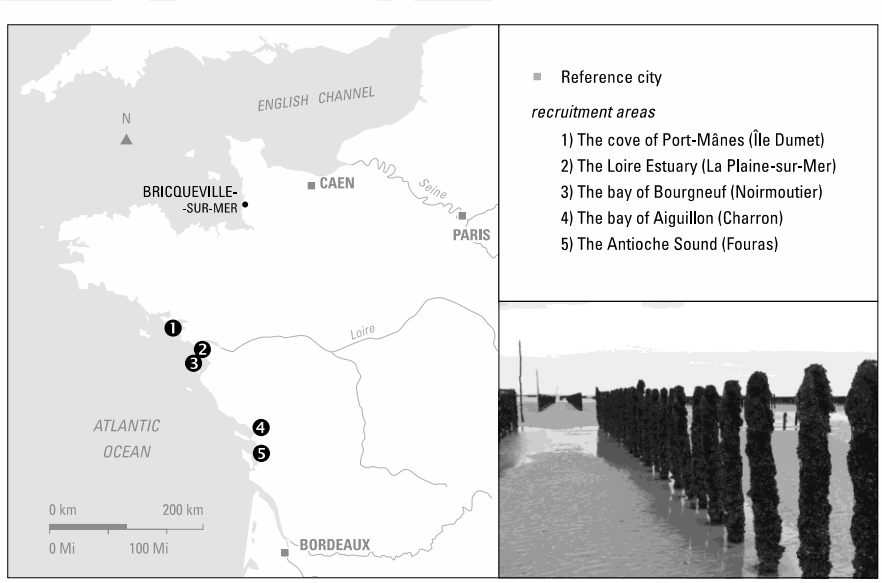


Figure 52: Location of the five mussel original recruitment areas and the shellfish growing area Bricqueville-sur-Mer with a picture of '*bouchot*'.

3. Experimental procedure of bacterial challenges

Experimental infections were performed monthly during one year for S1 (from April 2017 to April 2018) and during nine months for S2 (from August 2017 to April 2018). Mussels were collected during low tide, transported in cooler bags to the laboratory and once there, immediately put back in tanks filled with oxygenated natural seawater at 15 °C overnight. The next day, they were anesthetised by bathing in a solution containing 40 g L^{-1} of magnesium chloride during 30 min. Then, 100 µL of inocula or ASSW (for negative controls) per mussel were injected into the posterior adductor muscle. In the rest of the article, the bacterial loads corresponding to the 100 µL of dilutions 10^{-1} and 10^{-4} have been respectively named C1 and C2. Following the injections, 20 mussels of each group (origin/strain/loads) were placed in separated tanks filled with 1 L of aerated seawater at 15 °C (Figure 53). Thus, 100 mussels were injected for each condition (S1_C1; S1_C2; S2_C1; S2_C2 or negative controls). Water exchange and tank cleaning were carried daily for seven days and then, mortalities were recorded. All mussels that did not spontaneously close their valves when the seawater was removed were considered as dead. Dead mussels were sampled for biometry (flesh weight and shell length) and microbiological analysis. The objective was to verify whether among the main bacteria found in the tissues of dead mussels, the strain initially injected was present (Koch's fourth postulate).

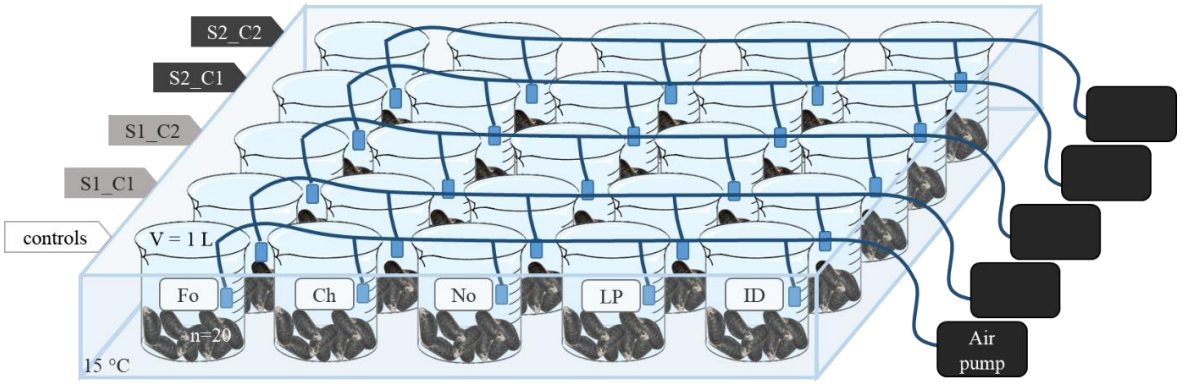


Figure 53: Schematisation of the post-infection monitoring system. Mussels inoculated with 100 µL of artificial sterilised sea water (controls), dilution 1:10 (C1) or dilution 1:10,000 (C2) of pure bacterial suspension of *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (S1) or *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2).

4. Microbiological and molecular analyses of dead mussels

Tissues of dead mussels were mashed with scalpels and a volume of 450 µL of ASSW was added to 50 mg of the homogenate. After stirring and a pulse centrifugation to pellet cellular debris, ten-fold dilutions of supernatant were made and 100 µL of 1: 10,000 (10^{-4}) and 1: 100,000 (10^{-5}) dilutions were sown on Zobell marine agar and incubated for 48 h at 22 °C. For each plate, the three predominant bacterial colonies were re-isolated in order to ensure their purity. Then, DNA extraction of these three predominant colonies was performed by heating the colony placed in 250 µL of purified water (DNA/nuclease free water) for 10 min at 95 °C. The successful extraction was confirmed by DNA quantification with NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA USA) and strains were then characterised by molecular analysis. One TaqMan® real-time PCR targeting the *16S rRNA* gene of *V. splendidus*-related strains (PCR1) (Oden *et al.*, 2016) was carried out on a Smart Cycler® (Cepheid, USA); the primers used for PCR1 were *SpF1* 5'ATCATGGCTCAGATTGAACG3' and *SpR1* 5'CAATGGTTATCCCCCACATC3' (Nasfi *et al.*, 2015) and the probe *SpProbe* (5'-3') FAM-CCCATTAACGCACCCGAAGGATTG-BHQ1. The reaction volume of 25 µL contained 12.5 µL of Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgium), 0.5 µL of each primer (20 µM), 0.5 µL of probe (10 µM), 9 µL of purified water and 2 µL of extracted DNA (replaced with 2 µL of purified water in the negative control). The thermal cycling profile was 95 °C for 10 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and 62 °C for 30 s. Then, when PCR1 was positive, the objective was to differentiate strains of *V. splendidus*-related species from each other and identify the inoculated strain.

5. Genotyping of V. splendidus-related strains

A conventional PCR targeting the housekeeping genes *mreB* of *V. splendidus*-related strains (PCR2) was performed since it is the most discriminant gene for the identification of closely related strains among the *Splendidus* clade (Oden *et al.*, 2016); the primer pair for PCR2 was *mreB*-F 5'CTGGTGCTCGYGAGGTTTAC3' and *mreB*-R 5'CCRTTYTCTGAKATATCAGAAGC3′. For the conventional PCR, typical 25 µL reaction mixtures contained 12.5 µL of Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgium), 0.5 µL of each primer (20 µM), 9.5 µL of purified water and 2 µL of DNA template (replaced with 2 µL of purified water in the negative control). Conventional PCR amplifications were carried out in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, France) and the thermal program was as follows: 10 s at 95 °C; 30 cycles for 10 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, 40 s at 72 °C and a final extension of 3 min at 72 °C. PCR products were then analysed with QIAxcel® Advanced System (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sent to Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) to be purified and subsequently sequenced.

6. Phylogenetic analyses

The *mreB* sequences were aligned using a multiple sequence alignment Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE); phylogenetic analyses were performed in MEGA7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016) using the Neighbor Joining method (Tamura *et al.*, 2013) and the maximum composite likelihood model with a bootstrap of 1000 replications. Thus, the sequences of the *mreB* gene of *V. spendidus*-related strains from dead mussels could be compared with the sequences of the injected strains and with forty-seven different reference bacterial strains (whose forty-two belonging to the *Splendidus* clade; see *2.1.* in Oden *et al.* 2016). *Vibrio aestuarianus* 02/041, *Vibrio ordalii* 12B09 and *Vibrio penaeicida* AQ115, were provided from Genomic of *Vibrio* Research Department (CNRS Roscoff, France) and used as *Splendidus* clade outsiders.

7. Establishment of periods related to the annual life cycle of mussels

In order to estimate the role of physiological conditions of mussels in susceptibility to bacterial infections, 'periods' have been defined, related to the mussel cycle. The cycle of *M. edulis* in cold waters has been known for several years (Boromthanarat *et al*. , 1987; Gosling, 2003): gametogenesis begins in late summer and early autumn (Sept./Oct.), gonads are ripe and animals mature in early winter (Dec./Jan.). The emission of gametes in water occurs in late winter and early spring (Feb.-Apr.) and the resting stage begins in late spring and early summer (June). Thus, the following periods have been defined: from February to April = period A; from May to July = period B; from August to October = period C; from November to January = period D.

8. Statistical analyses

Statistical analyses and graphical representations were performed by using R software, version 3.5.1 and Microsoft Excel software, version 2016. The differences in mortality observed between (i) the conditions tested (negative control, C1 and C2) and (ii) the periods of the year, were tested using a Kruskal-Wallis test (K-W). When significance was obtained, a pairwise Wilcoxon test was done. The difference in virulence between S1 and S2 was tested by comparing two observed distributions with a chi-squared test of independence. To finish, the numbers of dead mussels observed for each origin were compared with a chi-squared goodness-of-fit test. The statistical analyses described above were carried out on the number of dead mussels found positive for the strain initially injected (S1- or S2-positive); except for the first test (which compared dead mussel counts among all conditions), the comparison was first made between all the dead mussels, then only with the S-positive. Regarding biometry data, normality was confirmed with a Shapiro test and an ANOVA was done. When results were significant, a *post-hoc* test (Tukey test) was performed. Statistical significance was accepted for $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$.

RESULTS

1. Bacterial inocula concentrations

The BL of all experiments performed with S1 and S2 are reported in Table 15. Mussels were inoculated with average bacterial loads equal to 2.69×10^7 CFU (S1_C1) and 2.69×10^4 CFU (S1_C2) for S1, and 2.23×10^7 CFU (S2_C1) and 2.23×10^4 CFU (S2_C2) for S2.

2. Overall obtained mortalities and strain-positive mussels

The numbers of infected mussels, dead mussels and strain-positive dead mussels obtained for each experimental infection are reported in Table 15. On all experimental infections made with S1, 1,300 mussels were inoculated with S1_C1 and 189 died (mean = 15; min = 0; max = 65), and 1,300 mussels were infected with S1_C2 and 26 died (mean = 2; min = 0; max = 10). On all bacterial challenges performed with S2, 900 mussels were inoculated with S2_C1 and 326 died (mean = 36; min = 0; max = 86), and 900 mussels were infected with S2_C2 and 19 died (mean = 2; min = 0; max = 11). On average over all experimentations, S1 was found in 48 % (90/189) of dead mussels in condition S1_C1 and in 4 % (1/26) in S1_C2, and S2 was found in 50 % (163/327) of dead mussels in condition S2_C1 and in 5 % (1/19) in S2_C2. None of the dead mussels in the negative controls (n = 15) were positive in S1 or S2. Figure 54 shows one of the phylogenetic analysis; in total, 255 *mreB* sequences were aligned over all these bacterial challenges.

Table 15 : Bacterial load of pure bacterial suspension (BL) used to make the dilutions used for each bacterial challenge, and number of infected mussels, total dead mussels and strain-positive dead mussels in each condition tested for every monthly experiment. S1: *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and S2: *Vibrio splendidus* 3G1_6; C1: dilution 1:10 (10-1) and C2: dilution 1:10,000 (10-4).

	BL (CFU mL^{-1})		***number of infected mussels / dead mussels / strain-positive dead mussels***				
Months	**S1**	**S2**	**S1_C1**	**S1_C2**	**S2_C1**	**S2_C2**	**Negative controls**
Apr 2017	7.22 x 10^8	NA[§]	100 / 18 / 15	100 / 0 / 0	NA[§]	NA	100 / 0 / 0
May 2017	2.50 x 10^9	NA	100 / 9 / 4	100 / 0 / 0	NA	NA	100 / 0 / 0
Jun 2017	5.64 x 10^8	NA	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0	NA	NA	100 / 4 / 0
Jul 2017	5.85 x 10^9	NA	100 / 1 / 0	100 / 0 / 0	NA	NA	100 / 1 / 0
Aug 2017	1.19 x 10^9	9.27 x 10^9	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0	100 / 16 / 9	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0
Sep 2017	3.09 x 10^9	1.41 x 10^9	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0	100 / 12 / 11	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0
Oct 2017	1.13 x 10^9	3.00 x 10^8	100 / 9 / 7	100 / 0 / 0	100 / 31 / 23	100 / 0 / 0	100 / 1 / 0
Nov 2017	6.27 x 10^9	4.27 x 10^9	100 / 2 / 2	100 / 0 / 0	100 / 4 / 4	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0
Dec 2017	5.18 x 10^8	2.82 x 10^9	100 / 5 / 0	100 / 2 / 0	100 / 0 / 0	100 / 1 / 0	100 / 4 / 0
Jan 2018	7.91 x 10^9	4.45 x 10^8	100 / 23 / 4	100 / 8 / 0	100 / 9 / 1	100 / 11 / 1	100 / 5 / 0
Feb 2018	8.73 x 10^9	4.09 x 10^8	100 / 39 / 18	100 / 3 / 0	100 / 86 / 34	100 / 3 / 0	100 / 4 / 0
Mar 2018	1.49 x 10^9	4.73 x 10^8	100 / 65 / 30	100 / 10 / 0	100 / 86/ 34	100 / 1 / 0	100 / 0 / 0
Apr 2018	6.36 x 10^8	6.36 x 10^8	100 / 18 / 10	100 / 3 / 1	100 / 82 / 47	100 / 3 / 0	100 / 1 / 0
	m[†] = 3.12 x 10^9 (± 3.00 x 10^9)	**m[†] = 2.23 x 10^9** (± 2.97 x 10^9)	**Σ[‡] = 1300 / 189 / 90**	**Σ = 1300 / 26 / 1**	**Σ = 900 / 326 / 163**	**Σ = 900 / 19 / 1**	**Σ = 1300 / 20 / 0**

[§] no data; [†] mean; [‡] sum

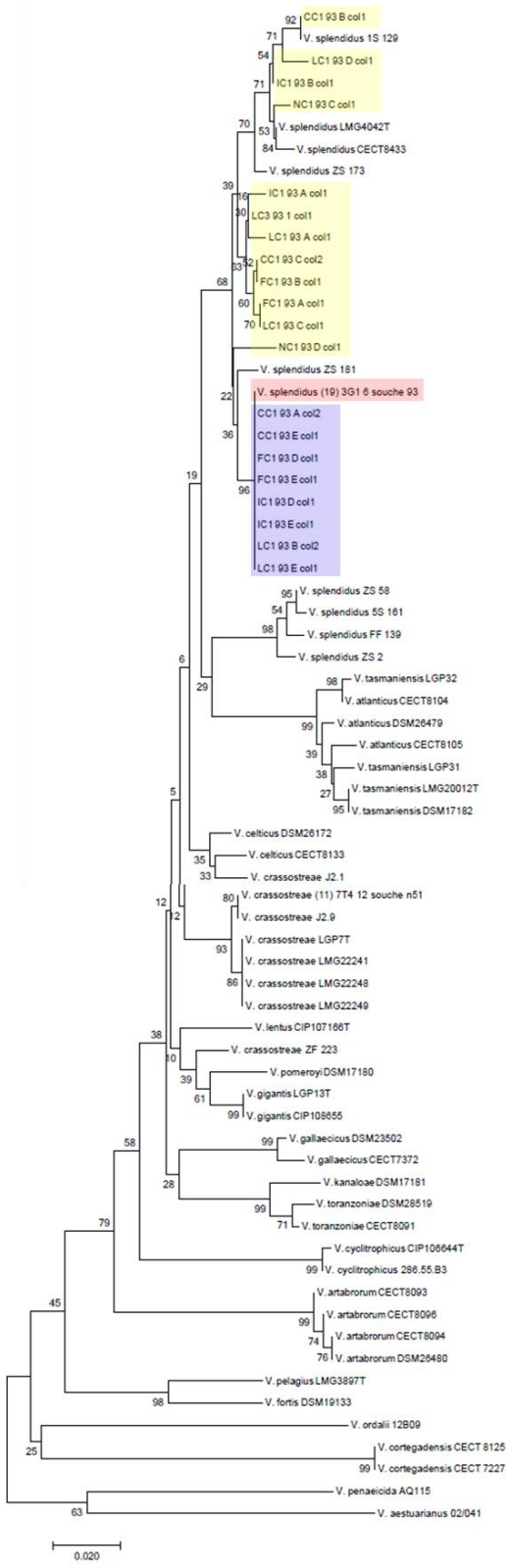


Figure 54: Phylogenic tree made from *mreB* sequences of *Vibrio spendidus*-related strains isolated during one of the experiments (color box) and forty-four different reference bacterial strains (Oden *et a*l., 2016); *Vibrio aestuarianus* 02/041 and *Vibrio penaeicida* AQ115, were provided by the Genomic of Vibrio Research Department (CNRS Roscoff, France) and used as Splendidus clade outsider. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap scores of 1000 replicates appear next to the corresponding branch (significant bootstrap score > 80). In color boxes, *mreB* sequences of (red box) *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2), (blue box) S2-positive dead mussels and (yellow box) S2-negative dead mussels.

Comparison of mortality by tested conditions (strains / loads)

The observed mortality between the tested conditions differed significantly (K-W, S1: p-value** = $2.7.10^{-5}$; S2: p-value** = $2.1.10^{-6}$). For S1 and S2, the mortality obtained at the highest concentration (C1) is significantly higher from the others (Wilcoxon test, S1: C1/C2 p-value* = 0.02 and C1/controls p-value** = 0.009; S2: C1/C2 p-value** = 0.007 and C1/controls p-value** = 0.0006). There was no difference between C2 and negative controls for both strains (positive to the strain or not).

Comparison of mortality by period

Figure 55 illustrates the obtained mortality with S1 (Figure 55A) and S2 (Figure 55B) at each month of each period at the highest concentration tested (C1). The obtained mortality differs according to the defined periods and therefore according to the life cycle of mussels (K-W, S1: p-value* = 0.04; S2: p-value* = 0.02). For S1, period A is significantly different from periods B, C and D (Wilcoxon test, p-values* < 0.05). For S2, there is no difference between period A and C (Wilcoxon test, p-value = 0.07) but significative difference exists between, A or C, and period D (Wilcoxon test, p-values* < 0.05). What is also quite remarkable in this figure is the percentage of S-pos dead mussels; over the period A, the percentage of S-pos dead mussels was on average < 50 % for S1 and S2 while for period C, it was ~ 75 % for S2.

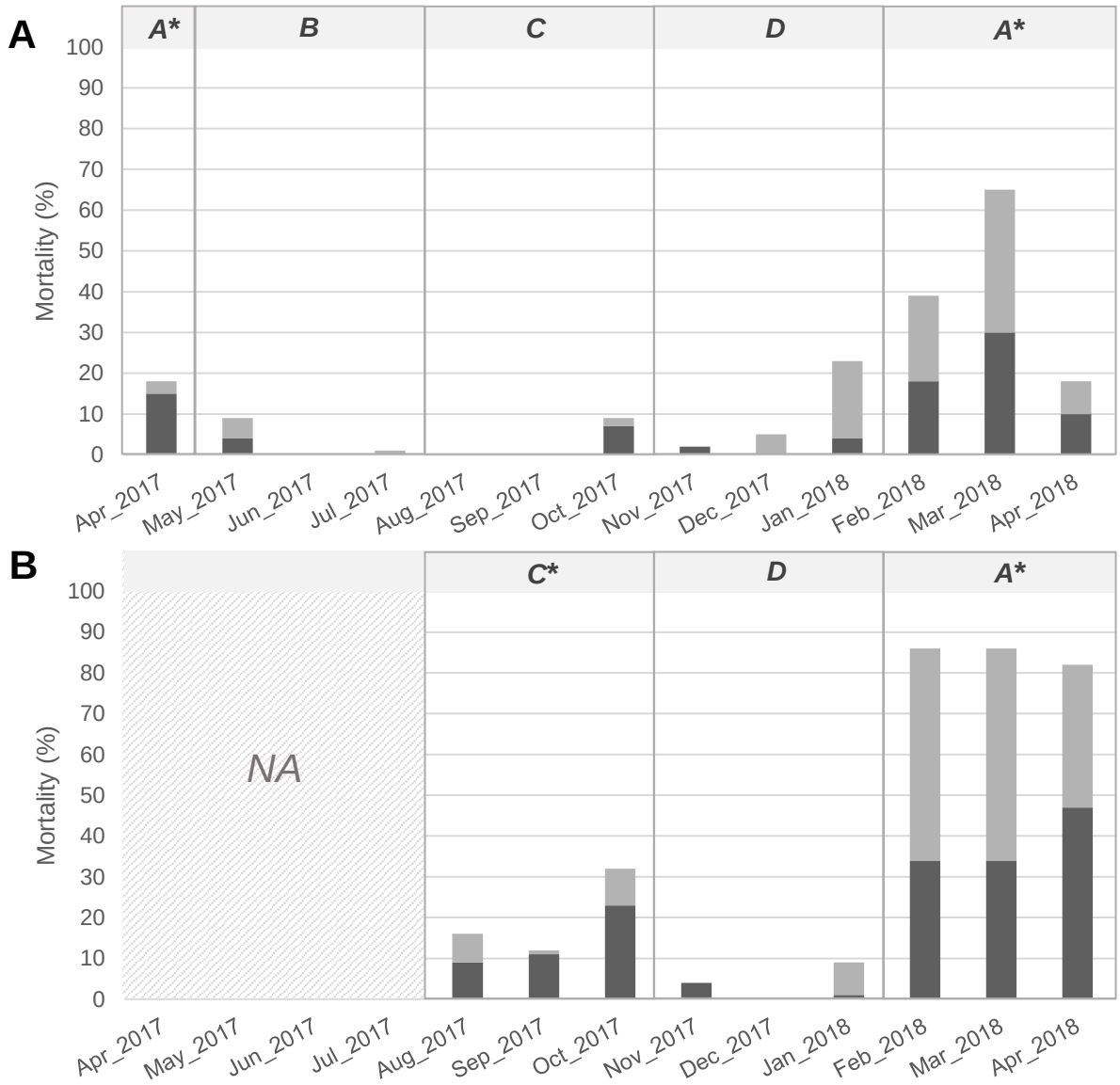


Figure 55: Mortality (%) observed in each monthly experiment at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}). A: experimental infection with *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (S1); B: experimental infection with *Vibrio splendidus* 3G1_6 (S2). Dark grey bars: S-positive dead mussels in injected strain; light grey bars: negative dead mussels in injected strain; grey bars (light & dark): 'all' dead mussels. At the top of the histograms are indicated the periods of the year (A, B, C and D) defined in 2.5. Kruskal-Wallis test and Wilcoxon test; p-value* < 0.05. NA: no data.

Comparison of the pathogenicity of the two strains over the common time interval

By comparing the numbers of dead mussels following infection by S1 and S2 over the common time interval, it appears that S2 was globally significantly more pathogenic than S1 (chi-squared = 68.25 > chi-squared$_{0.01}$ = 15.08, df = 5; p-value** < 0.01). When the obtained mortalities for each month are compared, it is notable that the mortalities caused by S2 are significantly higher in most months (Figure 56). Indeed, S2 caused mortality during period C

whereas S1 did not; moreover, it caused mortality over the entire period A whereas S1 caused significantly less, with a bell-shaped evolution during the period and, with a peak in March. However, despite the difference in pathogenicity, S1 and S2 both cause similar mortalities in March (S-positive dead mussels).

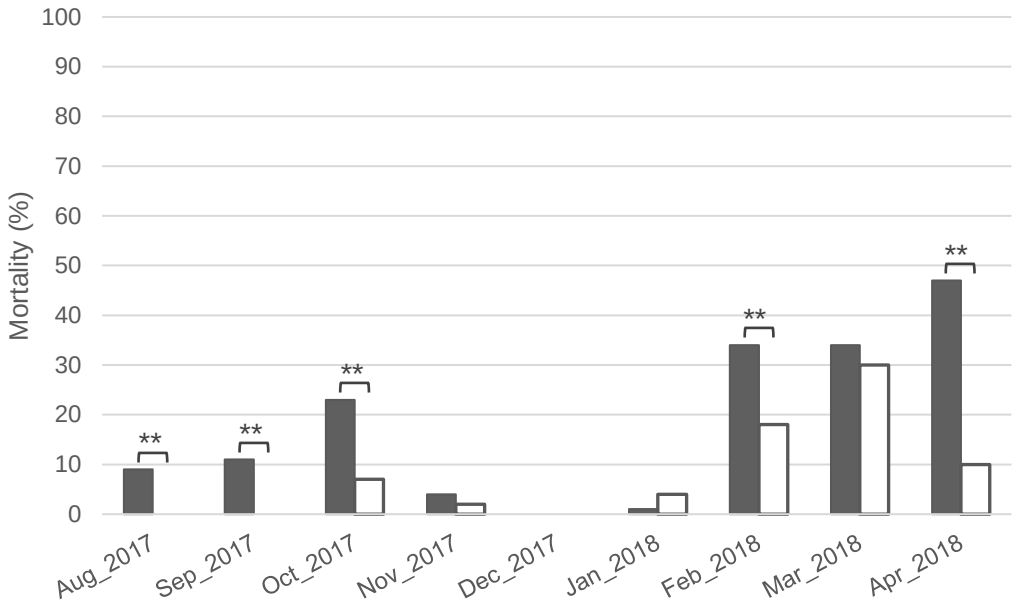


Figure 56: Comparison of mortalities obtained at each month with *Vibrio crassostreae* 7T4_12 (white bars) and *Vibrio splendidus* 3G1_6 (dark grey bars) at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}). Chi-squared test of independence; p-value** < 0.01.

Comparison of mortality depending on spat recruitment sites

Among all S1- or S2-positive dead mussels (n=253), 12 % were from ID (30/253), 19 % from LP (48/253), 22.5 % from Ch (57/253), 22.5 % from Fo (57/253) and 24 % from No (61/253) (Figure 57). The number of dead mussels originating from ID is significantly lower than the others (chi-squared = 13.87 > chi-squared$_{0.01}$ = 13.27, df = 4; p-value** < 0.01).

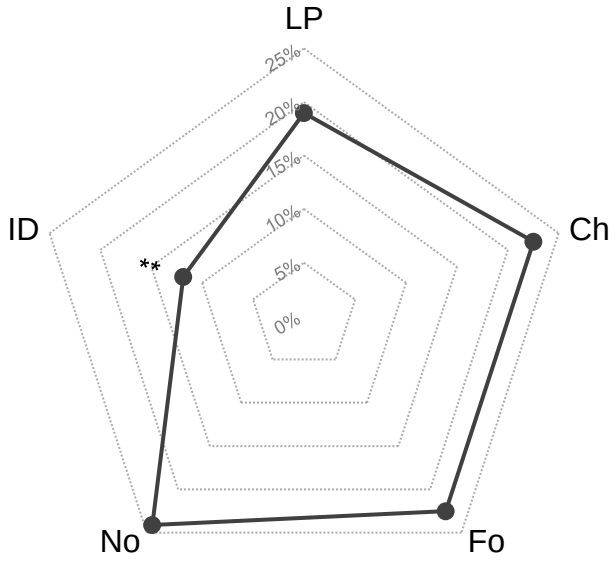


Figure 57: Proportion (%) of dead mussels on all experiments (all strains included) according to the origin of mussels. ID: Ile Dumet; LP: La-Plaine-sur-mer; Ch: Charron; Fo: Fouras; No: Noirmoutier. Chi-squared; p-value** < 0.01.

3. Biometry

Figure 58 shows the mean values (± SEM) of length and flesh weight of dead mussels according to their origin. Several differences appear between the biometric values of the mussels, but the most notable is for the mussels of ID. Overall, they were much larger and fleshier than the others. On the contrary, the mussels from LP were slightly smaller and less fleshy.

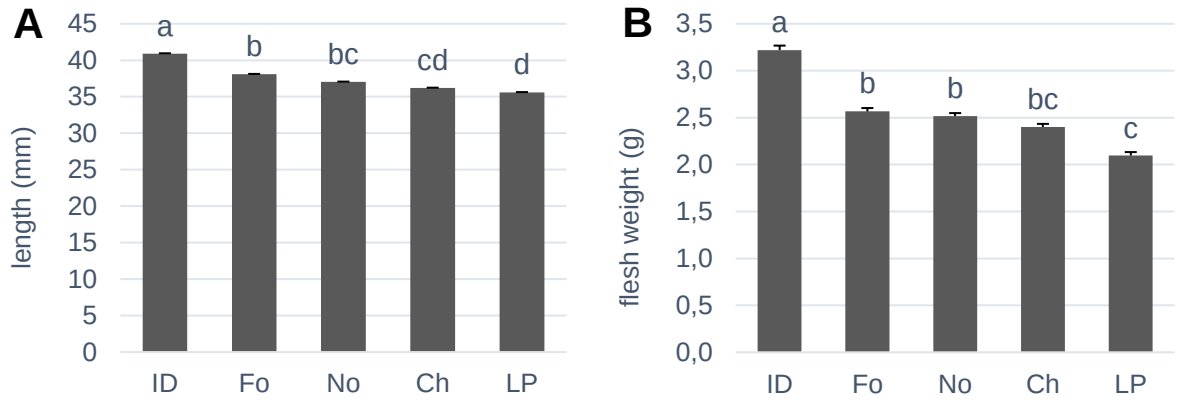


Figure 58: Comparison of the length (mm) (A) and flesh weight (g) (B) of dead mussels according to their origin. ID: Ile Dumet; LP: La-Plaine-sur-mer; Ch: Charron; Fo: Fouras; No: Noirmoutier. Values are means ± SEM. ANOVA, p-value** < 0.01 and Tukey's *post hoc* test. The similarity among the bars is emphasised through a letter system, placed above them; bars that do not share the same letter are significantly different.

4. Other observations

The parasite, *Mytilicola intestinalis*, was fortuitously found in the intestinal tract of some dead animals. Even though, the objective of the study was not to search for it, parasites easily visible to the naked eye (> 0.25 mm) were counted still; between one to five individuals were observed in more than a third of dead mussels. Also, less than 10 % of the mussels had their mantle full of macroscopically visible trematode sporocysts or metacercaria.

For experiments done during period A, an interesting phenomenon was observed. Just a few hours after injection, the mussels that have been infected at the highest concentration with S1 and S2, began to lay their gametes in water tank (Figure 59A&B). When spawning was observed, the water was immediately changed. However, this occurred several times during the first 2-3 days after infection. For dead mussels collected during this period, more than half had a mantle with some remnants of gametes not expelled (un-spawned gametes) (Figure 59C&D) or totally empty (like the valve on the right in Figure 59D).

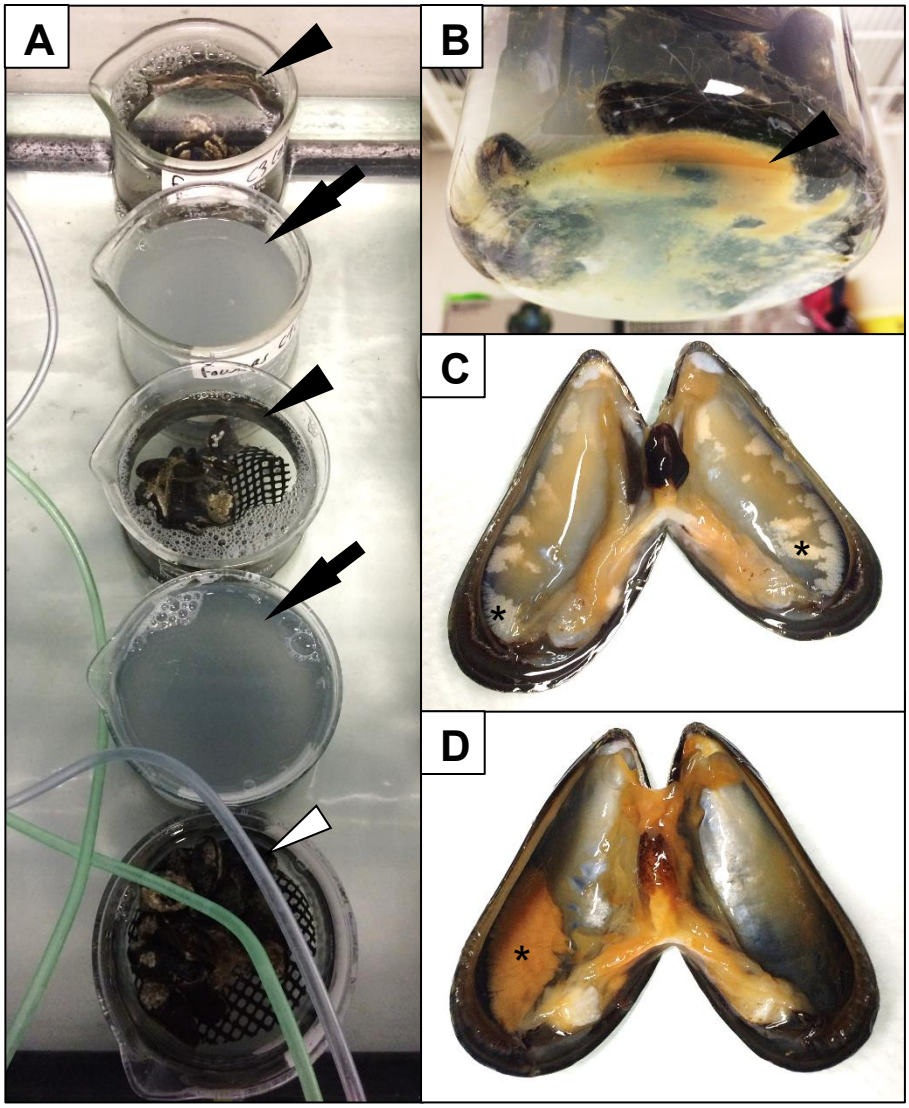


Figure 59: Spawning observed during experiments conducted through period A (Feb. to Apr.). (A) Male egg-laying in tanks where mussels were infected with both strains *Vibrio crassostreae* 7T4_12 and *Vibrio splendidus* 3G1_6 at the highest concentration (10^8 CFU mL^{-1}) (black arrows). No spawning in negative controls (white arrowhead), or in mussels infected with both strains at the lowest concentration (10^5 CFU mL^{-1}) (black arrowheads). (B) Female egg-laying sediment in tanks where mussels were infected with both strains at the highest concentration. Dead male (C) and female (D) mussel with remnants of gametes not expelled into the mantle (un-spawned gametes) (*).

DISCUSSION

1. Pathogenicity of V. crassostreae 7T4_12 and V. splendidus 3G1_6

Performing an enumeration to obtain the BL of bacterial suspension of each inoculum allowed to verify precisely the tested concentrations. By achieving the objective of testing bacterial concentrations consistent with those found in seawater or in mussel tissues (~ 10^4 CFU $animal^{-1}$; Eiler *et al.*, 2007; Garnier *et al.*, 2007; Pfeffer *et al.*, 2003), as well as high concentrations (~ 10^7 CFU $animal^{-1}$), different results were observed. Most of the experimental

infections performed on mussels (Parisi *et al.*, 2008; Tanguy *et al.*, 2013; Ben Cheikh *et al.*, 2016; Ben Cheikh, Travers & Le Foll, 2017) or oysters (Gay, Berthe & Le Roux, 2004; Garnier *et al.*, 2007; Travers *et al.*, 2017) were made by injections with high bacterial strain concentrations around $10^7/10^8$ CFU animal^{-1} which is quite far from those found in the field. On this point, Travers *et al.* (2017) mentioned that defining a strain as virulent through high concentration injections was a debatable issue. As for Goudenège *et al.* (2015), they determined three categories of strains as part of their high-throughput bacterial infections: virulent (> 50 % mortalities at 10^2 CFU animal^{-1}), non-virulent (< 50 % mortalities at 10^7 CFU animal^{-1}) and intermediate (*i.e.* pathogenic; an effect is observed only at 10^7 CFU animal^{-1}). They have thereby shown that a real virulent strain induces high mortality rates on oysters, even at very low concentrations (10^2 CFU animal^{-1}). The present study has indicated that even by intramuscular injection of a pure bacterial solution of S1 or S2 at 10^4 CFU animal^{-1}, there was no significant mortality whatever the time of the year. Thus, it is possible to affirm that these two strains are not virulent. In contrast, it appeared that, with a high concentration (10^7 CFU animal^{-1}), both strains were capable to cause significant mortalities (14.5 % in period C for S2, and in period A, 19.5 % and 38.5 % respectively for S1 and S2). According to the classification of Goudenège *et al.* (2015), these two strains could be defined as, at most, non-virulent or pathogenic; because it entirely depends on the time of year and that is part of what this study highlights. Indeed, these two strains could have wrongly been defined as pathogenic or non-pathogenic, depending on the period during which bacterial challenges were performed. In any case, it appeared that S2 was overall more pathogenic than S1 at 10^7 CFU animal^{-1} because it caused significantly more mortality. Besides, S2 caused mortality at a time when S1 caused almost none (period C), and the mortalities observed during this period appear to be actually due to S2 insofar as it is found in three out of four mussels. Indeed, to verify the presence of the inoculated strain seems to be also an important detail to check. During period A –more particularly in March– similar mortalities were obtained with S1- and S2-pos mussels and the injected strains were absent in more than half of the total of dead mussels (over the period A, only 58 out of 122 mussels were S1-pos and only 115 out of 254 mussels were S2-pos); however, higher mortalities were observed with S2 during period A. It can be hypothesized that, in order to disrupt the animal at this vulnerable period, the injected bacteria did not necessarily need to get the upper hand, compared to other commensal bacteria, as during less sensitive periods such as period C. Therefore, if the presence of bacteria had not been investigated, and the experiments had only been carried out at that time of the year, the strains would have been wrongly defined as very pathogenic.

2. Influence of the annual life cycle during a bacterial challenge

In this study, the observation of forced egg laying following bacterial challenges suggests that the physiological condition of mussels plays a decisive role in the observed mortality. Carrying out the same bacterial challenges monthly over several months made it possible to study and compare mussel response to the same bacterial challenges, in the same laboratory conditions, and thus to evaluate the role of the physiological status of the host. These experimentations showed that there was a seasonality in mortality caused by the bacteria pointing out a link between sensitivity to infection and the annual cycle of mussels. The annual cycle of cold-water mussels includes several stages: growth, ripening of gametes, spawning, and gonad redevelopment; this cycle is adjusted according to environmental conditions (temperature and food supply mostly; Gosling, 2003). During summer, gonadal reserves are accumulated and once the minimum level is reached, the gametes development starts –usually in October–, it continues throughout the winter months and, in February, the gonads are ripe. At that point, mussels are ready to spawn waiting for natural exogenous factors (rise in water temperature, salinity change, etc.). Nevertheless, under laboratory conditions, spawn could be induced by a temperature shock or a physical stimulation –like scraping the shell or pulling the byssus threads (Gosling, 2003; Seed & Suchanek, 1992). This study showed that the inoculation of a high bacterial load constitutes a stress strong enough to induce spawning in mussels that are in an advanced state of maturation or ripe (period A) and no matter what strain used. Soletchnik *et al.* (1999) described this physiological condition as one of the major factors in the numerous mortality episodes observed in oysters and in mass mortality episodes of French mussels in 2014 and 2015 (Soletchnik & Robert, 2016). Spawning is an energy demanding process during which mussels are in poor condition with low glycogen content (depleted reserves) which makes them particularly vulnerable to stressful environmental conditions (Bayne *et al.*, 1980; Bayne & Worrall, 1980; Najdek & Sapunar, 1987; Myrand *et al.*, 2000). The results observed here are consistent with these studies. Indeed, the high mortalities obtained during period A were the outcome of global weakness of mussels – that accompanies this triggering of spawning– and the inoculation of a high concentration of pathogenic bacteria. It is even more obvious because, as for S1, no mortality has been observed during other periods. Inoculation induced significant stress that triggered spawning; it is then possible to wonder: if the nature of the stress had been different (*e.g*. chemical contaminant spill or toxic algae bloom), would the spawning have been triggered and what would have been the result on the observed mortality rates? Nevertheless, in the case of S2, the strain seems to have increased mortality more strongly during this period than for S1, but as showed above, S2 caused mortality during period C while S1 did not. This is interesting because this post-spawning period corresponds to the sexual rest during which glycogen

content is improved and is accumulated as an energetic reserves (Bayne & Worrall, 1980); it shows that mussels remain sensitive during this period and this is also what Myrand *et al.* (2000) observed in their analysis of the link between reproduction and summer mortality in Québec mussels. On the other hand, period D appears to be the interval when mussels are more robust since no significant mortality has occurred. During this period, energy reserves are usually used to meet the energy needs of gametogenesis and in December, mussels are full –mature– with gonads that occupy all the space, without being ready or able to spawn. The lack of observed mortality suggests that they have accumulated enough energy to fight against and deal with high infection. It seems that this time of the year is the most appropriate time to test a strain for virulence or pathogenicity; indeed, if strain causes mortality at that moment, then it will cause probably more at another time.

3. Mortality according to original spat recruitment site

Moving forward in the study, it became very clear that the mussels from ID were different from the others. They were larger, fleshier and died significantly less than the others as a result of bacterial challenge. However, all the mussels were the same age and had the same living conditions over three quarters of their lifespan since they had been on '*bouchot'* during the same time (~ the last 18 months at the beginning of the study); only the recruitment site and the first five months of farming method varied. Despite these more than 18 months of identical life, the mussels from ID were significantly bigger and more robust. Thus, two hypotheses to explain their robustness can be proposed: it would either come from (i) the morphology of the mussels, influenced by the farming method used during the first months; or from (ii) the genetic inheritance of the mussels, influenced by the genetic characteristics of the natural local population; or perhaps from a combination of both factors.

Mussel growth is mainly influenced by food availability (Gosling, 1992) and the longlines farming method –with continuous immersion– allows mussels to have access to trophic resources without interruption. Mussels grown on longlines have higher growth performance than mussels grown on '*bouchot'* (Prou & Goulletquer, 2002); and this is what was observed for the ID mussels which were larger from the beginning to the end of the study. As described above, the life cycle of mussels is very energy-intensive, so larger individuals have logically more glycogen reserves, which probably allows them to have a negative energy balance later than others.

Several authors have compared the growth rates and the mortality of mussels by transferring samples from different natural populations in the same growing areas (Dickie, Boudreau & Freeman, 1984; Mallet, Freeman & Dickie, 1986; Mallet *et al.*, 1987; Fuentes *et al.*, 1994). These studies have demonstrated that survival capacities of mussels –and so variations in mortality– could be attributed to different origins (source of mussel stocks). Mallet and Haley

(1984) indicated that mortality variation from one origin to another evidences the differences between populations of *M. edulis*; this is also what Dickie *et al.* (1984) observed thanks to the significant differences in genetic constitution among the stock used in their experiments. Following this, Mallet *et al.* (1986) showed that viability is highly heritable in *M. edulis* populations and, very recently, Dégremont *et al.* (2019) revealed that selected populations of French *M. edulis* were significantly more resistant to mortality outbreaks than natural unselected populations. *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* are native species to the French coast, and numerous different natural populations exists and are capable to hybridise with each other. Thus, the Atlantic coasts of France is very complex –in terms of genetic structure– with several mosaic hybrid zone between *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (Bierne *et al.*, 2003; Riquet, Simon & Bierne, 2017). It is therefore possible that some natural French populations could be more resistant than others.

Snieszko (1974) wrote 'an overt infectious disease occurs when a susceptible host is exposed to a virulent pathogen under proper environmental conditions' which means that three elements –pathogen, environment, and status of the host– strongly interact in the disease. In some cases, only two unfavourable elements seem sufficient to provoke mortality (Garnier *et al.*, 2007). This fact was observed in this study since the experiments were conducted under the same laboratory conditions. What could be added to Snieszo's quote is that within the host itself, many parameters –physiological state, morphology, and probably genetic inheritance– can influence the host's response to the disease.

Overall, the results provide information on the mortalities observed in mussels, *M. edulis*, over the annual life cycle, in response to bacterial stress. To our knowledge, this is the first study to test the pathogenicity of *V. splendidus*-related strains at concentrations close to what is found in the wild, over the entire annual cycle of mussels, and considering their origin. The results demonstrate that these two strains are not virulent for mussels and that the mortalities obtained during *in vivo* bacterial challenges are distinct depending on the physiological state of mussels –reliant on the time of the year–, and on the recruitment origin of the spat. Thus, to test the virulence or the pathogenicity of a bacterial strain on mussels, it seems consistent to consider the origin of the population and the state of maturity of mussels and thereby, avoid bacterial challenges during the spawning period of the mussels because this is not strictly representative of the pathogenicity of the strain.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ifremer and Dr. F. Le Roux (Genomic of *Vibrio*-Station Biologique de Roscoff) for giving us *Vibrio* spp. strains, Patrick Céron for making of the map and Dr. D'Rego for the proofreading of English. The Regional Shellfish Committee of Normandy/North Sea (CRC Normandie-Mer du Nord) and the laboratory LABÉO financially supported this study. Maud Charles received co-funding from the Normandy region and from the laboratory LABÉO Frank Duncombe.

No conflict of interest declared.

The authors confirm that one part of the data supporting the findings of this study is available within the article and the other part is available on request from the corresponding author.

REFERENCES

AFNOR (2007). *NF EN ISO 7218 : Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations*.

Allain G & Bernard I (2016). *Les mortalités de moules en 2014 et 2015 vues par les professionnels. Compte-rendu de la phase 1 : synthèse sur l'émergence, la propagation et l'installation des mortalités*. Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne Nord.

Barbieri E, Falzano L, Fiorentini C, Pianetti A, Baffone W, Fabbri A, Matarrese P, Casiere A, Katouli M, Kühn I, Möllby R, Bruscolini F & Donelli G (1999). Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. *Appl Environ Microbiol* **65,** 2748–2753.

Barbosa-Solomieu V, Renault T & Travers M-A (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* **131,** 2–10. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.011

Bayne B, Brown D, Harrisson F & Yevich P (1980). Mussel health. In *The International Mussel Watch*, US National Academy of Science., pp. 163–235. E. D. Goldberg, Washington DC.

Bayne B & Worrall C (1980). Growth and Production of Mussels *Mytilus edulis* from Two Populations. *Mar Ecol Prog Ser* **3,** 317–328. doi: 10.3354/meps003317

Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde JL & Figueras MJ (2010). Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ Microbiol Rep* **2,** 34–43. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x

Béchemin C et al. (2014). *Surmortalités de la moule bleue Mytilus edulis dans les Pertuis Charentais* (mars 2014). Ifremer. Available at: http://archimer.ifremer.fr/doc/00229/34022/32387.pdf [Accessed December 19, 2016].

Béchemin C, Soletchnik P, Polsenaere P, Le Moine O, Pernet F, Protat M, Fuhrmann M, Quéré C, Goulitquer S, Corporeau C & others (2015). Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais. *Bull Épidémiologie Santé Anim Aliment,* 6–9. Available at: http://archimer.ifremer.fr/doc/00312/42343/ [Accessed December 19, 2016].

Ben Cheikh Y, Travers M-A & Le Foll F (2017). Infection dynamics of a *V. splendidus* strain pathogenic to *Mytilus edulis* : *In vivo* and *in vitro* interactions with hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **70,** 515–523. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.047

Ben Cheikh Y, Travers M-A, Morga B, Godfrin Y, Rioult D & Le Foll F (2016). First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Dev Comp Immunol* **57,** 107–119. doi: 10.1016/j.dci.2015.12.014

Bierne N, Borsa P, Daguin C, Jollivet D, Viard F, Bonhomme F & David P (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mol Ecol* **12,** 447–461. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x

Boromthanarat S, Deslous-Paoli JM & Heral M (1987). Reproduction et recrutement de *Mytilus edulis* L. cultivée sur les bouchots du bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis* **16,** 317–326. Available at: https://archimer.ifremer.fr/doc/1987/publication-2865.pdf [Accessed May 31, 2019].

Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivesse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF & Le Roux F (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* **11,** 1043–1052. doi: 10.1038/ismej.2016.162

Cochennec-Laureau N, Schapira M, Bouget J-F, Manach S, Retho M, Le Merrer Y, Schmitt A, Pierre-Duplessix O, Gabellec R, Normand J & Combette A (2018). *Expertise sur le contexte hydro-climatologique de la baie de Pénestin pour décrire les conditions physio-chimiques environnementales et l'impact possible sur les mortalités de moules.* Ifremer, DDTM 56, DML, SAMEL, Unité Cultures Marines.

Colwell RR, Kaper J & Joseph SW (1977). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Other *Vibrio*s: Occurrence and Distribution in Chesapeak Bay. *Science* **198,** 394–396. doi: 10.1126/science.910135

Dégremont L, Maurouard E, Rabiller M & Glize P (2019). Response to selection for increasing resistance to the spring mortality outbreaks in *Mytilus edulis* occurring in France since 2014. *Aquaculture* **511,** 734269. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734269

Dickie LM, Boudreau PR & Freeman KR (1984). Influences of Stock and Site on Growth and Mortality in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Can J Fish Aquat Sci* **41,** 134–140. doi: 10.1139/f84-013

Eggermont M, Bossier P, Pande GSJ, Delahaut V, Rayhan AMd, Gupta N, Islam SS, Yumo E, Nevejan N, Sorgeloos P, Gomez-Gil B & Defoirdt T (2017). Isolation of *Vibrio*naceae from wild blue mussel (*Mytilus edulis*) adults and their impact on blue mussel larviculture. *FEMS Microbiol Ecol* **93,** 11. doi: 10.1093/femsec/fix039

Eggermont M, Tamanji A, Nevejan N, Bossier P, Sorgeloos P & Defoirdt T (2014). Stimulation of heterotrophic bacteria associated with wild-caught blue mussel (*Mytilus edulis*) adults results in mass mortality. *Aquaculture* **431,** 136–138. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.014

Eiler A, Gonzalez-Rey C, Allen S & Bertilsson S (2007). Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiol Ecol* **60,** 411–418. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00303.x

FAO (2016). Demand for European mussels within the EU on the decline. In *GLOBEFISH - Information and analysis on world fish trade*. http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/450826/. Available at: http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/450826/. [Accessed May 21, 2019].

FAO (2018). Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series. In *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. http://www.fao.org/fishery/. Available at: http://www.fao.org/fishery/. [Accessed May 21, 2019].

François C, Garcia C, Lupo C, Travers MA, Morga B, Tourbiez D, Faury N, Haffner P, Serpin D, Dubreuil C, Chollet B, Baillon L, Lapègue S & Renault T (2015). *Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*. Ifremer. Available at: http://archimer.ifremer.fr/doc/00256/36691/ [Accessed December 19, 2016].

Fuentes J, Reyero I, Zapata C & Alvarez G (1994). Production traits of the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW of Spain): relative effects of source of seed and growing environment. *Aquaculture* **122,** 19–31.

Gaitán-Espitia JD, Quintero-Galvis JF, Mesas A & D'Elía G (2016). Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorphia): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Sci Rep* **6**, 26853. doi: 10.1038/srep26853.

Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M & Nicolas J-L (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* **53,** 187–196. doi: 10.1007/s00248-006-9061-9

Gay M, Berthe F & Le Roux F (2004). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* **59,** 49–56. doi: 10.3354/dao059049

Glize P & Gourmelen G (2018). *Suivi de la mortalité de populations de moules en Pays de la Loire : Programme TESCOR 2*. SMIDAP & CRC des Pays de la Loire. Available at: https://www.smidap.fr/Table/Actualites/. [Accessed May 24, 2016].

Gosling E (1992). *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, Elsevier Science. E. Gosling, Amsterdam. ISBN: 0-444-88752-0

Gosling E (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, Fishing News Books. E. Gosling, Oxford. ISBN: 978-0-85238-234-9

Goudenège D, Travers MA, Lemire A, Petton B, Haffner P, Labreuche Y, Tourbiez D, Mangenot S, Calteau A, Mazel D, Nicolas JL, Jacq A & Le roux F (2015). A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters: Comparative genomics of *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* **17,** 4189–4199. doi: 10.1111/1462-2920.12699

Goulletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N & Taillade S (1998). Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). In *ICES Mariculture Committee CM1998/CC:14 Theme Session: Population Biology*, pp. 14–21. Available at: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.334.3103&rep=rep1&type=pdf [Accessed June 25, 2019].

Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33,** 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054

Lemire A, Goudenège D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y & Le Roux F (2015). Populations, not clones, are the unit of *vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* **9,** 1523–1531. doi: 10.1038/ismej.2014.233

Lupo C et al. (2019). *Revue systématique de la littérature relative aux facteurs de risque de mortalité des moules exploitées en France*. Ifremer / ANSES. Available at: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02087720/. [Accessed May 24, 2019].

Macián MC, Garay E, González-Candelas F, Pujalte MJ & Aznar R (2000). Ribotyping of *Vibrio* Populations Associated with Cultured Oysters (*Ostrea edulis*). *Syst Appl Microbiol* **23,** 409–417. doi: 10.1016/S0723-2020(00)80072-7

Mallet AL, Carver CEA, Coffen SS & Freeman KR (1987). Mortality Variations in Natural Populations of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Can J Fish Aquat Sci* **44,** 1589–1594. doi: 10.1139/f87-192

Mallet AL, Freeman KR & Dickie LM (1986). The genetics of production characters in the blue mussel *Mytilus edulis*. I. A preliminary analysis. *Aquaculture* **57,** 133–140.

Mallet AL & Haley LE (1984). General and specific combining abilities of larval and juvenile growth and viability estimated from natural oyster populations. *Mar Biol* **81,** 53–59. doi: 10.1007/BF00397625

Myrand B, Guderley H & Himmelman JH (2000). Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar Ecol Prog Ser* **197,** 193–207. doi: 10.3354/meps197193

Najdek M & Sapunar J (1987). Total and methyl-mercury content in bivalves, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck and *Ostrea edulis* Linnaeus: Relationship of biochemical composition and body size. *Bull Environ Contam Toxicol* **39,** 56–62. doi: 10.1007/BF01691789

Nasfi H, Travers MA, de Lorgeril J, Habib C, Sannie T, Sorieul L, Gerard J, Avarre JC, Haffner P, Tourbiez D, Renault T, Furones D, Roque A, Pruzzo C, Cheslett D, Gdoura R & Vallaeys T (2015). A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. *World J Microbiol Biotechnol* **31,** 461–475. doi: 10.1007/s11274-015-1800-y

Oden E, Burioli EAV, Trancart S, Pitel PH & Houssin M (2016). Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus* sp. during mortality events. *Aquaculture* **464,** 420–427. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.024

Ortigosa M, Esteve C & Pujalte M-J (1989). *Vibrio* Species in Seawater and Mussels: Abundance and Numerical Taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **12,** 316–325. doi: 10.1016/S0723-2020(89)80080-3

Parisi M-G, Li H, Jouvet LBP, Dyrynda EA, Parrinello N, Cammarata M & Roch P (2008). Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol* **25,** 834–840. doi: 10.1016/j.fsi.2008.09.005

Peperzak L & Poelman M (2008). Mass mussel mortality in The Netherlands after a bloom of Phaeocystis globosa (prymnesiophyceae). *J Sea Res* **60,** 220–222. doi: 10.1016/j.seares.2008.06.001

Pfeffer CS, Hite MF & Oliver JD (2003). Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. *Appl Environ Microbiol* **69,** 3526–3531. doi: 10.1128/AEM.69.6.3526-3531.2003

Philipp EER, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, Schreiber S & Rosenstiel P (2012). Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLOS ONE* **7,** e33091. doi: 10.1371/journal.pone.0033091

Polsenaere P, Soletchnik P, Le Moine O, Gohin F, Robert S, Pépin J-F, Stanisière J-Y, Dumas F, Béchemin C & Goulletquer P (2017). Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *J Sea Res* **123,** 39–50. doi: 10.1016/j.seares.2017.03.005

Prou JM & Goulletquer P (2002). The French Mussel Industry: Present Status and Perspectives. *Bull Aquac Assoc Can* **103,** 17–23.

Riquet F, Simon A & Bierne N (2017). Weird genotypes? Don't discard them, transmissible cancer could be an explanation. *Evol Appl* **10,** 140–145. doi: 10.1111/eva.12439

Romero A, Costa M, Forn-Cuni G, Balseiro P, Chamorro R, Dios S, Figueras A & Novoa B (2014). Occurrence, seasonality and infectivity of *Vibrio strains* in natural populations of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Dis Aquat Organ* **108,** 149–163. doi: 10.3354/dao02701

Seed R & Suchanek TH (1992). Population and community ecology of *Mytilus*. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, Elsevier Science., Developments in aquaculture and fisheries science, pp. 87–169. E. Gosling, Amsterdam. ISBN: 0-444-88752-0

Snieszko SF (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *J Fish Biol* **6,** 197–208. doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x

Soletchnik P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P & Goulletquer P (1999). Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat Living Resour* **12,** 131–143. Available at: https://archimer.ifremer.fr/doc/1999/publication-862.pdf [Accessed July 8, 2019].

Soletchnik P & Robert S (2016). *Eléments de connaissance sur la mortalité et la reproduction de la moule bleue (Mytilus edulis) sur la façade atlantique*. Ifremer. Available at: https://archimer.ifremer.fr/doc/00345/45634/45263.pdf [Accessed February 12, 2017].

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30,** 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger J-M & Siah A (2013). Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **39,** 419–429. doi: 10.1016/j.dci.2012.10.015

Travers M-A, Boettcher Miller K, Roque A & Friedman CS (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* **131,** 11–31. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.010

Travers M-A, Pepin J-F, Soletchnik P, Guesdon S & Le Moine O (2016). *Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais – MORBLEU*. Ifremer. Available at: http://archimer.ifremer.fr/doc/00324/43539/ [Accessed December 19, 2016].

Travers M-A, Tourbiez D, Parizadeh L, Haffner P, Kozic-Djellouli A, Aboubaker M, Koken M, Dégremont L & Lupo C (2017). Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* **48**:32. doi: 10.1186/s13567-017-0438-1.

Tsuchiya M (1983). Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis* L. caused by high temperature on rocky shores. *J Exp Mar Biol Ecol* **66,** 101–111. doi: 10.1016/0022-0981(83)90032-1

Venier P, Varotto L, Rosani U, Millino C, Celegato B, Bernante F, Lanfranchi G, Novoa B, Roch P, Figueras A & Pallavicini A (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* **12,** 69. doi: 10.1186/1471-2164-12-69

2. Données supplémentaires[97]

a. Autres observations

Dans la section « *Other observations* » de l'Article 2 (p. 182), il est mentionné que plus de 30 % des individus morts étaient parasités par 1 à 5 parasites copépodes appartenant à l'espèce *M. intestinalis*. Aussi, comme décrit dans la partie II.4.a. (p. 62), les moules peuvent être infestées par *M. intestinalis* et/ou par *M. orientalis* (Bower, 2009a) ; ainsi la détermination de l'espèce de *Mytilicola* a été rendue possible grâce à l'observation sous loupe binoculaire des critères morphologiques décrits par Goedknegt *et al.* (2018). Comme illustré dans la Figure 60, les protubérances thoraciques dorsolatérales sont repliées vers l'intérieur ce qui est un critère de différenciation de l'espèce *M. intestinalis* (à la différence de *M. orientalis* chez qui elles sont étendues vers l'extérieur).

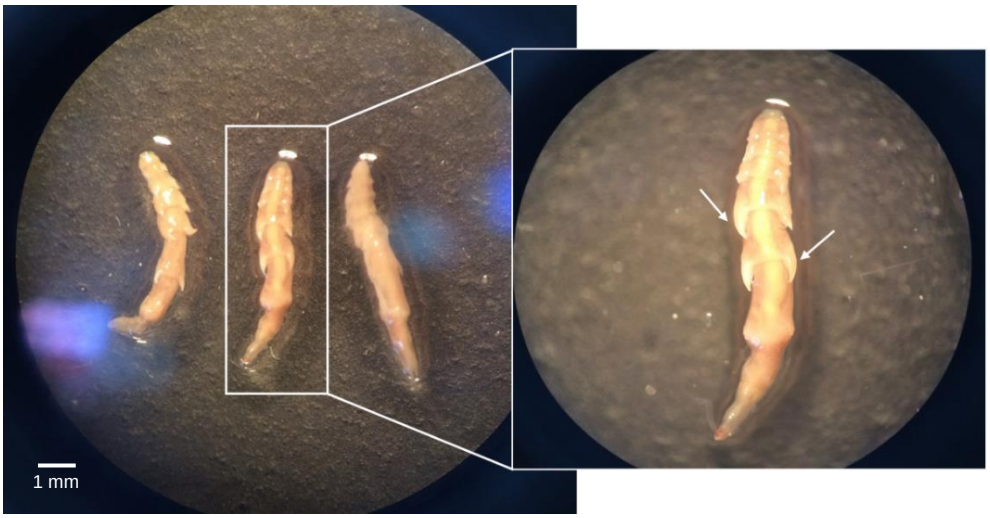


Figure 60 : Parasites copépodes appartenant à l'espèce *Mytilicola intestinalis* retrouvés dans certaines moules mortes durant les expérimentations d'infections expérimentales.

Il est également indiqué qu'environ 10 % des moules étaient fortement parasitées par des sporocystes et des métacercaires de trématodes, c'est ce qu'illustre la Figure 61. La Figure 61A est très similaire aux observations faites par Le Breton & Lubet (1992) sur des moules de l'ouest du Cotentin parasitées par *P. maculatus*. Les moules ont un manteau exsangue, fin, dépourvu de réserve, de cellule germinale ou de gamète et de petites filaments blancs y sont visibles. C'est également ce qu'ont observé Markowitz *et al.* (2016) dans le manteau de *M. edulis* de la côte est des Etats-Unis (voir Figure 25, p.66). Ces derniers ont

[97] Cette section apporte des informations plus détaillées par rapport aux résultats décrits dans l'Article 2.

également observé des petites vésicules orangées qu'ils ont identifiées comme étant soit des sporocystes encapsulés de *P. maculatus* (Markowitz *et al.*, 2016a), soit le stade métacercaire de *H. quissetensis* et ont, dans ce cas, défini une double infestation par deux espèces de trématodes (Markowitz *et al.*, 2016b). Il apparait donc que quelle que soit l'espèce, deux stades différents du cycle ont été observés dans ces moules.

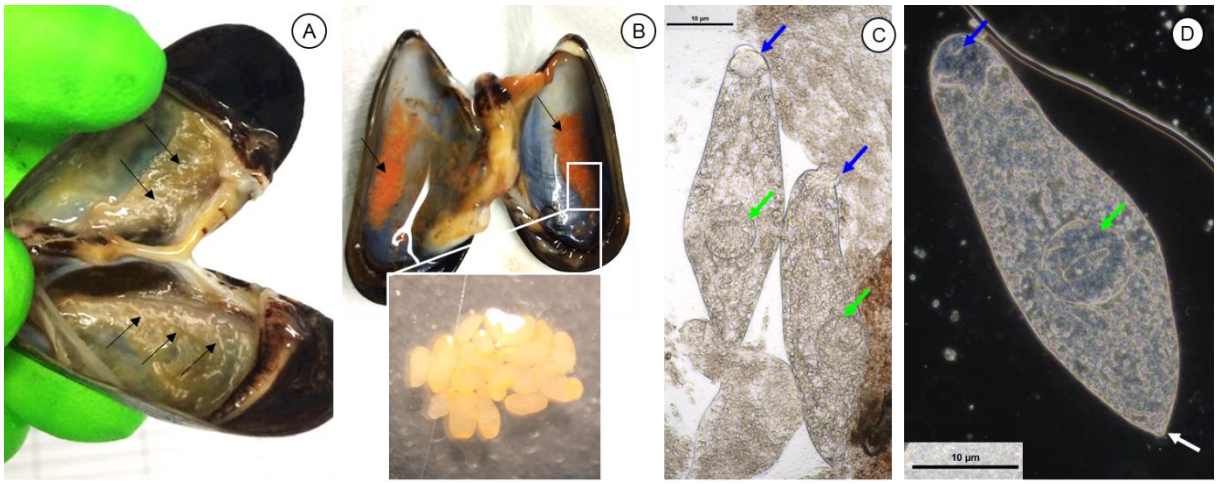


Figure 61 : Moules parasitées par des sporocystes de trématodes digénétiques au niveau des branchies (A) et des métacercaires et/ou rédies au niveau du manteau (B). Observations des « sacs » orangés à la loupe binoculaire (C et D) avec la ventouse orale (flèche bleue), l'*acetabulum* ou ventouse ventrale (flèche verte) et le pore excréteur (flèche blanche) particulièrement bien visibles.

b. Caractéristiques des souches testées

Les deux souches bactériennes utilisées pour réaliser ces infections expérimentales ont été analysées avec les deux PCR développées sur les gènes de virulence, précédemment décrites dans la Partie 1A (section III.2.ii., p. 136 &, Fiche technique n°4, p. 257). Les deux souches possèdent le locus *R5.7* et la souche de *V. splendidus* possède également le locus *rtxA*. De plus, la souche *V. crassostreae* 7T4_12 possède le plasmide de virulence pGV1512 (Bruto *et al.,* 2017 ; Maxime Bruto, com. pers., septembre 2019).

IV. Discussion, conclusions et perspectives

Les travaux réalisés dans cette Partie 2 ont permis de déterminer le niveau de pathogénicité de deux souches isolées en 2014 dans un site fortement touché par les mortalités, et d'évaluer l'influence du cycle de vie annuel et de l'origine des moules sur leur sensibilité lors d'un stress bactérien. Il apparait clairement qu'au-delà de la souche bactérienne utilisée, il existe au sein même de l'hôte, plusieurs paramètres qui influent sur sa réponse.

D'abord, la période de reproduction se révèle être une phase cruciale pendant laquelle les animaux sont particulièrement sensibles et fragiles. En effet, en plus de provoquer des mortalités significatives, l'injection d'une charge bactérienne élevée a provoqué le déclenchement de la ponte. Plusieurs auteurs avaient déjà mis en évidence une induction forcée de la ponte en laboratoire *via* des chocs thermiques ou une action mécanique (en grattant la coquille ou en tirant sur le byssus) (Seed & Suchanek, 1992 ; Gosling, 2003) ; ces actions, quelle qu'en soit la nature, visent à mimer des actions qui se produisent dans l'environnement et qui déclenchent naturellement la ponte (élévation de la température au printemps, giboulées de mars avec des brassages importants des eaux qui ballottent les moules). Ici, le déclenchement de la ponte chez les moules matures est apparu comme étant la conséquence du stress bactérien infligé ; de ce fait, il est alors possible de se demander si cela aurait pu se produire dans l'environnement, dans un contexte d'efflorescences bactériennes. Quoiqu'il en soit, les pourcentages de mortalité obtenus à cette période, associés à ce phénomène, indiquent très nettement que les animaux étaient incapables de se défendre contre les charges bactériennes inoculées alors qu'ils le sont totalement à d'autres périodes de l'année. Parallèlement, les moules matures infectées avec une concentration plus faible ne semblaient pas être perturbées, et ce, quelle que soit la souche utilisée. Ainsi, cela va dans le sens des observations faites par Soletchnik *et al.* (1999) sur les huîtres, et par Soletchnik et Robert (2016) sur les moules, qui indiquaient que cet état physiologique est l'un des facteurs majeurs impliqués dans les épisodes de mortalité.

Ensuite, en ce qui concerne les souches en elles-mêmes, elles ont toutes deux causé des mortalités importantes lorsque l'émission de gamètes était constatée ; ceci est d'ailleurs plus spécifiquement remarquable pour *V. crassostreae* 7T4_12 dans la mesure où ce sont les seules mortalités observées. En revanche, la souche *V. splendidus* 3G1_6 a également provoqué des mortalités modérées hors période de reproduction, pendant la période de repos et de restructuration des réserves. *A contrario*, elle n'a engendré aucune mortalité pendant la période de gamétogénèse montrant ainsi une meilleure capacité des animaux à se défendre à cette période de l'année. Naturellement, le fait de ne pas avoir de données pour la période B (mai-juillet) pour *V. splendidus* 3G1_6 est regrettable ; il aurait, en effet, été utile de connaitre la sensibilité des animaux à ce moment de l'année correspondant à la période de post-ponte. D'une manière générale, les résultats démontrent que ces deux souches ne sont pas virulentes pour les moules puisqu'elles ne provoquent pas de mortalité significativement différente de celle des témoins à une charge bactérienne faible. En effet, une bactérie réellement virulente cause des mortalités significatives à partir de 10^2 /10^3 UFC/animal (Goudenège *et al.*, 2015 ; Kawahara *et al.*, 2019). Juger de la pathogénicité d'une souche testée, par injection et pendant la période de reproduction, apparait donc discutable ; toutefois, en induisant des mortalités en

dehors de cette période, *V. splendidus* 3G1_6 apparait plus pathogène que *V. crassostreae* 7T4_12. Par conséquent, la présence du plasmide pGV1512 chez *V. crassostreae* 7T4_12 n'apparait pas être déterminant dans la virulence envers les moules, de même que la présence des gènes *R5.7* et *rtxA chez V. splendidus* 3G1_6 ne semble pas présager du caractère virulent *stricto sensu* de la souche pour les moules ; cependant, elle peut probablement donner une indication sur la pathogénicité dans le cas de *V. splendidus*. Néanmoins, cela mérite d'être confirmé par d'autres infections expérimentales réalisées sur les moules avec d'autres souches de *V. splendidus* porteuses et non porteuses des deux gènes. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer le caractère pathogène des souches porteuses pour les moules. Aussi, il serait intéressant de réaliser des co-infections avec plusieurs souches porteuses, plusieurs souches non porteuses et un mélange des deux afin d'estimer l'interaction qu'il pourrait y avoir entre les souches, qu'elles portent les gènes ou non. Car en effet, la virulence semble également dépendre des interactions entre les différentes espèces présentes au sein du microbiome (Le Roux *et al.*, 2015 ; Lokmer & Wegner, 2015).

Enfin, les moules provenant plus spécifiquement d'une origine de captage – l'île Dumet – ont majoritairement plus résisté aux infections que les moules captées dans les quatre autres sites. Ces moules étaient significativement plus grandes et plus charnues, mais le critère morphologique ne peut, en tous cas pas à lui seul, expliquer cette différence. En effet, aucune corrélation n'a été statistiquement mise en évidence entre la mortalité obtenue et l'indice de condition[98]. Parallèlement, le fait que les moules n'aient pas été dans les mêmes conditions initiales d'élevage (filières/bouchots) ajoute une inconnue dans l'équation pour l'interprétation des résultats ; il serait ainsi intéressant de le corriger à l'avenir. En outre, un critère qui semble important à considérer dans de prochaines expérimentations semble être le patrimoine génétique des individus et/ou des populations dont ils sont issus. En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'existence de populations de moules plus résistantes que d'autres en fonction de l'origine du stock et de l'héritage génétique (Dickie *et al.*, 1984 ; Mallet & Haley, 1984 ; Mallet *et al.*, 1986, 1987 ; Fuentes *et al.*, 1994 ; Dégremont *et al.*, 2019). Depuis quelques années maintenant, il est bien établi que les côtes françaises comportent plusieurs populations distinctes de moules avec d'importantes zones d'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Bierne *et al.*, 2003 ; Riquet *et al.*, 2017) et il s'avère que l'île Dumet se trouve dans la zone d'hybridation entre les *M. edulis* de l'Atlantique et les *M. galloprovincialis* de Bretagne. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que les populations hybrides seraient plus résistances que les populations pures. Evidemment, cela nécessite d'être validé (ou invalidé)

[98] Ceci était d'ailleurs plus particulièrement dû aux données d'indice de condition des moules provenant de La Plaine-sur-Mer ; effectivement, elles étaient significativement moins charnues que les autres mais n'ont, pour autant, pas plus souffert des infections que les autres.

par des infections expérimentales réalisées sur des moules dont le génotype aura été vérifié et les pourcentages d'introgression *edulis*/*galloprovincialis* déterminés. Dans la même démarche, réaliser des infections expérimentales identiques sur les deux espèces (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*) pourrait être à envisager.

PARTIE 3

-

PREVALENCE, INCIDENCE ET IMPACT DE LA NEOPLASIE HEMOCYTAIRE DANS DES MOULES DE NORMANDIE

I. Introduction et contexte des expérimentations

La néoplasie hémocytaire est une anomalie cytogénétique identifiée chez les moules depuis au moins une quarantaine d'année, notamment depuis les travaux de Lowe & Moore (1978). A la suite de cette étude, de multiples travaux ont été entrepris afin d'étudier ce désordre de la population hémocytaire et ce, chez plusieurs espèces de bivalves (moules, coques, palourdes, huîtres, etc.). Pourtant, de nombreuses interrogations persistent encore aujourd'hui quant à son étiologie, sa prévalence au sein des différentes populations, et son mécanisme de fonctionnement et d'évolution au sein de l'hôte.

D'abord, les variations de la prévalence de la maladie entre les espèces, mais également entre des animaux d'une même espèce élevés dans différentes zones géographiques, conduisent à des observations très variées. En effet, des pourcentages élevés de néoplasie – allant de 20 % à 60 % – ont très souvent été associés à des mortalités massives tandis que des prévalences faibles – de l'ordre de 4 % – n'avaient aucun impact sur les populations (Farley *et al.*, 1986 ; Elston *et al.*, 1992 ; Villalba *et al.*, 2001 ; Barber, 2004 ; Bower, 2006 ; Carballal *et al.*, 2015). Parallèlement, et à la suite de la transmission de la maladie par injection et par cohabitation, certains auteurs ont défini un caractère infectieux de la néoplasie chez les moules (Elston *et al.*, 1988a ; Carballal *et al.*, 2015) ; d'autres ont montré l'existence d'une transmission horizontale de la maladie entre différentes espèces de bivalves (Metzger *et al.*, 2015, 2016). Cela pose donc question quant à une possible propagation de la maladie au sein des populations de moules, et plus largement de bivalves, qui sont plus ou moins connectées *via* l'eau et les courants marins.

Ensuite, le pourcentage d'animaux atteints semble varier en fonction des saisons, avec des taux plus élevés en hiver et plus faibles, voire nuls, en été (Mix, 1983 ; Carballal *et al.*, 2015). Comme évoqué déjà plusieurs fois dans cet écrit, les surmortalités de moules qui ont touché la France ces dernières années avaient pour la plupart un caractère très majoritairement printanier. Enfin, Benabdelmouna *et al*. (2016 ; 2018b) ont très récemment mis en évidence l'existence d'un lien entre la présence d'anomalies génétiques dans la population hémocytaire, la néoplasie et la mortalité finale observée dans certaines populations de moules françaises. De plus, ils ont montré qu'entre les stocks de moules exploitées dans différents secteurs, la qualité cytogénétique des individus différait significativement et que cela avait un potentiel prédictif sur la mortalité qui allait toucher les moules du site. Ainsi, l'étude de la néoplasie hémocytaire dans les populations de moules cultivées en Normandie apparaissait comme étant un paramètre intéressant à suivre et à considérer, afin d'évaluer son incidence sur la santé des populations.

II. Objectifs et démarche

L'objectif global de cette partie du travail de thèse était de mesurer la prévalence de la néoplasie dans des moules cultivées en Normandie, de suivre son évolution dans les populations au cours du temps, d'évaluer le caractère transmissible de la maladie et d'évaluer l'impact de la présence de la néoplasie et d'anomalies cytogénétiques sur les mortalités observées au cours d'une saison de production. Pour ce faire, deux stocks de moules captées à l'île Dumet (Loire-Atlantique) et à Noirmoutier (Vendée), et cultivées à Agon-Coutainville (Manche Ouest), ont été suivis au cours de deux saisons de production différentes (Tableau 16). D'abord, la néoplasie hémocytaire a été suivie tous les 2 mois, par cytologie, dans des moules de plus d'un an, correspondant aux stocks de fin de saison de production 2018 (Fiche technique n°8, p. 269). Ensuite, deux nouveaux stocks de la saison de production 2019 ont été suivis mensuellement, en cytologie et en CMF (Fiche technique n°9, p. 271 et Fiche technique n°11, p. 275). Parallèlement, les moules néoplasiques détectées lors du suivi de 2018 ont été utilisées pour réaliser des expérimentations de mises en contact de moules néoplasiques avec des moules saines, et ainsi évaluer la potentielle transmission de la maladie (Fiche technique n°10, p. 273).

Tableau 16 : Plan d'échantillonnage pour le suivi de la néoplasie par cytologie et/ou par cytométrie en flux, dans des stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) pour les saisons de production 2018 et 2019. *NA : prélevement non réalisé*

Année	Mois	Date d'échantillonnage	Age approximatif des moules au début du suivi	Origine du naissain	Effectifs prélevés	Analyse(s) réalisée(s)
2018	Juin	13/06/2018	> 1 an	Noirmoutier & Ile Dumet	100 moules par origine pour chacune des dates d'échantillonnage	Cytologie
	Août	29/08/2018				
	Oct.	09/10/2018				
	Déc.	27/11/2018				
2019	Fév.	22/02/2019	< 1 an	Noirmoutier & Ile Dumet	100 moules par origine pour chacune des dates d'échantillonnage	Cytologie & Cytométrie en flux
	Mars	22/03/2019				
	Avr.	17/04/2019				
	Mai	20/05/2019				
	Juin	*NA*				
	Juil.	18/07/2019				
	Août	30/08/2019				
	Sept.	01/10/2019				

III.Résultats

1. Suivi de la néoplasie par cytologie

D'une manière générale, sur les presque 2 200 préparations cytologiques réalisées entre juin 2018 et septembre 2019, les hémolymphes des moules présentaient deux profils majoritaires. Le premier avait un aspect normal et était constaté dans les moules saines, tandis que le deuxième avait un aspect anormal et était observé dans les moules néoplasiques. Les individus sains présentaient deux types cellulaires, les granulocytes et les hyalinocytes. Les premiers sont des hémocytes éosinophiles granuleux avec un diamètre moyen de 22,6 µm de diamètre (± 0,78), un RNC égal à 1/3, et un noyau circulaire excentré. Les seconds sont des hémocytes agranuleux légèrement basophiles, qui ont un diamètre moyen de 12,9 µm (± 0,87) et un RNC de 3/4. Les hyalinocytes ont un fort potentiel d'agrégation particulièrement visible sur certaines préparations cytologiques (Figure 62).

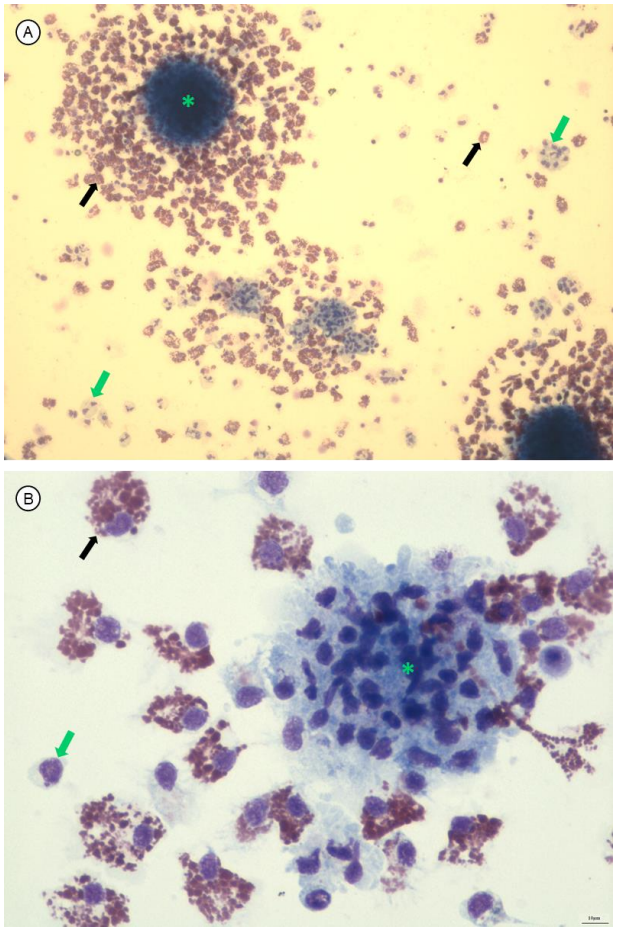


Figure 62 : Micrographes d'hémolymphe normale de moule. (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Les deux types hémocytaires sont bien visibles : les granulocytes (flèches noires) et les hyalinocytes (flèche vertes) ; ainsi que le comportement normal d'agrégation des hyalinocytes (*). Coloration : MGG

Les cytologies des moules saines avaient toutes très sensiblement le même aspect. A l'inverse, celles réalisées avec des hémolymphes provenant de moules néoplasiques présentaient différents profils en fonction de l'intensité de la maladie. L'hémolymphe d'un individu partiellement néoplasique comportait les deux types hémocytaires normaux précédemment décrits mais également un troisième type de cellules qui correspondait aux hémocytes néoplasiques. Ces hémocytes sont de grande taille (diamètre supérieur à celui des granulocytes), fortement basophiles, avec un RNC élevé proche de celui des hyalinocytes et contiennent un ou plusieurs nucléoles particulièrement bien visible(s) (Figure 63).

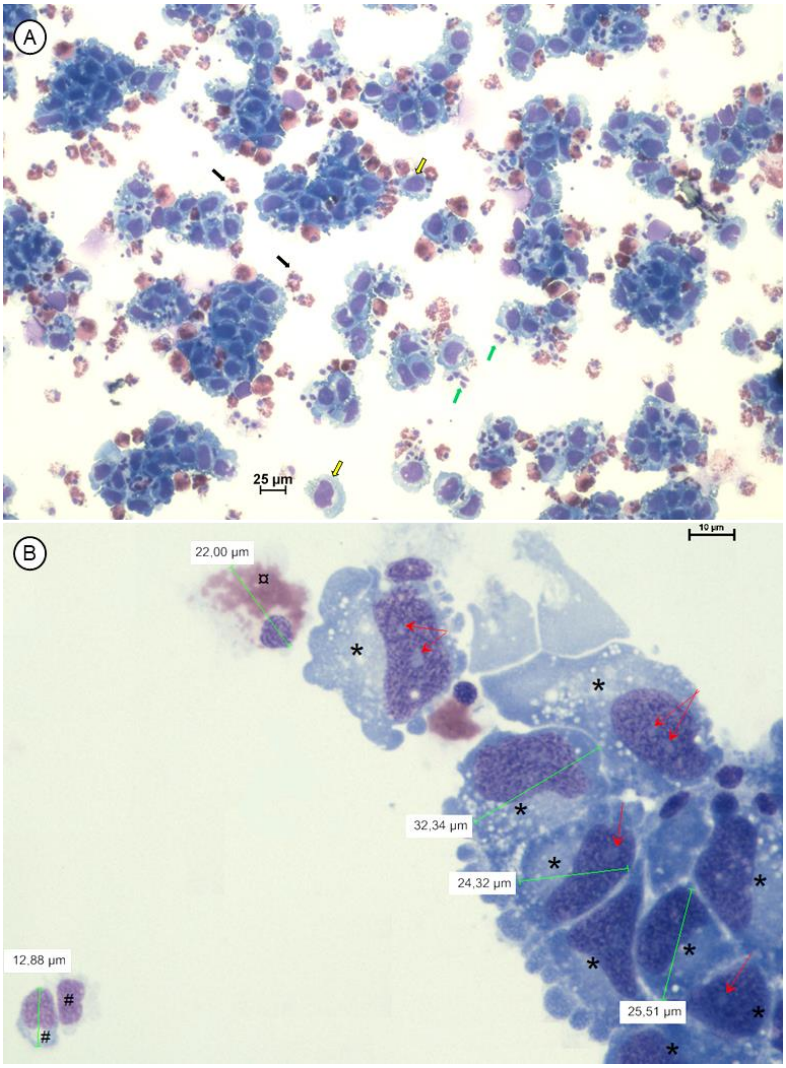


Figure 63 : Micrographes d'hémolymphe de moule partiellement néoplasique (type P d'après Burioli *et al.* (2019)). (A) Faible grossissement (x100). Des hémocytes normaux sont visibles : granulocytes (flèches noires) et hyalinocytes (flèches vertes) ainsi que des hémocytes néoplasiques (flèches jaunes). (B) Fort grossissement (x500) avec mesures des granulocytes (¤), des hyalinocytes (#) et des hémocytes néoplasiques (*) chez qui le(s) nucléole(s) sont visible(s) (flèches rouges). Coloration : MGG

L'hémolymphe d'un individu totalement néoplasique ne contient plus, ou quasiment plus, d'hémocytes normaux et le comportement d'agrégation des hémocytes n'est plus remarquable (Figure 64).

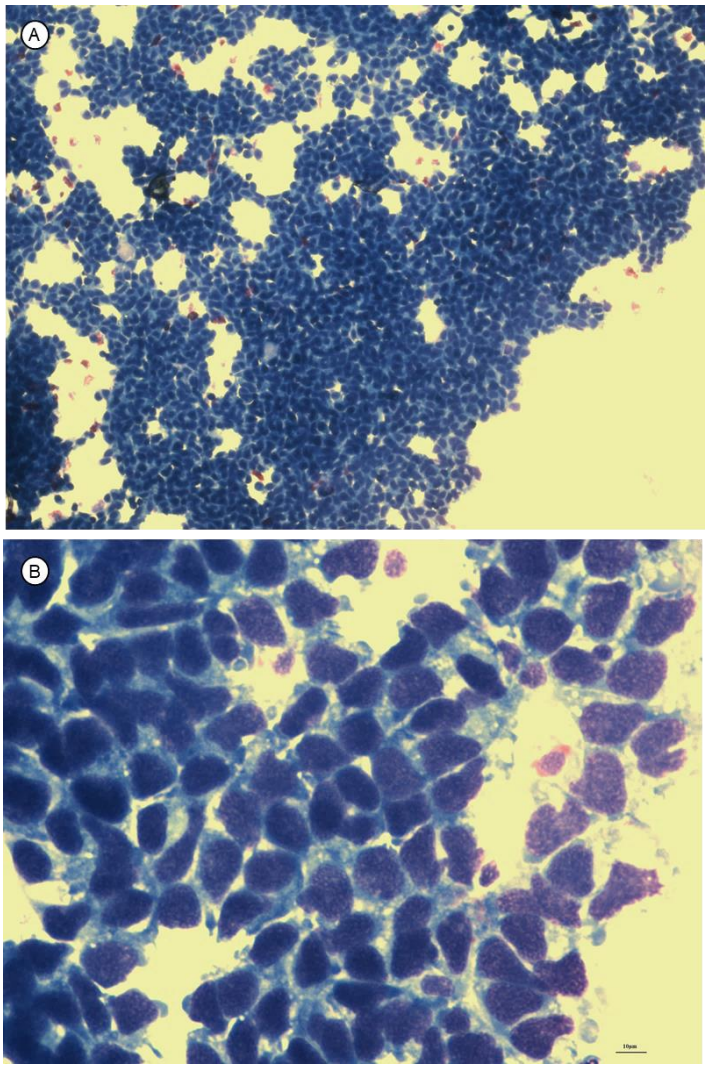


Figure 64 : Micrographes d'hémolymphe de moule totalement néoplasique (type U d'après Burioli *et al.* (2019)). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG

La taille importante des cellules, le RNC élevé ainsi que le caractère particulièrement basophile des cellules donne un aspect dense à la préparation (Figure 65A) et rend difficile le passage des photons lors de l'observation. Dans la grande majorité des cas, les prélèvements d'hémolymphes pleinement néoplasiques avaient un aspect trouble et légèrement coloré et épais (Figure 65B) à la différence des prélèvements sains qui étaient parfaitement fluides, incolores et transparents.

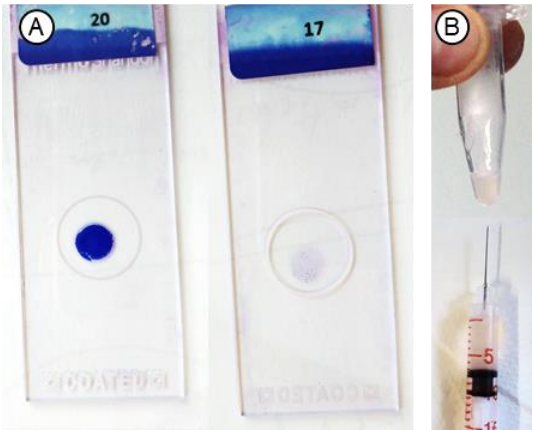


Figure 65 : (A) Exemple de deux préparations cytologiques d'hémolymphes colorées au MGG : à gauche, une hémolymphe contenant une grande quantité d'hémocytes uniquement néoplasiques ; à droite, une hémolymphe contenant des hémocytes normaux. (B) Prélèvements d'hémolymphes pleinement néoplasiques avec un aspect trouble et légèrement coloré.

Il est à noter que les hémocytes néoplasiques de l'individu partiellement néoplasique de la Figure 63 ont une morphologie différente de ceux de l'individu totalement néoplasique de la Figure 64. Les premiers ont un diamètre moyen égal à 29,1 µm (± 2,5), un RNC ~ 0,7, une forme lobée peu régulière et plusieurs nucléoles sont généralement visibles, tandis que les seconds ont un diamètre moyen égal à 22,4 µm (± 1,4), un RNC ~ 0,8, une forme ovale relativement régulière et un seul nucléole est visible. Ceci correspond aux deux types majoritaires d'hémocytes néoplasiques, respectivement type-P et type-U, décrits par Burioli *et al.* (2019) les plus couramment retrouvés dans les moules atteintes de néoplasie.

Ainsi, à la suite de l'observation des lames cytologiques, chacune des moules était identifiée comme « normale », « partiellement néoplasique » ou « totalement néoplasique » et le type de néoplasie (U ou P) était déterminé. Sur les 2 169 préparations cytologiques exploitables, quel que soit l'état des hémocytes (normaux ou néoplasiques), aucune *brown cell* n'a été observée, ni aucun granulocyte basophile. Aussi, au cours des analyses effectuées au mois d'octobre 2018, février, mars, avril et mai 2019, une certaine proportion de préparations cytologiques « contaminées » par des gamètes et/ou des cellules germinales, a pu être constatée (et ce quelle que soit l'origine du stock) (Figure 66). Pour chacun de ces mois, les pourcentages de lames « contaminées » étaient respectivement de 3 %, 7,5 %, 26 %, 17 % et 4,5 %.

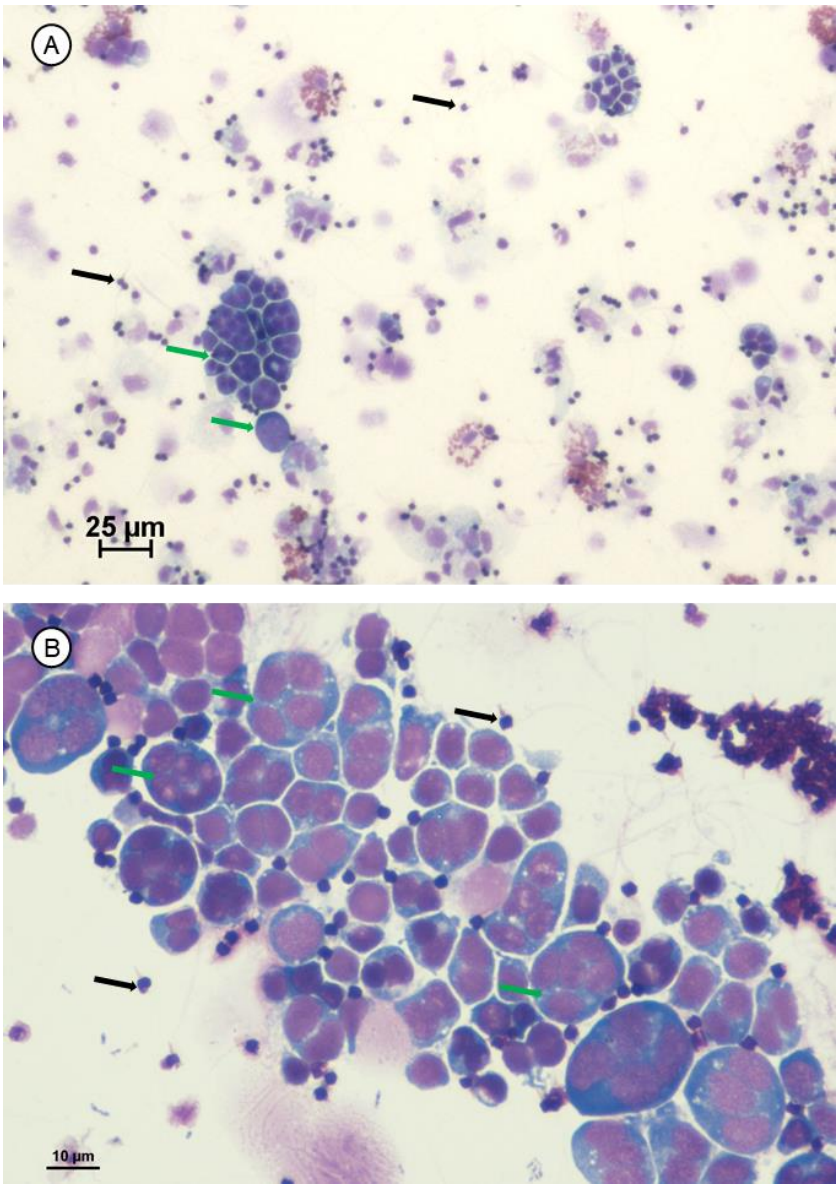


Figure 66 : Micrographes d'hémolymphe de moule prélevée en octobre 2018 montrant des hémocytes normaux, des spermatozoïdes (flèches noires) et des morulae de cellules germinales (flèches vertes). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG.

De plus, des bactéries ont également été observées sur certaines préparations (Figure 67), ceci uniquement dans 3,5 % des moules du suivi de mars, ce qui indique des capacités de clairance bactérienne diminuées.

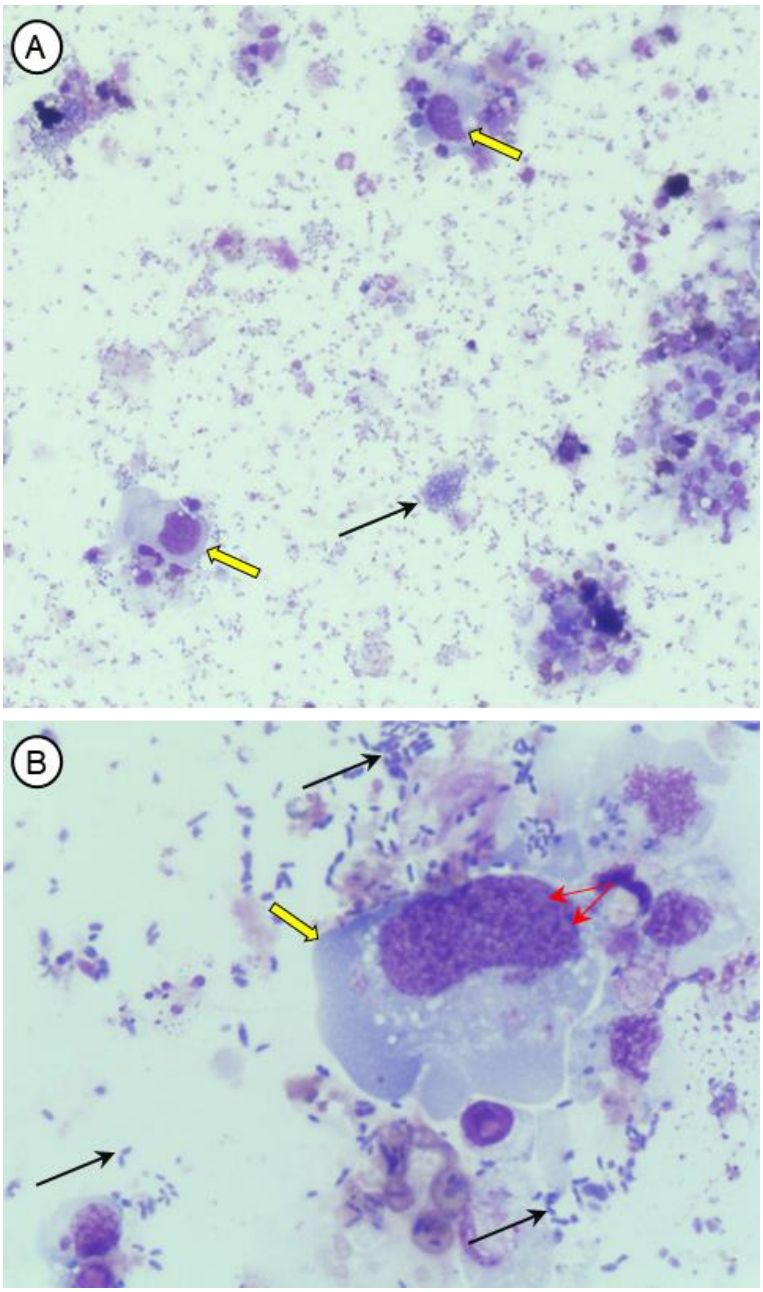


Figure 67 : Hémolymphe de moule contenant des bactéries (flèches noire). Des cellules néoplasiques (type P) sont visibles (flèches jaunes) ainsi que leurs nucléoles (flèches rouge). (A) Faible grossissement (x100) et (B) fort grossissement (x500). Coloration : MGG

Les résultats du suivi de la néoplasie réalisé entre les mois de juin et décembre 2018 sur deux stocks de moules de plus d'un an cultivées en Normandie (Fiche technique n°8, p. 269), sont reportés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Effectifs de moules néoplasiques (partiellement ou totalement ainsi que le type de néoplasie, P ou U) dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) suivis entre juin et décembre 2018. No : moules captées à Noirmoutier ; ID : moules de pelisse captées à l'île Dumet. Les pourcentages d'individus néoplasiques comprennent les moules partiellement et totalement néoplasiques.

Année	Mois	Origine de captage	Néoplasie		Observations cytologiques	% individus néoplasiques
			partielle	*totale*		
2018	juin	ID	2P	2U+1P	92	5,43
		No	1P+1U	1P	98	3,06
	août	ID	1P	2P+2U	100	5,00
		No	0	0	100	0,00
	octobre	ID	0	5P+1U	100	6,00
		No	0	2P	100	2,00
	décembre	ID	2P	3P+2U	100	7,00
		No	2P	2P	100	4,00

Sur la période étudiée, la prévalence moyenne de la néoplasie dans les moules nées à l'île Dumet était de 5,9 % tandis que pour les moules nées à Noirmoutier, elle était de 2,3 %. L'évolution des pourcentages de moules atteintes entre juin et décembre 2018 est illustrée par la Figure 68. Pour le stock provenant de l'île Dumet, la prévalence la plus faible a été observée en été, au mois d'août, même si elle restait supérieure ou égale à 5 %, tandis que pour les moules de Noirmoutier, la prévalence était nulle. A l'opposé, les plus fortes prévalences ont été obtenues au début de l'hiver (au mois de décembre). Les droites de tendance indiquent une faible augmentation de la maladie sur la période (coefficients directeurs égaux à ~ 0,5/0,6). Toutefois, on remarque que les prévalences diminuent entre juin et août, et augmentent progressivement entre août et décembre (de manière plus marquée pour les moules nées à Noirmoutier) pour finalement atteindre des pourcentages supérieurs à ceux observés en juin. Lorsque les deux distributions de prévalences sont comparées, il apparait qu'elles sont significativement différentes l'une de l'autre (Chi-2 d'homogénéité= 9,99 > Chi-$2_{0,05}$ = 7,82 ; ddl = 3 ; p* < 0,05).

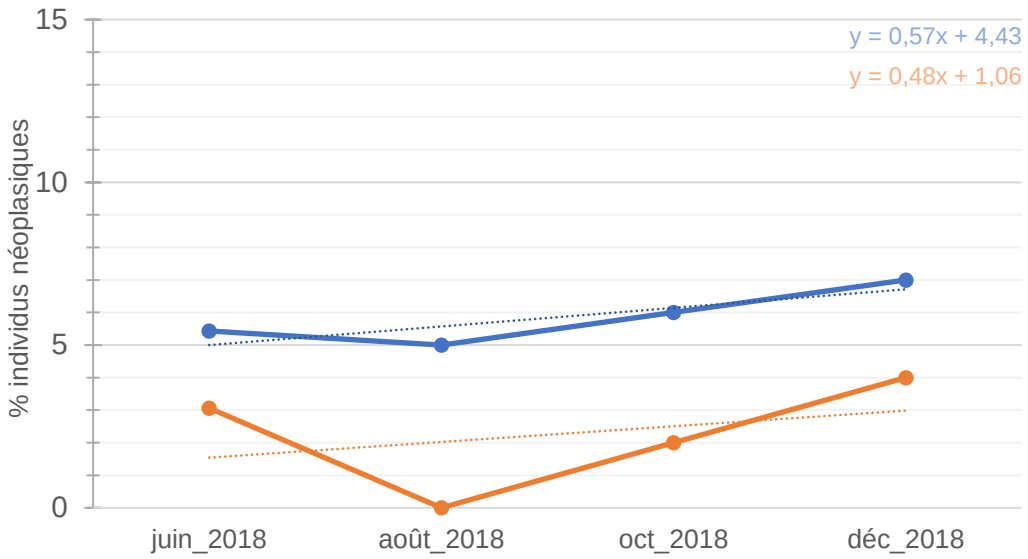


Figure 68 : Prévalence de la néoplasie hémocytaire entre juin et décembre 2018 dans deux stocks de moules, de plus d'un an, cultivées à Agon-Coutainville (50). Moules captées à Noirmoutier (orange) et à l'île Dumet (bleu) au printemps 2017. Les droites en pointillés représentent les droites de tendance dont les équations sont indiquées en haut à droite du graphique.

Les résultats du suivi, réalisé entre février et septembre 2019, sur deux stocks de moules captées au printemps 2018 et cultivées en Normandie (Fiche technique n°9, p. 271) sont reportés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Effectifs de moules néoplasiques (partiellement ou totalement ainsi que le type de néoplasie, P ou U) dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50) suivis entre février et septembre 2019. No : moules captées à Noirmoutier ; ID : moules de pelisse captées à l'île Dumet. Les pourcentages d'individus néoplasiques comprennent les moules partiellement et totalement néoplasiques.

Année	Mois	Origine de captage	Néoplasie		Observations cytologiques	% individus néoplasiques
			partielle	*totale*		
2019	février	ID	0	2P	94	2,13
		No	0	0	96	0,00
	mars	ID	2P	2P	94	4,26
		No	0	2P	100	2,00
	avril	ID	3P	1P+1U	100	5,00
		No	1P	1P	99	2,02
	mai	ID	2P	1U+1P	96	4,17
		No	1P	0	100	1,00
	juillet	ID	1P	0	100	1,00
		No	1P	0	100	1,00
	août	ID	0	2P	100	2,00
		No	1P	0	100	1,00
	septembre	ID	2P	1P	96	3,13
		No	0	0	97	0,00

Sur la période suivie en 2019, la prévalence de la maladie dans les moules nées à l'île Dumet était de 3,1 % tandis que pour celles nées à Noirmoutier, elle était de 1,0 %. L'évolution de la prévalence entre février et septembre 2019 est illustrée par la Figure 69. Les prévalences les plus faibles ont été observées à la fin de l'hiver (février) et pendant l'été (juillet pour les moules de l'île Dumet, et septembre pour les moules de Noirmoutier), et les plus fortes, au printemps (au mois d'avril). Les droites de tendance indiquent une très faible décroissance des prévalences de la maladie sur la période (coefficients directeurs égaux à ~ -0,1/0,2). Toutefois, on remarque que les prévalences augmentent progressivement entre février et avril, et décroissent entre avril et la fin de l'été ; les prévalences mesurées dans les moules de l'île Dumet en août et en septembre laissent supposer une croissance à venir pour l'automne et l'hiver. Les distributions de prévalences entre les deux stocks de moules ont tendance à être différentes l'une de l'autre, et ce de manière plus marquée en mai et en septembre, mais elles ne le sont pas significativement (Chi-2 d'homogénéité = 11,01 < Chi-$2_{0,05}$ = 12,6 ; ddl = 6 ; p > 0,05).

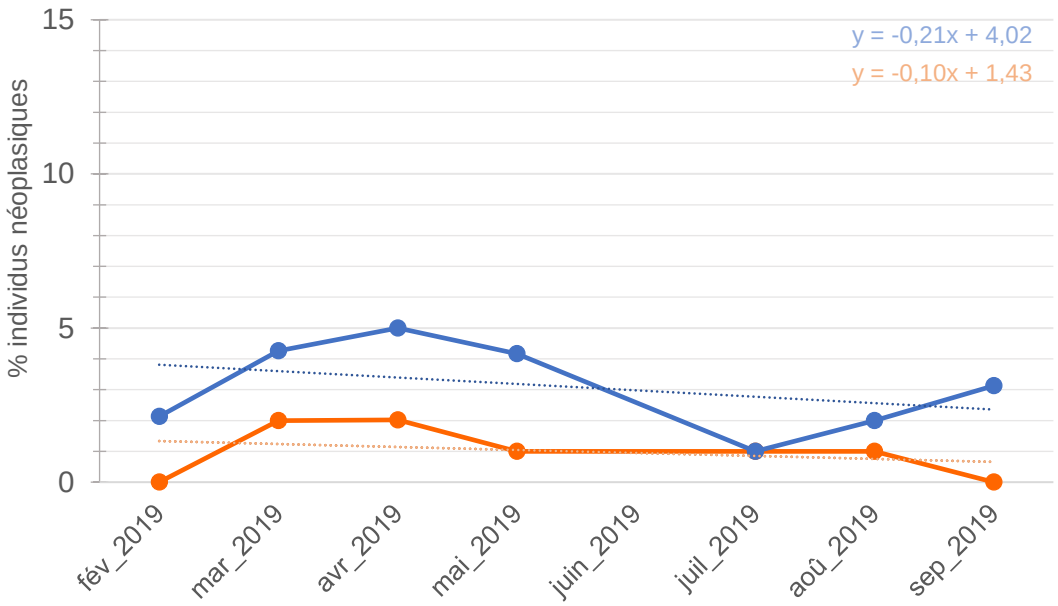


Figure 69 : Prévalence de la néoplasie hémocytaire entre février et septembre 2019 dans deux stocks de moules cultivées à Agon-Coutainville (50). Moules captées à Noirmoutier (orange) et à l'île Dumet (bleu) au printemps 2018. Les droites en pointillés représentent les droites de tendance dont les équations sont indiquées en haut à droite du graphique.

Si l'on combine les résultats obtenus lors des deux suivis (Figure 70), bien qu'ils aient été faits sur deux générations différentes, on remarque que (i) les cellules néoplasiques de types P et U sont, respectivement, retrouvées dans 83 % et 17 % des cas ; (ii) les prévalences dans les moules captées à l'île Dumet sont quasi systématiquement supérieures à celles des moules captées à Noirmoutier pour des moules de même génération ; (iii) d'une génération à l'autre, les prévalences semblent différentes mais relativement proportionnelles, du moins

entre deux séries de mesures réalisées durant la période estivale (juin-septembre) ; (iv) malgré ces différences de proportions entre générations, une certaine périodicité dans les prévalences de la maladie semble se dessiner sur l'année. Assurément, avant de valider ces deux dernières observations, il convient d'attendre les données pour la fin de l'année 2019 pour les moules de la saison de production en cours.

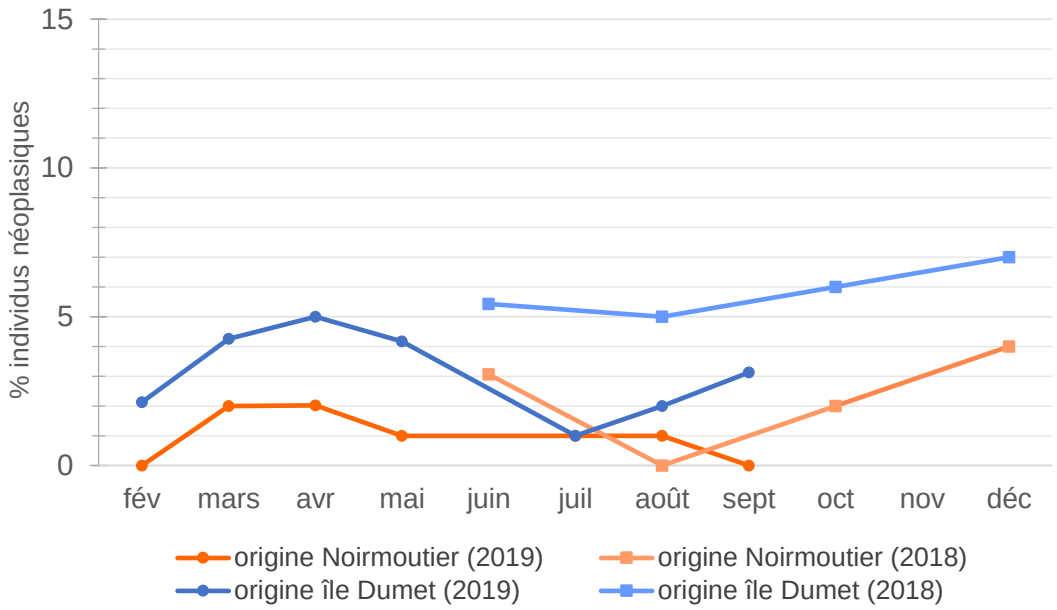


Figure 70 : Prévalence de la néoplasie hémocytaires dans 4 stocks de moules captées à Noirmoutier et à l'île Dumet au printemps 2017 ou 2018 et respectivement suivies entre juin et décembre 2018 ou entre février et septembre 2019.

Concernant les mortalités subies par ces stocks de moules, hormis les pertes habituelles et récurrentes intervenant au début du printemps (mars/avril) – désormais considérées comme « normales » par les mytiliculteurs – aucune mortalité particulière n'a été remarquée ni déclarée par le mytiliculteur exploitant ces stocks sur l'année 2017-2018 et 2018-2019 (Benoit Clouet, com. pers, septembre 2019). Aussi, d'une manière générale et avec un recul de nombreuses années de production, le mytiliculteur a indiqué ne pas constater de différence de mortalité entre les deux stocks de moules qu'ils cultivent au cours d'une saison de production classique (moules récoltées à 18 mois en moyenne).

Parallèlement, le réseau national d'observation de la moule bleue (réseau Mytilobs de l'Ifremer), a observé 38 % de mortalité dans les lots de moules sentinelles disposées à Agon-Coutainville sur la saison de production 2017-2018 et entre 21 % et 41 % pour la saison 2018-2019 encore en cours (Julien Normand, com. pers, septembre 2019). Ceci illustre certainement les variations d'appréciation des mortalités qu'il peut y avoir entre des moules mises en poche, rigoureusement suivies et comptabilisées par un réseau de surveillance (appréciation quantitative), et le mytiliculteur qui a une vision d'ensemble de ses bouchots et une estimation plus approximative de ses pertes (appréciation qualitative).

2. Expérimentations de mise en contact

a. *Suivi de l'évolution de la néoplasie*

Afin de suivre l'évolution de la néoplasie dans les animaux et d'observer une potentielle transmission entre des moules saines mises en contact avec une moule atteinte, un suivi intermédiaire et un suivi final étaient réalisés respectivement à T2mois et à T4mois de chacune des quatre expérimentations (Fiche technique n°10, p.273) ; les résultats sont illustrés par la Figure 71. Sur l'intégralité des suivis intermédiaires effectués, une seule moule nouvellement néoplasique a été observée[99] (expérimentation MEC1, aquarium de mise en contact ; Figure 71A). Cette moule est morte 17 jours plus tard et était encore pleinement néoplasique à sa mort. Concernant les suivis finaux, entre 0 et 2 moule(s) néoplasique(s) étai(en)t retrouvée(s), et ceci sans différence significative entre les aquariums de mise en contact (Figure 71A) et les aquariums témoins (Figure 71B) (pour chacune des expérimentations, Chi-2 d'homogénéité < $Chi\text{-}2_{0,05}$ = 3,84 ; ddl = 1 ; p > 0,05).

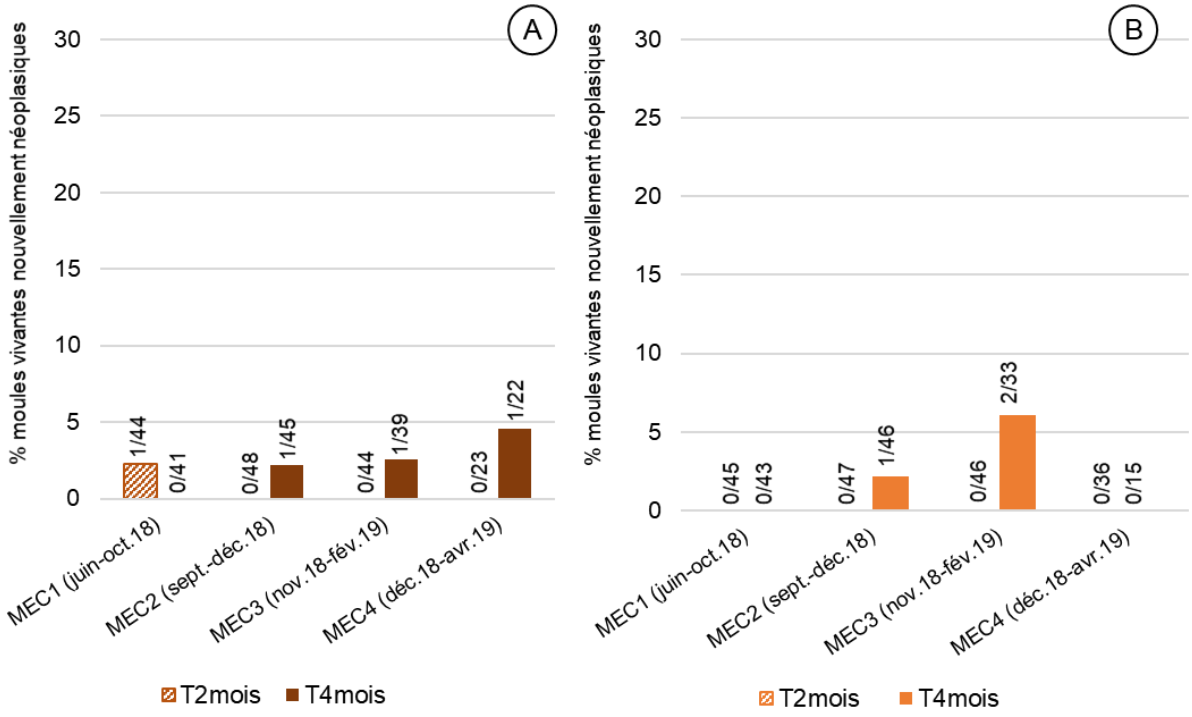


Figure 71 : Pourcentages de moules néoplasiques parmi les moules survivantes originaires de Noirmoutier, à T2mois et T4mois : (A) Moules mises en contact ; (B) Moules témoins. Les effectifs exacts sont indiqués au-dessus des barres (moule(s) nouvellement néoplasique(s) / total des moules analysées en cytologie).

[99] Les moules néoplasiques volontairement disposées pour la mise en contact en début d'expérimentations, ne sont donc pas comptabilisées ici.

Les résultats des suivis intermédiaires à T2mois, et des suivis finaux à T4mois de chacune des quatre expérimentations réalisées avec les moules nées à l'île Dumet sont illustrés par la Figure 72. D'après les résultats de tous les suivis intermédiaires, l'apparition et la prévalence de la maladie étaient tout à fait similaire entre les moules mises en contact (Figure 72A) et les moules témoins (Figure 72B) puisqu'en moyenne, un individu développait la maladie entre T0 et T2mois (exception faite de MEC4) [100]. Pour chacune des expérimentations, aucune différence significative n'a été observée entre les effectifs de moules néoplasiques des aquariums témoins et ceux des mises en contact (Chi-2 d'homogénéité < $Chi\text{-}2_{0,05} = 3,84$; ddl = 1 ; $p > 0,05$).

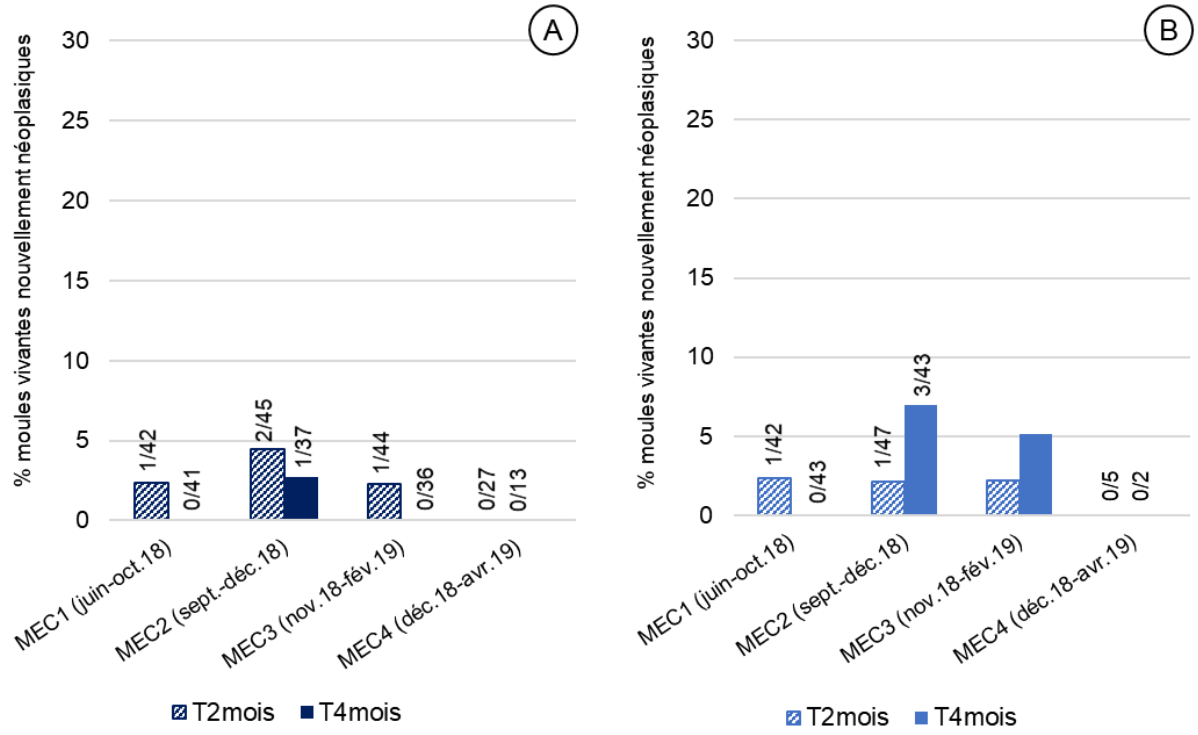


Figure 72 : Pourcentages de moules néoplasiques parmi les moules survivantes originaires de l'île Dumet, à T2mois et T4mois : (A) Moules mises en contact ; (B) Moules témoins. Les effectifs exacts sont indiqués au-dessus des barres (moule(s) nouvellement néoplasique(s) / total des moules analysées en cytologie).

La moule néoplasique à T2mois de l'expérimentation MEC1 est morte 20 jours plus tard (et était toujours totalement néoplasique à sa mort) et entre T2mois et T4mois, aucune moule n'a développé la maladie. *A contrario*, la moule néoplasique à T2mois de l'expérimentation MEC3 était toujours vivante à T4mois mais n'était plus néoplasique. Ainsi, MEC2 est la seule expérimentation durant laquelle des mêmes moules ont été identifiées comme étant néoplasiques à T2mois et à T4mois. L'un de ces deux individus était totalement

[100] Pour rappel, comme mentionné dans la Fiche technique n°10 (p. 273), les individus néoplasiques identifiés dans les témoins lors du suivi à T2mois étaient retirés de l'aquarium.

néoplasique à T2mois et est mort la veille du suivi de T4mois, tandis que l'autre était partiellement néoplasique à T2mois et était encore vivant et totalement néoplasique à T4mois. Parallèlement, à T4mois chez les témoins, de nouveaux cas de néoplasie ont été détectés. Finalement, entre les moules mises en contact avec une moule atteinte et les moules témoins, il n'apparait pas de différence notable dans l'apparition de la maladie.

b. Mortalités

Lors des quatre expérimentations de mise en contact, des mortalités ont été observées durant les 4 mois de suivi, aussi bien dans les moules témoins, que dans les moules mises en contact, et ce, pour les deux stocks étudiés (Figure 73). D'abord, pour les deux origines, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les mortalités observées dans les aquariums témoins et les mortalités dans les aquariums de mise en contact (Chi-2 de comparaison < $Chi\text{-}2_{0.05}$ = 7,82 ; ddl = 3). Ensuite, des différences ont été constatées entre les mortalités obtenues lors des trois premières expérimentations (MEC1 à MEC3) et celles observées durant la dernière expérimentation (MEC4). En effet, quelle que soit l'origine des moules et la condition (témoins / MEC), les taux de mortalité étaient inférieurs ou égaux à 30 % pour les expérimentations réalisées avec des moules prélevées entre juin et octobre, tandis qu'ils étaient supérieurs à 50 % pour la dernière expérimentation menée avec des moules prélevées en novembre. Par ailleurs, les pourcentages de mortalité obtenus lors de la dernière expérimentation sont significativement différents des autres (Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Wilcoxon, p* < 0,05).

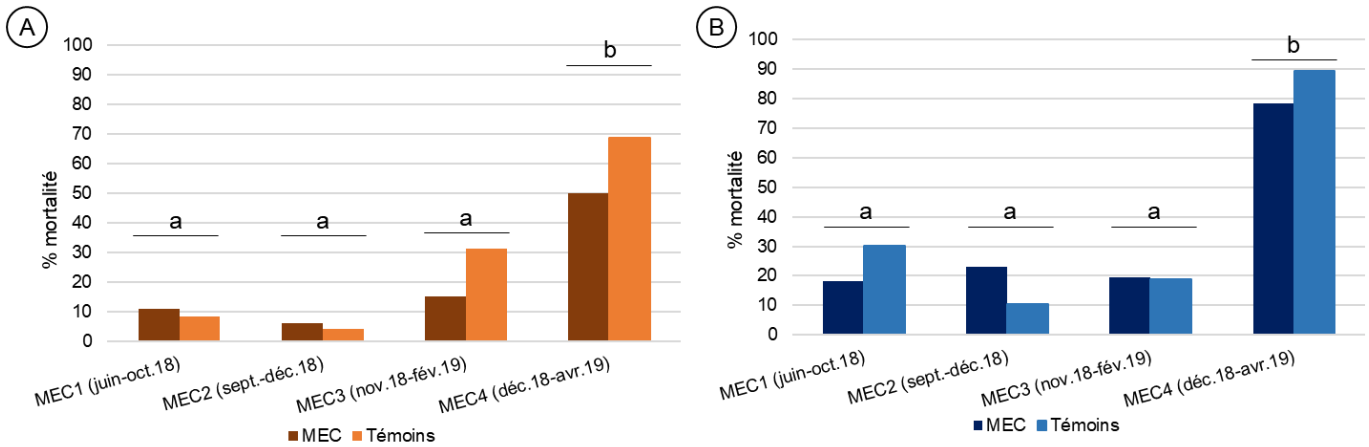


Figure 73 : Taux de mortalité cumulée observés pour les quatre expérimentations de mise en contact (MEC1 à MEC4) réalisées avec des moules prélevées entre juin et novembre 2018. (A) Moules originaires de Noirmoutier et (B) de l'île Dumet. Les différences statistiques entre les barres sont notifiées par un système de lettres ; les barres qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes (Chi-2 d'homogénéité entre MEC et Témoins, aucune différence significative ; puis test de Kruskal-Wallis et test *post hoc* de Wilcoxon entre MEC1, 2, 3 et 4).

Concernant la présence de la maladie dans les moules mortes dans les intervalles entre les suivis de T2mois et T4mois, les effectifs totaux ainsi que la proportion d'individus néoplasiques sont détaillés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Effectifs de moules mortes (par origine, par condition et par expérimentation) dans les intervalles entre les suivis intermédiaires à T2mois et les suivis finaux à T4mois. Les effectifs sont indiqués comme suit : moule(s) morte(s) néoplasique(s) / total moule(s) morte(s).

Origine	Cond.	Exp.	n à T0	intervalle T0-T2mois	intervalle T2mois-T4mois
Noirmoutier	MEC	MEC1	46	0 / 2	**1*** / 3
		MEC2	48	0 / 0	0 / 3
		MEC3	46	0 / 2	0 / 5
		MEC4	46	0 / 23	0 / 0
	Témoins	MEC1	47	0 / 1	0 / 3
		MEC2	48	0 / 1	0 / 1
		MEC3	48	0 / 2	0 / 13
		MEC4	48	0 /12	0 / 21
Ile Dumet	MEC	MEC1	44	0 / 2	**1*** / 6
		MEC2	48	0 / 3	**1*** + **1** / 8
		MEC3	46	0 / 2	0 / 7
		MEC4	46	0 / 19	0 / 17
	Témoins	MEC1	46	**1** / 4	0 / 12
		MEC2	48	0 / 1	**1** / 4
		MEC3	48	0 / 3	0 / 6
		MEC4	47	0 / 42	0 /0

**** moule identifiée comme néoplasique lors du suivi à T2mois***

La seule moule morte avant un suivi à T2mois et, montrant une cytologie *post-mortem* anormale se trouvait dans les témoins des moules de l'expérimentation MEC1 nées à l'Ile Dumet. Cet individu montrait une hémolymphe comportant des hémocytes partiellement néoplasiques. Deux moules de l'expérimentation MEC2 sont mortes dans l'intervalle T2mois-T4mois et n'avaient pas été identifiées comme étant néoplasiques lors du suivi intermédiaire. Ces deux animaux étaient originaires de l'Ile Dumet, la première se trouvait dans les moules mises en contact et était partiellement néoplasique à sa mort, la seconde était dans les témoins et présentait une néoplasie totale.

3. Suivi de la néoplasie par cytométrie en flux

En plus des analyses cytologiques réalisées dans le suivi de 2019 (Fiche technique n°9, p. 271), une partie des prélèvements d'hémolymphe a été analysée en CMF[101] (Fiche technique n°11, p.275). Sur les 779 prélèvements réalisés entre février et mai 2019 et analysés en CMF, un peu plus de 50 % (n = 400) ne comportaient pas un nombre suffisant de cellules permettant une interprétation statistiquement fiable de la qualité cytogénétique des hémocytes (Coefficient de Variation (CV %) > 10).

a. Néoplasie et hyperploïdie

Lorsque les résultats obtenus à la suite des analyses cytologiques sont comparés à ceux des analyses réalisées en CMF, sur les 20 moules néoplasiques identifiées en cytologie sur toute la période étudiée (5 originaires de Noirmoutier et 15 de l'île Dumet), 12 ont également été retrouvées en CMF (les 8 autres prélèvements faisant malheureusement partie des échantillons non exploitables). Parmi ces 20 cytologies néoplasiques, 12 présentaient exclusivement des hémocytes néoplasiques (néoplasie totale) et 8 comportaient un mélange d'hémocytes normaux et néoplasiques (néoplasie partielle). En CMF, tous les individus détectés intégraient un certain pourcentage d'hémocytes normaux et étaient ainsi partiellement néoplasiques. En outre, les taux d'hémocytes hyperploïdes étaient très variables d'un individu néoplasique à l'autre, allant de 0,01 % à 90,4 %, tout comme les ploïdies des hémocytes néoplasiques qui étaient comprises entre 8n et 16n (Tableau 20).

[101] Les prélèvements de juillet, août et septembre 2019 étant encore actuellement en cours d'analyse.

Tableau 20 : Détection de la néoplasie par cytologie (et type de néoplasie, P ou U) et cytométrie en flux avec indication des pourcentages d'hémocytes hyperploïdes et ploïdie(s) associée(s). ID : île Dumet ; No : Noirmoutier.

Année	Mois	Origine de captage	Cytologie *(néoplasie partielle)*	CMF % hémocytes hyperploïdes (ploïdie)	Cytologie *(néoplasie totale)*	CMF % hémocytes hyperploïdes (ploïdie)
2019	février	ID	0	0	**1 P** **1 P**	**28,2 % (16n)** **62,9 % (10n)**
		No	0	0	0	0
	mars	ID	**1 P** **1 P**	**0,02 % (12n)** **0,01 % (15n)**	**1 P** **1 P**	**4,2 % (12n)** **7,1 % (10n)**
		No	0	0	**1 P** 1 P	**10,7 % (10n)** *NA*
	avril	ID	**1 P** 1 P 1 P	**17,0 % (14n)** *NA* *NA*	1 P 1 U	*NA* *NA*
		No	**1 P**	**0,1 % (12n)**	**1 P**	**21,5 % (10n) + 39,4 % (16n)**
	mai	ID	1 P 1 P	*NA* *NA*	**1 U** **1 P**	**72,9 % (8n) + 17,5 % (10n)** **20,3 % (14n)**
		No	1 P	*NA*	0	0

NA : données non disponibles (nombre de cellules trop faible dans le prélèvement)

Sur les 12 individus néoplasiques interprétables en CMF, l'hyperploïdie la plus mesurée dans les hémocytes néoplasiques est la ploïdie 10n qui est retrouvée dans un tiers des cas (un exemple est présenté dans la Figure 74). Aussi, de manière assez remarquable, deux individus possédaient deux populations d'hémocytes néoplasiques ayant deux ploïdies distinctes (un exemple est présenté dans la Figure 75). En outre, il est impossible de faire une liaison entre la ploïdie et le type de néoplasie (P ou U) au regard des faibles effectifs disponibles.

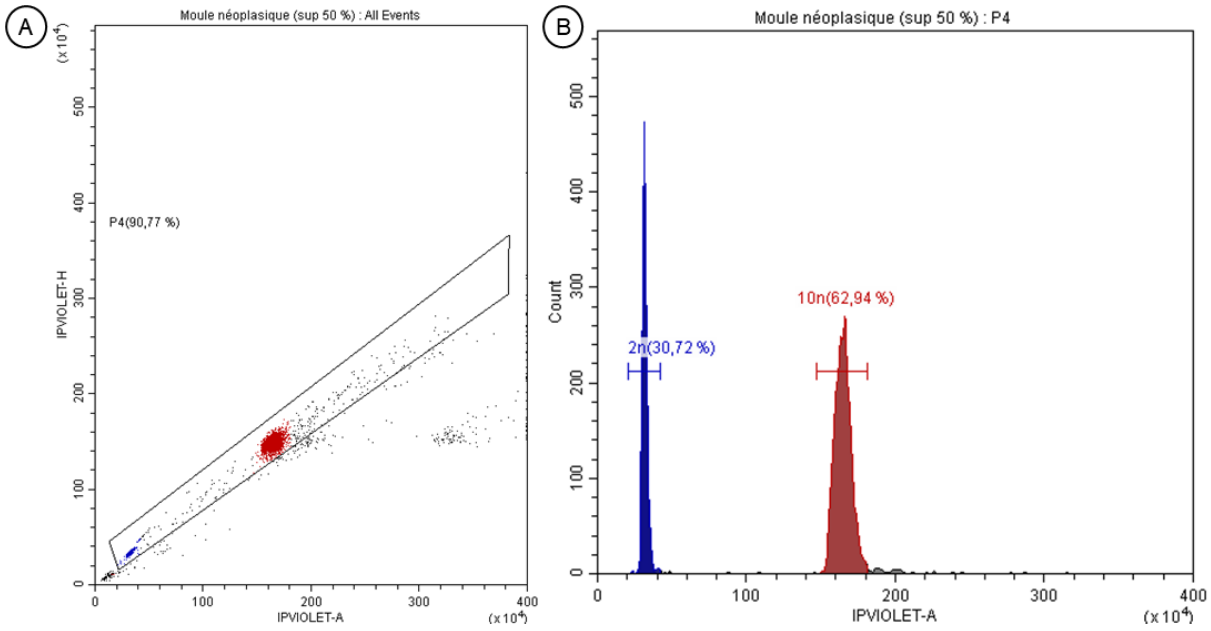


Figure 74 : Profil de cytométrie en flux de l'hémolymphe d'une moule néoplasique comportant 62,9 % d'hémocytes hyperploïdes de ploïdie 10n. (A) nuage de point IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) histogramme count / IPVIOLET-A (CV % pic 2n = 6,1 % et CV % pic 10n = 3,2 %).

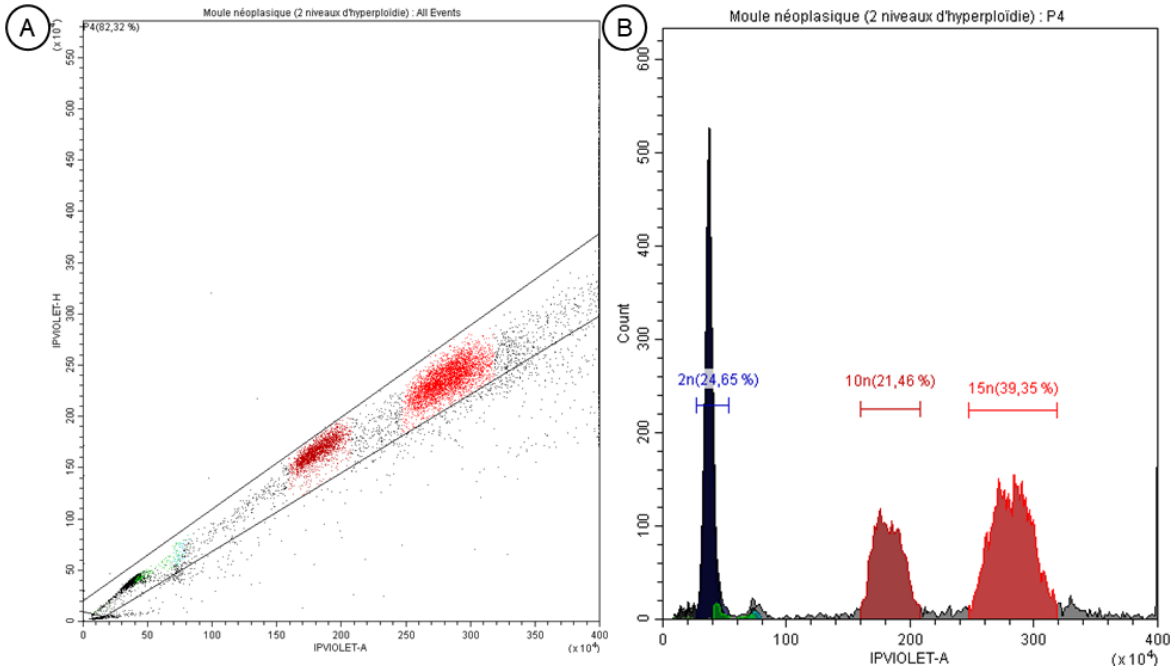


Figure 75 : Profil de cytométrie en flux de l'hémolymphe d'une moule néoplasique comportant 60,9 % d'hémocytes hyperploïdes : 21,5 % de ploïdie 10n et 39,4 % de ploïdie 15n. (A) nuage de point IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) histogramme count / IPVIOLET-A (CV % pic 2n = 7,9 %, CV % pic 10n = 5,8 % et CV % pic 15n = 5,6 %).

b. Cycle cellulaire et prolifération anormale

Pour chacun des 379 prélèvements exploitables sur la période étudiée, l'analyse en CMF a permis d'établir des pourcentages d'hémocytes en phases G0/G1, S ou G2/M. Au sein d'un individu, plus le pourcentage de cellules en phase S-G2/M est élevé, plus la population hémocytaire possède un caractère prolifératif et l'animal peut être considéré comme cancéreux ou néoplasique. Benabdelmouna & Ledu (2016) ont défini un seuil de 10 % de cellules en phase S-G2/M au-delà duquel une moule est considérée comme anormale cytogénétiquement et néoplasique. Parallèlement chez la mye commune (*M. arenaria*), Delaporte *et al.* (2008) ont, quant à eux, défini deux seuils : en-dessous de 5 % de cellules en phase S-G2/M, l'individu est normal et non atteint par la maladie et au-delà de 20 %, l'animal est anormal et affecté par la néoplasie hémocytaire. En outre, ces auteurs indiquent que dans l'intervalle 5-20 % sont retrouvés des cas intermédiaires au diagnostic incertain pouvant inclure des faux-négatifs et/ou des faux-positifs. Un exemple de profil cytométrique d'une moule considérée normale, avec un pourcentage d'hémocytes en phase S-G2/M égal à 3,5 %, est présenté Figure 76A. La Figure 76B, quant à elle, illustre un profil prolifératif des cellules avec un pourcentage d'hémocytes en phase S-G2/M = 13,4 %, considéré comme anormal si l'on prend en compte le seuil de Benabdelmouna & Ledu (2016), ou intermédiaire – au diagnostic incertain – si l'on considère le seuil de Delaporte *et al.* (2008).

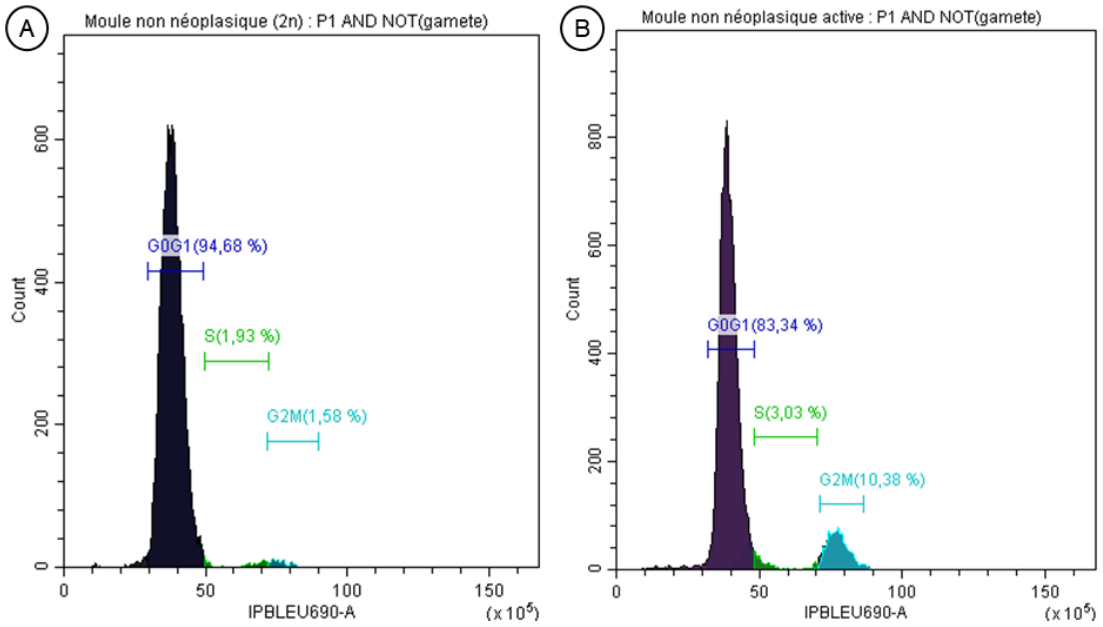


Figure 76 : Profils de cytométrie en flux donnant le pourcentage d'hémocytes dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) : (A) profil d'une moule non néoplasique avec 3,51 % des hémocytes en phase S-G2/M ; (B) profil d'une moule non néoplasique avec 13,41 % des hémocytes en phase S-G2/M. Les CV % de chacun des pics sont ≤ 10 %.

Ces mêmes auteurs ont également établi un pourcentage seuil d'individus anormaux à l'échelle d'une population spécifiant l'atteinte de cette population par la néoplasie hémocytaire. Il a été fixé à 6 % pour une population de moule (Benabdelmouna & Ledu, 2016) et à 15 % pour une population de mye (Delaporte *et al.*, 2008). Ici, pour chacune des moules analysées entre février et mai 2019, les pourcentages de la phase S et de la phase G2/M ont été additionnés et sont illustrés par la Figure 77.

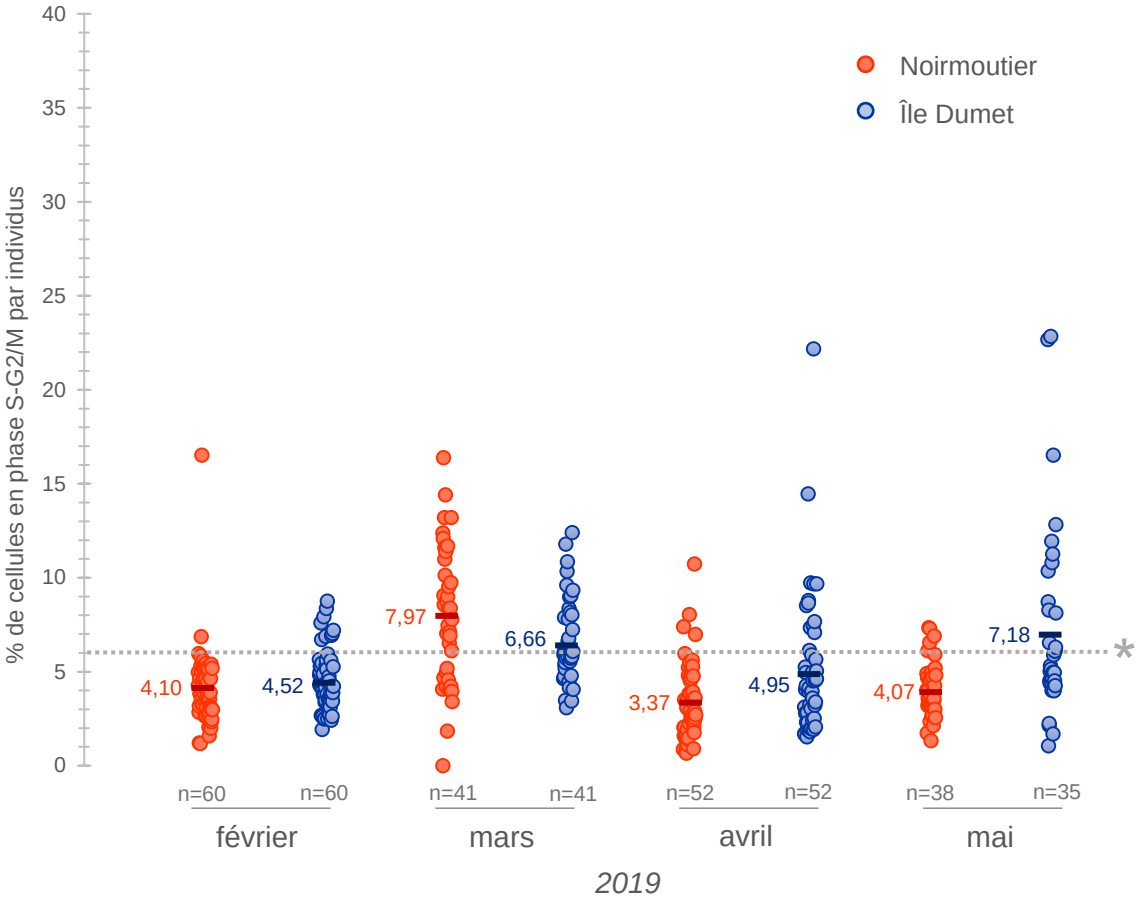


Figure 77 : Pourcentages de cellules en phase S-G2/M pour chacune des moules des deux stocks analysées entre février et mai 2019. A chaque mois, et pour chacun des stocks, les pourcentages moyens de cellules en phase S-G2/M sont indiqués ainsi que les effectifs analysés en cytométrie en flux (n). * seuil de population de 6 % ayant plus de 10 % d'hémocytes en phase S-G2/M défini par Benabdelmouna & Ledu (2016)

Pour les moules originaires de Noirmoutier, le pourcentage moyen de cellules en phase S-G2/M sur toute la période étudiée était de 4,88 % avec un pourcentage mensuel moyen maximal égal à 7,97 % en mars. Pour les moules nées à l'île Dumet, le pourcentage moyen de cellules en phase S-G2/M entre février et mai 2019 était de 5,83 % avec un pourcentage mensuel moyen maximum en mai égal à 7,18 %.

Lorsque les moules sont classées en fonction de leur pourcentage d'hémocytes en phase S-G2/M (Tableau 21), on remarque que le mois de mars est le mois pour lequel les plus faibles pourcentages de moules ayant moins de 5 % de leurs hémocytes dans cette phase sont observés (29,3 % pour les deux stocks). En outre, ces deux stocks du mois de mars dépassaient le seuil de 6 % de la population ayant plus de 10 % d'hémocytes en phase S-G2/M défini par Benabdelmouna & Ledu (2016) ; c'est également dans ces moules que 70 % des individus avaient leurs hémocytes qui se trouvaient dans l'intervalle 5-15 % étant des cas intermédiaires ne permettant pas un diagnostic sur et pouvant inclure des faux-négatifs et/ou des faux-positifs. Les moules de mai, originaires de l'île Dumet, dépassaient également le seuil de population de Benabdelmouna & Ledu (2016) et possédaient des pourcentages plus moyens de moules ayant des hémocytes normaux (54,3 %) ou au diagnostic incertain (40 %).

Tableau 21 : Proportions de moules classées en fonction de leurs pourcentages d'hémocytes en phase S-G2/M. [*] seuil de population de 6 % ayant plus de 10 % d'hémocytes en phase S-G2/M défini par Benabdelmouna & Ledu (2016)

Origine	Mois	% moules avec % phase S-G2/M				
		< 5 %	**> 10 % [*]**	**compris [5-15] %**	**>15 %**	**> 20 %**
Noirmoutier	février	75,0 (45/60)	1,7 (1/60)	23,3 (14/60)	1,7 (1/60)	0,0
	mars	29,3 (12/41)	29,3 (12/41) > [1]	68,3 (28/41)	2,4 (1/41)	0,0
	avril	80,8 (42/52)	1,9 (1/52)	19,2 (10/52)	0,0	0,0
	mai	81,6 (31/38)	0,0	18,4 (7/38)	0,0	0,0
Ile Dumet	février	66,7 (40/60)	0,0	33,3 (20/60)	0,0	0,0
	mars	29,3 (12/41)	9,8 (4/41) > [1]	70,0 (25/41)	0,0	0,0
	avril	67,3 (35/52)	3,9 (2/52)	26,9 (14/52)	0,0	1,9 (1/52)
	mai	54,3 (19/35)	22,9 (8/35) > [1]	31,4 (11/35)	2,9 (1/35)	5,7 (2/35)

Parallèlement, les moules qui avaient une population ou deux d'hémocytes néoplasiques n'avaient pas une activité proliférative de leurs cellules diploïdes supérieure aux autres. En effet, les pourcentages de cellules en phase S-G2/M dans les individus néoplasiques étaient inférieurs à 10 % et en moyenne égaux à 4,9 %. De plus, les pics hyperploïdes, quelles qu'aient été leurs ploïdies, ne montraient pas d'activité de synthèse et de mitose.

4. Contamination chimique

Nous souhaitions avoir un minimum d'indications concernant la contamination chimique en éléments traces des moules d'Agon-Coutainville que nous avons suivies en 2019. Toutefois, ne pouvant pas réaliser des dosages à plusieurs temps de l'année, il a été décidé de réaliser cette mesure dans les lots prélevés au printemps (Tableau 22), puisque cela correspond à la période la plus propice aux mortalités. De plus, cette saison est intéressante du point de vue des contaminations au regard du lessivage des sols important qui peut intervenir.

Tableau 22 : Concentrations (mg/kg de poids frais) en éléments traces mesurés par ICP-MS dans les tissus de moules cultivées à Agon-Coutainville et prélevées en avril 2019.

Eléments traces	**[moules] avril 2019**
Cd (TN = 1.0)	0,066
Pb (TN = 1.5)	0,237
Hg (TN = 0.5)	0,012
Co	0,077
Cu	2,401
Cr	0,166
Fe	29,442
Mn	0,802
Mo	2,915
Ni	0,212
Zn	17,710
Ti	1,529
Sn	0,077
Al	210,333
As	3,329

TN : Teneur maximale fixée par le règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission européenne, modifié par les règlements (CE) n° 629/2008 et (CE) n° 420/2011

Les concentrations en éléments traces mesurées dans les moules d'avril 2019 sont faibles et n'illustrent aucune contamination chimique même si les concentrations en aluminium (Al) sont toutefois relativement élevées.

IV. Discussion, conclusions et perspectives

Tout d'abord, les expérimentations de mise en contact effectuées ici n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque transmission de la néoplasie entre individus. Le seul cas de transmission par cohabitation en laboratoire a été observé par Elston *et al.* (1988b) avec des moules initialement identifiées comme *M. edulis* mais qui s'avéraient être des *M. trossulus* (Brooks, 1991). Ces auteurs avaient fait cohabiter 20 moules provenant d'une population faiblement touchée par la maladie (prévalence < 4 %) avec 50 moules issues d'une population plus fortement atteinte (prévalence comprise entre 20 et 40 %), ce qui représente une proportion élevée de moules pouvant transmettre la maladie. De plus, ils ont observé une différence significative au bout de 160 jours (> 5 mois). En ce qui concerne les expérimentations réalisées ici, nous étions relativement éloignés de ces conditions, notamment du point de vue de la proportion d'animaux néoplasiques. En effet, nous avons été limités par leur présence dans les stocks étudiés. Ainsi, dans l'objectif de réaliser de nouveaux essais, il faudrait, autant que faire se peut, mettre en contact un plus grand nombre de moules néoplasiques (ratio 50/50 à minima) et les suivre sur une durée supérieure à 5-6 mois. De plus, afin de garantir un taux de survie maximal, il pourrait être utile de (i) nourrir les moules pendant la durée de la mise en contact et (ii) éviter de faire les expérimentations avec des moules prélevées en hiver, en pleine gamétogenèse avec des indices de conditions faibles. Effectivement, les taux de mortalité particulièrement élevés obtenus lors de la dernière expérimentation – réalisée avec des moules prélevées fin novembre – sont très probablement dus à ces deux raisons. Car, même si l'eau de mer utilisée provenait de l'environnement, le taux de renouvellement était insuffisant pour apporter la quantité de nourriture minimale vitale aux animaux, sans compter qu'à cette période de l'année (hiver) l'eau apportée devait très certainement être pauvre en ressource trophique (Cloern, 1996 ; Zupan & Saric, 2014). En outre, à cette période, les moules sont dans un état physiologique fragile puisqu'elles sont en fin de gamétogénèse et ont généralement consommé toutes leurs réserves énergétiques accumulées pendant l'été/automne. Ainsi, si l'on additionne la privation de nourriture à un état physiologique pré-ponte fragile, les mortalités sont en grande partie expliquées[102].

Ensuite, cette étude a permis d'identifier des prévalences significativement différentes de la maladie entre deux stocks de moules pourtant cultivées dans une même zone de production depuis plusieurs mois. Plusieurs études ont montré des différences de croissance,

[102] Parallèlement à ces expérimentations, d'autres moules de Normandie et d'ailleurs, étaient conservées en aquariums au laboratoire et étaient immergées dans l'eau naturelle utilisée à ce moment-là. Aucune mortalité similaire n'a été observée sur ces dernières écartant ainsi la piste de l'implication de l'eau de mer dans les mortalités.

de résistance et de mortalité entre plusieurs stocks de moules qui avaient des origines différentes et qui avaient été disposées dans une même zone de grossissement (Dickie *et al.*, 1984; Mallet *et al.*, 1986, 1987; Fuentes *et al.*, 1994). Ces auteurs ont clairement associé ces variations aux critères génétiques des populations et de leur capacité, au fil de plusieurs générations, à s'adapter à un milieu plus ou moins hostile. Parallèlement, on sait désormais que la côte atlantique française est très complexe du point de vue de la génétique des populations, et que plusieurs zones d'hybridation existent entre des populations de *M. edulis* et de *M. galloprovincialis* (Bierne *et al.*, 2003; Riquet *et al.*, 2017). L'île Dumet se trouve d'ailleurs dans l'une des zones hybrides dessinées par ces auteurs. Ainsi, il est possible que le patrimoine génétique des deux stocks de moules utilisés soit différent et soit impliqué dans les variations de la survenue de la néoplasie hémocytaire. En outre, on ne peut ignorer le rôle que pourrait jouer l'environnement initial de captage des animaux ; cependant, une fois dans un environnement commun, les prévalences entre les différentes populations devraient s'homogénéiser au cours du temps tandis qu'elles conservent leur différentiel de prévalence et varient proportionnellement. Une question se pose alors, est-ce que les moules de certaines populations développeraient plus spécifiquement la néoplasie ? Ou bien seraient-elles plus réceptives à un cancer transmissible ? Car en effet, la nature de la maladie observée ici se pose également suite aux découvertes d'un cancer transmissible entre espèces (Metzger *et al.*, 2015, 2016) et à l'observation de cancer *M. trossulus* dans *M. edulis* (Riquet *et al.*, 2017 ; Burioli *et al.*, 2019).

D'autre part, les pourcentages de moules atteintes semblent varier entre les générations, mais également avec la saison. Dans l'ensemble, les résultats obtenus ici vont dans le sens des observations de Mix (1983) qui mettaient en évidence des taux élevés en hiver et faibles (voire nuls) en été. Toutefois, les résultats du suivi de fin 2018 l'ont mieux démontré que celui de 2019 dans la mesure où, en février, les prévalences sont aussi faibles qu'en été ; par conséquent, les résultats qui seront obtenus durant la fin de l'année 2019 permettront une meilleure appréciation de la saisonnalité. En outre, il apparait nécessaire de modérer le terme « élevé » puisque les prévalences maximales observées lors des deux suivis étaient de (i) 7 % et 4 % au mois de décembre 2018, respectivement pour les animaux originaires de l'île Dumet et de Noirmoutier, (ii) 5 % et 2 % au mois d'avril 2019, respectivement pour les moules captées à l'île Dumet et à Noirmoutier ; ce qui reste donc relativement éloigné des 20 % observés par Mix (1983). Cela semble également corroborer les indications de Bower (2006) qui précisait que l'intensité de la maladie semblait augmenter avec l'âge. En effet, pour le suivi de fin d'année 2018, les moules avaient plus de 18 mois et avaient des prévalences plus élevées que les moules du suivi de 2019 qui, en février, avaient moins de 12 mois et des prévalences plus faibles. Cependant, comme précisé à la fin de la section III.1. (p. 97), les résultats qui seront obtenus pour les derniers mois de 2019 permettront plus

fidèlement d'étayer ou non cette observation d'une potentielle augmentation de la prévalence avec l'âge. Deux approvisionnements différents ont été suivis ici et cela permet de contraster la présence de la maladie dans une fin de stock et dans un nouveau stock. A l'avenir, il pourrait être intéressant de mesurer la prévalence de la néoplasie dès l'arrivée des moules sur la zone de production.

Enfin, si l'on considère tous les stocks suivis en 2018 et en 2019, sans considérer l'origine de captage, la prévalence moyenne de moules néoplasiques est de 2,8 %, ce qui est relativement faible et correspond aux différentes observations faites dans plusieurs populations de moules d'Europe (prévalence < 4 % ; Bower, 2006; Carballal *et al.*, 2015). A ces taux faibles n'ont pas été associées de mortalités anormales et cette absence de surmortalité a également été reportée par le mytiliculteur qui cultivait les différents stocks suivis ici en 2018 et en 2019. En outre, malgré une difficulté évidente d'estimation des pertes subies[103], le mytiliculteur n'a jamais observé de différence de mortalité entre les moules « classiques » et les moules de pelisse sur une saison d'une année. Toutefois, il expliquait qu'à la différence des moules « classiques », les moules de pelisse doivent préférentiellement toutes être récoltées au plus tard à la fin de la saison normale n+1 (décembre) et ne doivent pas être utilisées pour faire des moules de 2 ans, récoltées et commercialisées en tout début de saison n+2 (juin). En effet, il mentionnait que les capacités de croissance et de rendement étaient nettement réduites chez les moules de pelisse de plus de 18 mois alors que c'est, au contraire, leur intérêt par rapport aux moules « classiques », lorsqu'elles ont moins d'un an (Benoit Clouet, com. pers., septembre 2019)

Par ailleurs, l'analyse par cytologie de l'hémolymphe a permis d'observer différentes choses qui n'étaient pas spécifiquement recherchées de prime abord. D'abord, le fait d'avoir observé la « contamination » des préparations cytologiques par des gamètes ou des cellules germinales lors des suivis laisse supposer deux choses. La première est que, grâce aux pourcentages de « contamination », on remarque que les mois de mars et avril apparaissent comme étant les mois qui correspondent au pic de maturité et de ponte dans les moules de Normandie. Mais de manière plus intéressante, des gamètes ont également été observés en faible proportion dans des préparations cytologiques de moules prélevées au mois d'octobre. Cela signifie donc qu'un certain pourcentage des animaux, même faible, est mâture et en capacité de pondre à l'automne. Et cela a déjà été observé dans d'autres populations de *M. edulis* vivant dans les eaux froides même si ce phénomène est peu courant et reste un épisode minime par rapport à la ponte du printemps (Gosling, 1992). La seconde est que le fait d'avoir observé des « *clusters* » de cellules germinales et des structures de types « morulae »,

[103] Ce qui peut probablement expliquer le différentiel avec les taux de mortalité observés par le réseau Mytilobs.

indique qu'il pourrait exister une voie atypique de la spermatogenèse chez les Mytilidae, à l'instar de ce qui a été observé chez les Unionidae (Chatchavalvanich *et al.*, 2006 ; Shepardson *et al.*, 2012 ; Labecka & Domagala, 2019).

Pour finir, les analyses faites en CMF ont permis d'effectuer plusieurs constats. Le premier est l'absence d'un caractère prolifératif des hémocytes néoplasiques ce qui contraste avec les observations faites par plusieurs auteurs chez *M. trossulus* (Elston *et al.*, 1990 ; Moore *et al.*, 1991), chez *M. arenaria* (Reno, House & Illingworth, 1994) ou encore chez *C. edule* (da Silva *et al.*, 2005), mais qui est en accord avec celles faites chez *M. edulis* par Burioli *et al.* (2019). En effet, il n'a pas été observé de pic S-G2/M associé à un pic hyperploïde et dans les rares cas d'obtention de deux pics hyperploïdes, la ploïdie du second pic hyperploïde ne correspondait pas au double de la ploïdie du premier. *A contrario*, c'est ce qu'ont observé Elston *et al.* (1990) avec une population d'hémocytes 10n associée à une population 5n, *idem* pour le couple de ploïdies 4n/8n. Par conséquent ici, et c'est notamment l'hypothèse formulée par Burioli *et al.* (2019), il semble que les cellules néoplasiques prolifèrent ailleurs que dans l'hémolymphe.

Le second est l'observation de plusieurs populations d'hémocytes néoplasiques se distinguant par leurs ploïdies. Ceci a d'ailleurs plusieurs fois été observé par le passé et trois populations se distinguent de par leur ploïdie : une pentaploïde (5n/10n), une tétraploïde (4n/8n) et une triploïde/hexaploïde (3n/6n) (Elston *et al.*, 1990 ; Moore *et al.*, 1991 ; da Silva *et al.*, 2005 ; Le Grand *et al.*, 2010). Pour Elston *et al.* (1990) et Moore *et al.* (1991), les formes 5n et 4n sont deux maladies distinctes coexistantes dans les populations avec la forme pentaploïde qui est la plus courante. Ces auteurs précisent également que dans de rares cas, les deux formes peuvent être simultanément retrouvés dans des animaux néoplasiques. Nos résultats ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer s'il s'agit de deux types de néoplasies distinctes, mais concernant les formes retrouvées, nos observations sont en accord avec ces descriptions. En effet, bien que nos effectifs de moules néoplasiques analysées en CMF soient faibles, l'hyperploïdie qui a été la plus observée est la ploïdie 10n et dans 2 cas sur 12, les deux formes penta- et tétra-ploïdes ont été constatées dans un même individu (pic 8n + pic 10n ; pic 10n + pic 16n). La troisième forme, correspondant à la population triploïde/hexaploïde (3n/6n), a été observée chez la coque par da Silva *et al.* (2005), en parallèle de la population pentaploïde, et par Le Grand *et al.* (2010) qui ont associé des degrés d'atteinte à la ploïdie. En effet, ils indiquent que les coques faiblement atteintes présentaient une ploïdie unimodale 4n tandis que celles fortement touchées présentaient une ploïdie bimodale 3n et 5n. Dans notre étude, 3 individus sur 12 présentaient une hyperploïdie de 12n correspondant donc à une population hypertriploïde, mais aucune n'était retrouvée dans une néoplasie bimodale. De plus, concernant la bimodalité de l'hyperploïdie et les degrés de néoplasie, nous ne pouvons

pas ici établir un lien dans la mesure où (i) nos effectifs sont trop faibles, (ii) nous avons certes observé une néoplasie bimodale (pic 8n + pic 10n) dans l'individu le plus néoplasique (à 90,4 %), mais nous avons également observé une néoplasie bimodale (pic 10n + pic 16n) et unimodale (pic 10n) pour les deux individus qui arrivent en second parmi les moules les plus touchées (à 60,9 % et 62,9 %, respectivement). Aussi, et dans le but de lier les observations cytologiques et cytométriques, il serait intéressant de voir s'il existe un lien entre la ploïdie et la morphologie des hémocytes. Au regard de nos résultats, il ne semble pas y avoir de lien entre le type P ou U des cellules néoplasiques et une quelconque ploïdie, ou « familles » d'hyperploïdies (tri-, tétra-, penta-). En effet, dans onze des douze analyses exploitables de CMF, toutes les « familles » d'hyperploïdies sont retrouvées pour un même type P décrit en cytologie. Cependant, au vu de nos effectifs, il parait difficile de se positionner quant à l'absence de lien et il parait utile d'augmenter le jeu de données afin de tester statistiquement ce lien.

Enfin, le troisième et dernier constat possible grâce aux analyses en CMF concerne l'étude du cycle cellulaire associé au pic diploïde. A l'instar des hémocytes néoplasiques, les hémocytes normaux des moules partiellement néoplasiques ne montraient pas d'activité proliférative particulière. Ceci corrobore l'hypothèse de Burioli *et al.* (2019) qui suggère l'existence de « niches » dans les lacunes du tissu conjonctif dans lesquelles les cellules prolifèreraient activement plutôt que de proliférer directement dans le compartiment hémolymphatique. *A contrario*, certains individus avaient un caractère prolifératif plutôt intense, avec un pourcentage de cellules en phase S-G2/M élevé, sans pour autant présenter d'hémocytes anormaux en cytologie et hyperploïdes en CMF. Cela n'a pas non plus été annonciateur d'une élévation significative de la prévalence de la néoplasie dans les populations suivies ni même de mortalités massives. Ainsi, nos résultats ne concordent pas avec ceux de Benabdelmouna & Ledu (2016) qui associent la présence de plus de 10 % d'anomalies génétiques (phase S-G2/M et aneuploïdie) dans plus de 6 % des animaux d'une population à des surmortalités de moules. En revanche, ils semblent plutôt s'accorder avec ceux de Delaporte *et al.* (2008) chez la mye, qui ont établi que les individus comportant entre 5 % et 20 % de cellules en phase S-G2/M représentaient des cas intermédiaires ne permettant pas un diagnostic certain et pouvant inclure des faux-négatifs et/ou des faux-positifs. Dans la mesure où des pourcentages importants de moules (~70 %) avaient entre 5 % et 15 % de cellules en phase S-G2/M au mois de mars, cela pose donc question quant à leur diagnostic. Etant donné qu'aucune mortalité massive n'a été observée, il est très probable que les moules qui présentaient un caractère prolifératif élevé à cette période-là, entrainant le dépassement du seuil de population de 6 % fixé par Benabdelmouna & Ledu (2016), représentaient, au moins en partie, des faux-positifs. Il pourrait donc être nécessaire de ré-évaluer ce seuil ou du moins, de le considérer conjointement à des pourcentages seuils supplémentaires établis par

d'autres auteurs chez d'autres espèces, comme chez la mye. Par exemple, Reno *et al.* (1994) avaient établi qu'au-dessus de 15 % d'hémocytes en phase S-G2/M, les animaux étaient considérés comme anormaux et néoplasiques, ce qui dans notre cas pourrait être plus adapté. En outre, la « limite haute » de pourcentages de cellules en phase S-G2/M définissant un individu anormal néoplasique (10 %, 15 %, 20 % selon les auteurs) semble être importante mais la « limite basse » également. Effectivement, comme l'intervalle [5-15] %, le seuil de 5 % de cellules en phase S-G2/M pour définir un animal comme normal et sain (Reno *et al.*, 1994 ; Delaporte *et al.*, 2008) semble être indicateur du « statut hémocytaire » d'une population. Par exemple, toujours pour le mois de mars, le pourcentage de moules ayant plus de 10 % de cellules en phase S-G2/M donne une indication sur « l'état » des hémocytes, mais le seuil < 5 % (ou l'intervalle [5-15] % d'ailleurs), apporte un complément d'information non négligeable. En effet, on remarque notamment qu'en mai, 54 % des individus originaires de l'île Dumet sont classés comme normaux et sains (%S-G2/M < 5 %) malgré 23 % d'individus anormaux (%S-G2/M > 10 % ; d'après Benabdelmouna & Ledu, 2016) tandis qu'en mars, seulement 30 % des moules sont définies comme saines (pour les deux origines), avec seulement 10 % de moules anomales pour celles venant de l'île Dumet et 30 % pour celles nées à Noirmoutier. Ainsi, le seuil < 5 % (Reno *et al.*, 1994 ; Delaporte *et al.*, 2008) ou l'intervalle [5-15] % semblent plus homogènes et mieux adaptés ici.

Quoi qu'il en soit, cet état prolifératif élevé des hémocytes en mars, et ce, dans les deux stocks sans distinction aucune, indique une perturbation d'ordre physiologique et/ou pathologique. La prolifération des hémocytes et l'augmentation du nombre d'hémocytes circulants ont été observées par certains auteurs comme étant une réponse des moules à un stress environnemental (Pipe *et al.*, 1999). En effet, cela a notamment été observé lors d'expositions à des contaminants à des doses environnementales, comme le cuivre ([0,02-0,05] µg/mL, Pipe *et al.*, 1999) ou le cadmium ([40-400] µg/mL, Coles *et al.*, 1995) mais également lors de stress thermiques (Renwrantz, 1990). En outre, Mayrand *et al.* (2005) ont observé qu'à la suite d'un événement climatique stressant (pluies, vents et courants forts, avec remise en suspension des sédiments), la viabilité des hémocytes était impactée entrainant une réponse rapide des cellules (1-4 jours) avec notamment l'augmentation de l'activité mitotique des hémocytes circulants. Aussi, comme indiqué dans l'Introduction générale (I.2.g. p. 37), les hémocytes sont impliqués dans des fonctions essentielles autres que l'immunité, telles que la nutrition, l'osmorégulation, ou plus généralement l'homéostasie (Hine, 1999) ; ainsi nous ne pouvons exclure qu'un besoin d'ordre physiologique impacte la prolifération des hémocytes à un moment donné. Le fait d'observer des pourcentages élevés de cellules en phase S-G2/M au mois de mars, et identiques pour les deux stocks de moules, coïncide avec la période de

reproduction, qui est une période propice aux infections [104] puisque les animaux sont vulnérables. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les animaux sollicitent plus intensément leurs défenses immunitaires à cette période ne peut être écartée.

En définitive, certains facteurs endogènes ou exogènes impactant la concentration des hémocytes dans l'hémolymphe ont été identifiés par certains auteurs mais les mécanismes impliqués restent encore inconnus. Dans ce contexte, l'hypothèse selon laquelle un événement plus ou moins stressant se serait produit au mois de mars, entrainant une réaction du système immunitaire, et donc un taux élevé de prolifération des hémocytes, peut être formulée. Par ailleurs, tant que l'hématopoïèse ainsi que le tissu hématopoïétique ne seront pas identifiés chez les bivalves, le pourcentage normal de cellules en phase S-G2/M chez une moule saine reste indéterminé. Cela facilite alors les erreurs de diagnostic avec des sur- ou sous-estimations de processus néoplasiques. Parallèlement, nous avons vu qu'il existait un « taux basal » relativement faible de la néoplasie au sein de certaines populations cultivées en Normandie qui ne semblent pas impacter sur la mortalité des animaux.

.

[104] C'est d'ailleurs uniquement à cette période que des lames cytologiques contenant des bactéries ont été observées.

DISCUSSION GENERALE

L'étude *in situ* des mortalités de moules est un travail ardu tant les facteurs potentiellement impliqués sont nombreux et leur nature variée, notamment en raison du milieu naturel et ouvert dans lequel les moules évoluent. Un travail conséquent et réalisé récemment a mené à l'élaboration d'une revue systématique de la littérature dans laquelle sont recensés tous les facteurs de risque de mortalité des moules (Lupo *et al.*, 2019). Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ne permettent évidemment pas de discuter l'intégralité des facteurs identifiés mais apportent toutefois quelques éléments permettant d'étayer ou de nuancer l'implication de certains de ces facteurs.

Avant de discuter des paramètres impliqués dans les mortalités de moules, il parait important de discuter de la définition même du terme de « mortalité ». Ainsi, la Directive européenne du 24 octobre 2006 (2006/88/CE) et l'Arrêté ministériel du 4 novembre 2008 (NOR: AGRG0825593A) définissent une « hausse de la mortalité » comme un « accroissement inexpliqué et significatif de la mortalité au-delà du niveau considéré comme normal pour la ferme aquacole ou la zone d'élevage de mollusques concernés dans les conditions habituelles ; le niveau d'accroissement à désigner comme une hausse de la mortalité doit être convenu par l'exploitant et l'autorité compétente »[105]. Cette définition, particulièrement ambigüe, jette un flou sur la définition de mortalités « normales » et « anormales »[106]. Ensuite, cela suppose que les mytiliculteurs soient en capacité de quantifier leurs stocks, et donc leurs pertes, ce qui des dires de plusieurs mytiliculteurs est particulièrement difficile, pour ne pas dire impossible. Et cela se conçoit : comment sur des milliers de pieux, des kilomètres de bouchots, des milliards de moules, peuvent-ils s'apercevoir de pertes de plusieurs dizaines de kilogrammes de moules, dispersées aléatoirement sur leurs pieux ? Ceci sur le temps restreint de la marée tandis qu'ils ne se rendent sur leurs bouchots que lors des marées à grands coefficients en période de « hors saison » (et lorsque les conditions météorologiques ne les empêchent pas de s'y rendre). En outre, les systèmes de production rendent en eux-mêmes l'estimation difficile ; les cordes de moules ne sont pas retravaillées comme peuvent l'être les poches en ostréiculture, et les animaux morts passent plus facilement inaperçus sur les bouchots ou les filières que dans des poches à huîtres. Aussi, comment savoir si les pertes observées sont dues à un organisme pathogène, un prédateur, ou des conditions météorologiques particulières ? Par conséquent, il est évident que les mytiliculteurs ont de grandes difficultés à estimer leur stock en cours de production et des mortalités ont toujours été observées depuis des décennies, mais rien d'assez conséquent pour mettre à mal la production finale (Benoit Clouet *et al.,* com. pers, 2018, 2019). Ainsi, la

[105] https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000019732816&categorieLien=id

[106] La subjectivité de cette définition et les biais d'appréciation que cela engendrait étaient déjà soulignés par Lupo *et al.* (2012) à la suite des mortalités massives observées depuis 2008 chez l'huître creuse (*C. gigas*).

question des mortalités « normales », quelles qu'en soient les raisons, ne s'était jamais réellement posée. C'est seulement lorsque des mortalités massives[107] ont frappé certains élevages en 2014 (Béchemin *et al.*, 2015 ; Allain & Bernard, 2016 ; Travers *et al.*, 2016b ; Bernard & Allain, 2017), que la question de la qualification et de la quantification des mortalités de moules s'est posée. A partir de là, il apparaissait nécessaire d'estimer et de quantifier les mortalités « normales » ou « habituelles » et de les distinguer des mortalités « anormales » ou « inhabituelles », même si l'exercice est apparu relativement difficile, spécifiquement pour les professionnels eux-mêmes. Néanmoins, grâce aux données du réseau REMOULA de l'Ifremer, Robert *et al.* (2016) ont pu établir un « référentiel de qualification des mortalités » (Figure 78). Si bien que, d'après ce référentiel, des mortalités allant jusqu'à 22 % de la production sont considérées comme normales par les professionnels et par les centres techniques qui suivent les productions de certains bassins mytilicoles en France (Ifremer, Smel, Smidap, Creaa). En outre, la mise en place au cours de ces dernières années, de poches ou de lanternes contenant des moules dans différents sites de production a permis aux différents organismes (Ifremer/Mytilobs, observatoires des CRC) de mieux estimer les pertes et d'affiner les taux (en écartant, théoriquement, les pertes par prédation). Dès lors, il est désormais plutôt bien établi que des mortalités avoisinant les 15-20 % de la production sont considérées comme normales. Il apparait alors que la définition – désuète car abrogée par celle de 2006 – de la Directive du 22 décembre 1995 (Directive 95/70/CE, 1995) qui définissait une « mortalité anormale constatée » comme « une mortalité subite qui affecte approximativement 15 % des stocks […] » ne soit finalement pas si obsolète et serait même plus adaptée que celle de la Directive de 2006 (du moins, pour les moules).

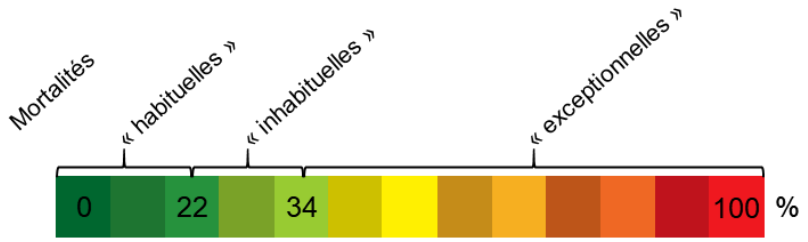


Figure 78 : Référentiel de qualification des mortalités établi grâce aux données du réseau REMOULA 2000-2010 de l'Ifremer. Figure modifiée d'après celle de Robert *et al.* (2016, p. 52).

Dans le cadre du suivi des moules de Bretagne Nord (Partie 1A), nous avons d'ailleurs constaté que des taux de mortalités inférieurs à 20 % étaient en effet admis comme habituels. Aussi, des disparités évidentes entre les mortalités et les risques de mortalité, ont été observées entre les différents sites étudiés. Nous avons vu qu'il existait des différences entre

[107] Dans ces cas-là, les pertes étaient alors tellement importantes qu'elles étaient flagrantes pour les mytiliculteurs.

les profils thermiques, la contamination des sites et les mortalités de moules qui y étaient constatées sans pour autant faire un lien entre ces paramètres. En effet, hormis les moules de Brest, qui se distinguaient des moules des autres sites par une contamination au plomb, d'autres montraient des concentrations élevées en aluminium et/ou en fer comme les moules cultivées à Saint-Brieuc, à l'Aber-Wrac'h ou encore à Agon-Coutainville. Pour autant, ces sites présentaient des taux de mortalités modérés ou « habituels ». Ainsi, il est très probable que cela cause des perturbations au niveau subcellulaire comme l'ont observé certains auteurs (Moschino *et al.*, 2016; Passarelli *et al.*, 2018). Néanmoins, ce paramètre semble, à lui seul, insuffisant pour engendrer des surmortalités. Par ailleurs, un « effet site » semble assez évident depuis le début des mortalités anormales puisque des moules provenant d'une même zone de captage (Noirmoutier, Charron, ou La Plaine-sur-Mer par exemple) et cultivées dans des sites de grossissement différents (en Normandie et en Bretagne) ne sont pas touchées par les mortalités avec la même intensité. Toutefois, la géomorphologie du littoral et tout ce que cela implique (renouvellement des masses d'eau, salinité, apports d'eau douce, richesse en matière en suspension, etc.) est différente entre les sites (notamment entre les baies et les estrans qui sont entièrement ouverts sur la mer) ; et comme le souligne Lupo *et al.* (2019), les caractéristiques des sites présentant des mortalités variées n'ont pas nécessairement été établis dans les différentes études. Aussi, et comme mentionné dans la discussion de la Partie 1B (p. 159), le « contexte » des mortalités peut, dans certains cas, avoir son importance. Plus généralement, il pourrait être utile que les pertes déclarées fassent l'objet d'une sorte de « pré-expertise » par un représentant des institutions (Ifremer, CRC) ; celle-ci pourrait résulter d'une observation rapide et « grossière » des moules sur place[108] et d'un échange avec le mytiliculteur à la suite de ses observations « de terrain »[109]. De telle manière, lorsqu'elle est aisément identifiable comme étant liées aux conditions climatiques, météorologiques, ou à la prédation, elle ne devrait pas faire l'objet d'une déclaration dans le cadre du REPAMO. En effet, l'objectif de ce réseau est « de détecter et d'identifier le plus précocement possible les agents pathogènes infectieux associés aux épisodes de mortalité des mollusques marins afin d'aider l'autorité compétente à mettre en œuvre, si cela est possible, des actions visant à limiter la propagation des maladies. »[110]. En conséquence, cela permettrait de recentrer les efforts de recherche autour des mortalités à caractère réellement infectieux et véritablement inexpliquées, du moins, de prime abord.

[108] Ceci permettrait, par exemple, de constater la présence de vase ou de sédiment dans les animaux.

[109] Lorsque l'on discute avec les mytiliculteurs, on peut notamment se rendre compte qu'ils sont particulièrement au fait de l'orientation des vents qui sont survenus et de ce que cela implique, des prédateurs présents sur leurs concessions, et qu'ils ont eux-mêmes observés, etc. Ainsi, on ne peut avoir meilleure observation de ce qu'il se passe concrètement sur le « terrain ».

[110] https://wwz.ifremer.fr/sg2m/Laboratoire-de-Genetique-et-Pathologie-des-Mollusques-Marins/Surveillance/REPAMO

D'après Saulnier *et al.* (2007), les causes de l'émergence d'une maladie sont diverses et font intervenir plusieurs facteurs de façon intercurrente généralement dans un contexte de « rupture écologique ». Ils ont identifié quatre grands compartiments biotiques et abiotiques potentiellement impliqués : (i) les facteurs anthropiques (pollution, pratiques et techniques d'élevage), (ii) l'environnement (dérèglement d'un écosystème), (iii) l'hôte (fragilisation ou transfert de maladies entre espèces), et (iv) l'agent pathogène (mutation, acquisition de nouveaux facteurs de virulence).

D'abord, étudier spécifiquement l'implication des techniques d'élevage ou de la pollution dans les mortalités, ne faisait pas partie des objectifs principaux de ce travail de thèse et il est donc difficile de conclure sur ces facteurs. Néanmoins, comme décrit précédemment, dans le cas des sites pour lesquels nous avons des données, aucune différence marquée sur les contaminations n'est ressortie hormis pour le plomb à Brest, mais cela nécessiterait une étude plus approfondie afin d'apprécier son rôle dans les mortalités élevées[111]. Aussi, il est très probable que, si des contaminations anormalement élevées étaient apparues, elles auraient été relevées par le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique (ROCCH) de l'Ifremer. D'autre part, pour ce qui est des techniques d'élevage, hormis une différence probable mais très difficilement quantifiable de pertes par prédation, il apparait difficile avec les données existantes de faire un lien entre mortalités et méthodes d'élevage utilisées (bouchots/filières).

Ensuite, l'étude des effets des conditions climatiques ne faisait pas non plus partie des objectifs de ce travail. Cependant, bien qu'il soit aisé de conclure quant à l'implication directe de températures très élevées ou très faibles, dans des surmortalités observées pendant des étés caniculaires ou des hivers rudes[112], il apparait essentiel d'estimer l'impact de faibles modifications des paramètres environnementaux. En effet, dans un contexte de changement global indéniable, nous savons que des perturbations comme 1 °C ou 0,5 unité pH peuvent avoir des conséquences majeures sur certains biotopes et sur les biocénoses associées. De ce fait, les moules faisant partie intégrante d'un écosystème, et étant totalement dépendantes du bon état de celui-ci, il apparait essentiel que des études évaluent ces paramètres sur la santé des populations ; ceci plus particulièrement dans un contexte où ce critère est le moins

[111] D'autant plus que la présence de plomb dans l'eau de mer a été identifiée par Lupo *et al.* (2019) comme étant un facteur d'exposition associé à une augmentation du risque de mortalité chez *M. galloprovincialis*.
[112] Ce qui ne fut d'ailleurs pas le cas sur la durée de ce travail de thèse.

étudié quant à son rôle comme facteur de risque dans les mortalités de moules (Lupo *et al.*, 2019).

Enfin, concernant l'hôte, les travaux réalisés dans les Parties 2 et 3, soulignent l'existence de différences entre les populations de moules exploitées selon leur origine de captage. En effet, les moules de pelisse nées à l'île Dumet, se sont, à plusieurs reprises, distinguées des autres populations, que ce soit au regard de la robustesse face à un organisme pathogène bactérien (dans un contexte d'infections expérimentales), ou que ce soit en matière de prévalence d'une maladie (la néoplasie hémocytaire). L'existence de stocks naturels aux capacités de croissances supérieures, ou plus résistants aux mortalités, ont déjà été mis en évidence par certains auteurs dans des conditions d'élevage réalistes (Dickie *et al.*, 1984 ; Mallet *et al.*, 1987 ; Fuentes *et al.*, 1994). D'autres auteurs ont également observé des disparités du point de vue des mortalités chez des moules issues de croisements réalisés en laboratoire puis disposées dans le milieu (Mallet *et al.*, 1986 ; Fuentes *et al.*, 2002 ; Dégremont *et al.*, 2019) ou conservées en milieu contrôlé (Benabdelmouna *et al.*, 2018a). Certains ont relié cela aux « traits de vie » des populations, d'autres à l'héritage génétique ou au génotype ; cependant, les observations entre les différences de mortalité entre des moules au génotype « pur » (*edulis* ou *galloprovincialis*) et des moules hybrides (*edulis*/*galloprovincialis*) sont variables entre les auteurs (Fuentes *et al.*, 2002 ; Lowen, 2008; Travers *et al.*, 2016b ; Benabdelmouna *et al.*, 2018a). Lowen (2008), quant à lui, a observé des différences entre deux populations de moules d'espèces différentes (*M. edulis* et *M. trossulus*) et leurs hybrides, au niveau de l'allocation de l'énergie dans des processus physiologiques. En effet, *M. edulis* dédiait majoritairement son énergie à la croissance quand *M. trossulus* la dévouait principalement à la reproduction ; les hybrides quant à eux, allouaient manifestement de l'énergie à la croissance, et l'énergie dédiée à la reproduction était variable et aléatoire. Nous avons vu que la période de reproduction était une étape cruciale du cycle annuel des moules, particulièrement impliquée dans les mortalités, comme l'avaient d'ailleurs indiqué Soletchnik & Robert (2016). Effectivement, le coût énergétique de la gamétogénèse et surtout de la ponte, est très élevé rendant ainsi les animaux fragiles, avec un indice de condition faible, et particulièrement vulnérables aux organismes pathogènes ou aux conditions environnementales stressantes (Bayne *et al.*, 1980 ; Bayne & Worrall, 1980 ; Najdek & Sapunar, 1987 ; Myrand *et al.*, 2000). De manière intéressante, Lowen (2008) a, quant à lui, fait le lien entre l'attribution de l'énergie à ces paramètres physiologiques et la mortalité en fonction de l'espèce[113]. Ainsi, le fait que l'île Dumet se trouve dans une zone hybride

[113] Le titre de sa thèse de doctorat est d'ailleurs relativement évocateur : « *To grow and survive or reproduce and die ? Life-history strategies and ecological interactions between the mussels Mytilus edulis and Mytilus trossulus in the Northwest Atlantic* ».

edulis/*galloprovincialis* (Bierne *et al.*, 2003 ; Riquet *et al.*, 2017) et que les moules avaient la particularité d'être des moules de pelisse[114], pose plusieurs questions : (i) est-ce qu'il existerait des populations naturelles hybrides *edulis*/*galloprovincialis* qui seraient plus résistantes que d'autres ? (ii) la récupération des moules de pelisse pourrait-elle finalement être une sorte de « sélection naturelle » d'individus plus résistants s'étant plutôt orientés dans des performances de croissance plutôt que dans le « maintien de l'espèce » et donc de reproduction ? (iii) le caractère hybride supposé pourrait-il jouer sur cette stratégie de survie ? Aussi, au sujet de la néoplasie hémocytaire (iv) est-ce que cette stratégie et/ou ce patrimoine génétique particulier pourrai(en)t influer sur l'aptitude à développer ou capter des cellules cancéreuses ? (v) quel est le réel impact d'une prévalence faible mais plus élevée de la néoplasie hémocytaire dans une population ? Les questions sont nombreuses et mériteraient évidemment que l'on s'y attarde, d'autant plus si cela peut fournir aux mytiliculteurs des stocks plus résistants issus du milieu naturel. Une étape initiale pourrait être de définir très précisément les introgressions *galloprovincialis* de plusieurs stocks *edulis* différents captés sur la façade atlantique et cultivés par un même mytiliculteur en suivant rigoureusement et régulièrement les mortalités afin d'établir s'il existe ou non une différence – jusque-là non identifiée – entre les origines.

Par ailleurs, en ce qui concerne la néoplasie hémocytaire, l'origine et le fonctionnement de cette maladie restent encore inconnus. Il y a plusieurs dizaines d'années, certains auteurs avançaient qu'il existait deux maladies en fonction de la ploïdie (Elston *et al.*, 1990 ; Moore *et al.*, 1991) et récemment, d'autres auteurs démontraient l'existence d'un cancer propre à l'hôte et d'un cancer transmissible inter-espèces (Metzger *et al.*, 2015, 2016). Dernièrement, certains auteurs ont mis en évidence la présence de « cancer *trossulus* » dans quelques individus issus de différentes populations de moules en France (Riquet *et al.*, 2017 ; Burioli *et al.*, 2019 ; Yonemitsu *et al.*, 2019) et malgré le fait qu'il n'ait pas été nommé comme tel à ce moment-là, « l'ascendance *trossulus* » décrite par Travers *et al.* (2016b) correspondait à ce cancer (Nicolas Bierne, com. pers, septembre 2019). Cette maladie est également présente en Normandie depuis au moins une dizaine d'années puisque récemment, elle a été identifiée dans des échantillons de moules prélevées à Chausey en 2009 (Yonemitsu *et al.*, 2019). Quelle que soit l'origine de cette maladie, son caractère pathologique est incontestable et l'issue des individus atteints est presque systématiquement fatale. En effet, dans la mesure où cette maladie perturbe la production d'hémocytes normaux, les fonctions essentielles occupées par ces derniers ne le sont plus. Ainsi l'homéostasie de l'animal est perturbée, tout comme ses capacités de défense face à un organisme pathogène ou sa résistance à une perturbation extérieure (Kent *et al.*, 1989 ; ICES, 2017). Par conséquent, cette maladie peut

[114] Elles avaient donc des capacités de croissance supérieures aux autres moules de la même cohorte.

avoir un rôle direct ou indirect dans la mort de certains individus ; toutefois les prévalences faibles dans les populations de moules bretonnes et normandes semblent limiter son rôle dans les mortalités massives.

Pour finir, nous avons vu tout au long de ce travail de thèse, que les moules étaient concernées par un grand nombre d'organismes pathogènes, dont quelques-uns sont plus facilement identifiables que d'autres. Certains peuvent être particulièrement néfastes pour les moules, et peuvent être la cause directe et évidente de la mort des animaux[115], quand d'autres, opportunistes, tirent avantage d'une situation de faiblesse physiologique, et agissent indirectement sur la mortalité.

Au sujet des *Vibrio*, ou plus particulièrement de *V. splendidus*, la grande difficulté est sa présence quasi systématique dans l'eau de mer et dans les mollusques, autrement dit son commensalisme, et ce quelles que soient les conditions (hormis peut-être la saison, Arias *et al.* (1999) ; Romero *et al.* (2014)). De plus, la grande diversité génétique des espèces du cluster Splendidus, et même du clade, révèle une certaine dynamique des communautés et complique considérablement les efforts pour élucider le rôle de ces bactéries dans les mortalités. En outre, le manque de données sur la présence normale et habituelle de ces bactéries dans les moules (soit hors mortalité), et plus particulièrement, sur leurs critères de virulence, rend difficile une possible conclusion quant à l'implication de ces *Vibrio* dans les mortalités qui surviennent chez les moules depuis 2014. Comme le mentionnaient Pépin *et al.* (2014) au sujet des surmortalités qui frappaient les huîtres creuses depuis 2008, les détections de *Vibrio* (*splendidus*, *aestuarianus*, et/ou *harveyi*) étaient très courantes dans les huîtres moribondes. Pourtant, ces auteurs précisaient également que cette simple présence ne suffisait pas à expliquer l'ampleur des mortalités sauf « à envisager une (ou des) mutation qui aurait favorisé une virulence ou des facteurs de virulence. ». Finalement, ils concluaient que les bactéries du clade Splendidus apparaissaient plutôt comme étant des opportunistes surinfectant des huîtres déjà affaiblies (notamment par une infection par OsHV-1). C'est ce qu'ont récemment montré de Lorgeril *et al.* (2018) en utilisant une approche holistique afin d'étudier plus précisément l'interaction hôte-pathogène(s). Ils ont mis en évidence qu'une première infection – par OsHV-1 – était nécessaire pour immunodéprimer l'hôte et laisser la possibilité aux bactéries opportunistes de provoquer une infection secondaire. Ainsi, il apparait donc que, même si le rôle potentiellement joué par *V. splendidus* n'est pas à ignorer, il est très

[115] C'est le cas notamment des trématodes, ou encore de *Marteilia* sp., qui sont parfois retrouvés dans des proportions d'infestation particulièrement intense. Comme nous l'avons vu, ceci est même parfois visible à l'échelle macroscopique pour les trématodes.

probable qu'un ou plusieurs autre(s) paramètre(s) soi(en)t impliqué(s) dans les mortalités massives qui touchent les moules.

Un premier paramètre à considérer pourrait être d'ordre physiologique, puisque comme nous l'avons vu, les mortalités sont presque systématiquement observées au printemps, ce qui correspond à la période de reproduction des moules, qui est bien connue pour être une période de fragilité. Cependant, une question se pose alors, pourquoi de nos jours, les moules meurent-elles lorsqu'elles se reproduisent alors que cela ne semblait pas être un problème majeur il y a encore quelques années ? Cela supposerait donc une moins grande résistance des animaux et nous revenons au point discuté plus haut.

Un second paramètre, cette fois d'ordre pathologique, pourrait être (i) un nouvel organisme pathogène, encore jamais décrit et toujours non identifié, ou (ii) un organisme pathogène déjà existant et identifié, mais non répertorié comme causant des mortalités chez les moules. Et plus généralement, non référencé comme responsable de mortalités chez d'autres bivalves, du moins en France, puisqu'actuellement non recherché (à la différence, par exemple, d'OsHV-1 ou de *V. aestuarianus* qui ont été, et sont encore, recherchés dans les moules par l'Ifremer). Assurément, nous n'excluons pas qu'il puisse exister un organisme pathogène inconnu et encore non identifié qui mette à mal la mytiliculture française, et les recherches méritent, incontestablement, d'être poursuivies. Néanmoins, à la suite de la détection d'une bactérie pathogène (*F. halioticida*) et d'un parasite apicomplexe, deux organismes encore jamais décrits chez les moules françaises, deux nouvelles pistes s'ouvrent et méritent d'être considérées dans le cadre de futures recherches sur les mortalités des moules. Premièrement, même si nous ne l'avons pas systématiquement détecté dans les cas de mortalités, des recherches supplémentaires doivent être menées sur l'existence d'un apicomplexe parasitant les moules. En effet, dans la mesure où ces parasites ont des cycles très complexes, ils pourraient ne causer des dommages chez les moules qu'à un moment précis de leur cycle. Aussi, ils pourraient très bien fragiliser et favoriser une infection secondaire comme l'a montré Hine (2002) chez les huîtres (*O. chilensis*), qui sont significativement plus touchées par une bonamiose lorsqu'elles sont sévèrement parasitées par des apicomplexes. Deuxièmement, la détection de la bactérie *F. halioticida* dans les moules françaises, de la pointe bretonne jusqu'au nord de la côte d'Opale, mérite sans conteste que l'on s'attarde sur cette bactérie lors de futures recherches. En effet, l'ADN de cette bactérie a été retrouvée à plusieurs reprises, en 2017 et en 2018, uniquement dans des moules provenant de sites qui subissaient des mortalités[116] tandis qu'elle n'a pas été détectée

[116] Sites touchés par les mortalités dans lesquels *F. halioticida* a été retrouvée (cf. Parties 1A et 1B) : Brest, Lannion, Donville-les-Bains, Agon-Coutainville, Dannes, Wimereux, Audinghen/Tardinghen et Oye-Plage.

dans les sites épargnés[117]. A notre connaissance, c'est la première fois en France que l'on détecte des bactéries du genre *Francisella*, toutes espèces marines confondues, élevées ou pêchées sur nos côtes. A la différence des *Vibrio*, ces bactéries ne sont pas commensales et n'ont été identifiées que dans des cas pathologiques ; ceci à plusieurs endroits dans le monde (Norvège, Costa Rica, Canada, Japon) et lors de mortalités observées chez des espèces appartenant à des rangs taxonomiques différents (poissons, gastéropodes, bivalves) (Olsen *et al.*, 2006 ; Soto *et al.*, 2009 ; Kamaishi *et al.*, 2010 ; Brevik *et al.*, 2011 ; Meyer *et al.*, 2017 ; Kawahara *et al.*, 2018, 2019). Comme déjà évoqué, ces bactéries sont difficiles à cultiver et nécessitent un milieu de culture spécifique, cela n'est donc pas surprenant qu'elles n'aient encore jamais été isolées sur les milieux de culture qui sont traditionnellement utilisés. En outre, cela pourrait être cohérent avec l'observation quasi systématique de certaines conditions histopathologiques (infiltrations hémocytaires mais surtout granulocytomes) sans cause identifiée dans les moules touchées, ainsi qu'avec la nature infectieuse des épisodes de mortalités massives qui ont touché la France. En effet, parmi les auteurs précédemment cités, certains ont mis en évidence un caractère particulièrement infectieux de *F. halioticida* puisqu'elle entraîne des mortalités chez la coquille Saint-Jacques et l'ormeau en quelques jours seulement, par injection mais également par cohabitation, et ceci à des concentrations bactériennes faibles, semblables aux charges bactériennes environnementales (Kamaishi *et al.*, 2010 ; Brevik *et al.*, 2011; Kawahara *et al.*, 2019). Nous savons désormais que cette bactérie est présente dans plusieurs sites mytilicoles touchés par des mortalités anormales, du nord de l'océan atlantique (Brest) à l'ouest de la mer du Nord (Oye-Plage) ; il reste maintenant à savoir si elle l'est également sur la façade atlantique, dans des secteurs qui sont ou ont été touchés par des mortalités massives de moules comme les pertuis charentais ou les Pays de la Loire. Dans ce contexte, il pourrait être envisageable que l'agent infectieux transmissible non identifié comme facteur de risque par Lupo *et al.* (2019) puisse être cette bactérie, *F. halioticida*, nouvellement détectée dans les moules des côtes françaises.

[117] Sites en Bretagne non touchés par des mortalités anormales : Aber-Wrac'h, baie de Saint-Brieuc, baie d'Arguenon, baie de la Fresnaye, baie du Mont-Saint-Michel.

CONCLUSION GENERALE

D'abord, l'utilisation d'une démarche multiparamétrique a permis d'avoir une vision d'ensemble des différents facteurs pouvant être impliqués dans les mortalités anormales. Nous avons vu que dans certains cas, de nombreux paramètres néfastes pour les moules pouvaient être présents simultanément : contaminants (Pb, Al), statut physiologique fragilisant (ponte), maladie (néoplasie) mais également et surtout, parasites divers, avec des potentiels de létalité différents (trématodes, *Marteilia* sp., *Mytilicola* sp., apicomplexes) et bactéries pathogènes et/ou opportunistes (*F. halioticida* et *V. splendidus*). *A contrario*, dans certaines autres situations, très peu de ces éléments étaient présents malgré des mortalités évidentes et dommageables pour les mytiliculteurs. L'arrivée du printemps coïncide presque systématiquement avec l'ouverture de la fenêtre de mortalité quel que soit le site concerné. Ceci suggère alors un rôle des paramètres biotiques et abiotiques (température, salinité, richesse trophique, etc.) qui varient à cette saison et qui influent sur l'état physiologique des moules. Nous avons également vu qu'un parasite apicomplexe a plusieurs fois été retrouvé dans certaines des moules des sites touchés par des mortalités, mais son impact sur l'hôte et son rôle dans les mortalités reste à établir. Enfin, dans les cas où aucun parasite n'était identifié, la présence de bactéries était en revanche quasi systématique. La grande diversité des souches existantes de *V. splendidus* ainsi que le manque évident de données concernant sa virulence chez les moules, ne permettent pas d'étayer l'hypothèse de son implication dans les surmortalités des moules ; du moins, pas en tant que cause directe. Néanmoins, nous n'écartons pas pour autant la piste d'un agent infectieux bactérien responsable de ces mortalités inexpliquées. En effet, pour la première fois en France, une bactérie d'un nouveau genre, *F. halioticida,* a été identifiée exclusivement dans des moules provenant de sites touchés par des mortalités anormales. Par conséquent, au vu du caractère contagieux et virulent répertorié des espèces du genre *Francisella*, *F. halioticida* semble être un nouveau candidat bactérien idéal pour contribuer à l'explication des mortalités inexpliquées qui touchent la France depuis plusieurs années.

Ensuite, les infections expérimentales bactériennes ont mis en évidence l'implication de différents critères, propres aux individus, impliqués dans leur sensibilité. Premièrement, l'état physiologique des moules, en lien avec la saison, influe sensiblement sur la résistance des animaux face à un organisme pathogène, ce qui corrobore les observations et conclusions énoncées ci-dessus. Deuxièmement, l'origine de captage des moules et/ou la sélection d'un certain « type » de moules (moules classiques « de corde » ou moules « de pelisse ») joue(nt) un rôle dans la robustesse des animaux. En effet, nous avons observé que les moules de pelisse nées à l'île Dumet, qui se trouve à la périphérie d'une zone hybride *edulis/galloprovincialis*, étaient significativement plus résistantes que quatre autres stocks de moules classiques, nées plus éloignées d'une zone hybride, lors d'un *challenge* bactérien. Les

explications exactes restent à être démontrées par des données concrètes, même si l'hypothèse d'une influence génétique et/ou d'une « sélection naturelle » par l'intermédiaire du choix de moules orientées vers des capacités de croissance plutôt que de reproduction est suspectée.

Enfin, le suivi de la néoplasie hémocytaire a permis d'apporter des indications sur la prévalence et l'évolution de la maladie dans deux stocks de moules différents cultivés en Normandie. Nous avons observé des différences notables de prévalences entre les deux stocks étudiés (moules « classiques » originaires de Noirmoutier et moules « de pelisse » originaires de l'île Dumet) ainsi qu'une variation qui semble être périodique au cours de l'année, avec deux « pics » à la fin du printemps et au début de l'hiver. Néanmoins, les prévalences sont faibles au sein des populations (2,8 % tous stocks confondus sur 2018 et 2019) et l'incidence de la maladie sur les mortalités semble minime. Effectivement, de si faibles pourcentages ne peuvent expliquer des taux de mortalités compris entre 20 % et 40 % (taux Mytilobs 2014-2018 pour Agon-Coutainville).

Les sites touchés par des mortalités anormales sont généralement les mêmes d'une année sur l'autre, mais des fluctuations dans l'intensité des épisodes de surmortalités ont été constatées entre les années, les régions et les sites de production. Ceci fait valoir le fait que les mécanismes intervenants sont complexes et que la mortalité chez ces bivalves n'est pas une constante exacte et que plusieurs paramètres sont très probablement associés. En outre, le caractère récent des mortalités chez les moules, la définition des mortalités anormales, les méthodes de mesure de celles-ci, ainsi que la nature même de la mytiliculture complexifie grandement la compréhension de ce phénomène. Plusieurs des facteurs de risque déjà identifiés, peuvent, une fois associés, augmenter drastiquement le risque de mortalité et les interactions existantes entre ces facteurs sont encore trop peu connues. Au regard des travaux réalisés dans cette thèse, nous proposons d'ajouter la présence de la bactérie *Francisella halioticida* comme facteur de risque de mortalité. Toutefois, malgré le fait qu'elle ait été détectée uniquement dans des sites touchés par des mortalités, les différences de taux de mortalité observés entre les sites ainsi que les variations interannuelles sont telles que des facteurs supplémentaires sont très certainement impliqués.

.

MATERIELS ET METHODES

Liste des fiches techniques

Fiche technique n°1 : Fixation, déshydratation et inclusion d'hémocytes ou de tissus de moules pour l'observation en microscopie électronique à transmission (MET) 251

Fiche technique n°2 : Fixation, déshydratation et inclusion des tissus de moules pour l'observation en microscopie optique (Histologie) 253

Fiche technique n°3 : Prélèvement de l'hémolymphe, préparation et coloration des hémocytes pour l'observation en microscopie optique (Cytologie) 255

Fiche technique n°4 : Conception de deux PCR ciblant les gènes *R5.7* et *rtxA* 257

Fiche technique n°5 : Amplification par PCR classique du gène *rpoB* pour la détection de *Francisella halioticida* 261

Fiche technique n°6 : Amplification par PCR classique et séquençage du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) d'un parasite apicomplexe et analyse phylogénétique 263

Fiche technique n°7 : Protocole d'infection expérimentale de moules par plusieurs souches bactériennes 267

Fiche technique n°8 : Suivi de la néoplasie par cytologie dans deux stocks de moules de plus d'un an cultivées en Normandie - suivi réalisé entre juin et décembre 2018 269

Fiche technique n°9 : Suivi de la néoplasie par cytologie et cytométrie en flux (CMF) dans deux stocks de moules cultivées en Normandie - suivi réalisé entre février et septembre 2019 271

Fiche technique n°10 : Expérimentations de mise en contact de moules saines avec une moule néoplasique 273

Fiche technique n°11 : Protocole pour la préparation et le marquage des hémocytes pour l'analyse des phases du cycle cellulaire des cellules et pour la détection de la néoplasie en cytométrie en flux (CMF) 275

Fiche technique n°1

Fixation, déshydratation et inclusion d'hémocytes ou de tissus de moules pour l'observation en microscopie électronique à transmission (MET)

/!\ Ce mode opératoire utilise des produits toxiques : éviter le contact direct avec les produits et leurs vapeurs. Le travail doit être réalisé avec des équipements de protection individuelle (EPI), sous hotte derrière la vitre de protection. Les déchets sont éliminés dans un récipient dédié.

1 : Fixation

Dans le cas où les cellules étudiées appartiennent :

- A un tissu mou (organe) : couper des cubes de tissus (glande digestive, manteau, branchies) de taille inférieure à 1 mm^3 (environ 10 par tissus) et les disposer rapidement dans 1 mL de solution de fixation.
- A un fluide (hémolymphe) : prélever un volume au moins égal à 500 µL (plusieurs prélèvements d'individus peuvent être regroupés), centrifuger à 300 g pendant 10 min à 4 °C, éliminer le surnageant et re-suspendre le culot dans 1 mL de solution de fixation.

La solution de fixation est composée de 1 mL de glutaraldéhyde 2,5 % (pH ajusté à 7,4) et de 9 mL de solution de rinçage (cacodylate de sodium 0,31 M + saccharose 0,25 M (1228 mOsm)).
La fixation doit être faite sous agitation sur plateau à 4 °C pendant 16-20 h (1 mL de Glutaraldéhyde pour 9 mL de solution de rinçage).

2 : Rinçage (avec la solution de rinçage décrite précédemment) = 2 x 15min à 4 °C

3 : Post fixation (sans agitation) dans 500 µL de solution 1 % de cacodylate 0,2 M + solution 12,5 % de saccharose 0,365 M

4 : Second rinçage = 3 x 10min

5 : Déshydratation (mélanger le contenant toutes les 3 min) :

Ethanol 70% : 3 x 15 min
Ethanol 95% : 3 x 15min
Ethanol 100% : 3 x 10min et 1 x 20min

NB : Ne pas laisser l'échantillon se dessécher (pour cela ne pas enlever trop de solvant) – ne pas contaminer les solvants avec de l'eau (ceci afin de permettre une bonne polymérisation de la résine).

6 : Les échantillons sont progressivement imprégnés de résine puis inclus dans une résine Epoxy disposée dans des moules. La polymérisation s'effectue pendant 24h à 60°C.

7 : Le bloc de résine est taillé grossièrement à la main et à la lame de rasoir afin de dégager la zone sur laquelle les coupes seront réalisées.

8 : Un microtome équipé d'un couteau de verre est ensuite utilisé pour réaliser les coupes semi-fines (de l'ordre de 500 nm). Les coupes semi-fines permettent de cibler précisément la zone sur laquelle sera effectuée la coupe ultrafine à observer en MET.

9 : Les coupes ultrafines (80 nm) sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica ultracut R) équipé d'un couteau en diamant. Les coupes sont récupérées avec une anse de platine et déposées sur des grilles en cuivre présentant un maillage.

10 : Les grilles supportant les coupes sont ensuite placées dans le microscope électronique à transmission JEM 1011 (JEOL, Inc., Akishima, Japon) pour l'observation par l'intermédiaire de la caméra ORIUS^{TM} SC200 (Gatan, Inc.).

Note : dans le cadre des travaux décrits dans la Partie 1, les trois tissus (branchie, glande digestive, manteau) de trois individus des trois premiers lots (L1, L2 et L3) ont été traités pour la MET. Pour chacun des tissus, dix cubes inférieurs à 1 mm^3 ont été inclus en résine.

Fiche technique n°2

Fixation, déshydratation et inclusion des tissus de moules pour l'observation en microscopie optique (Histologie)

/!\ Ce mode opératoire utilise des produits toxiques : éviter le contact direct avec les produits et leurs vapeurs. Le travail doit être réalisé avec une blouse et des gants sous hotte derrière la vitre de protection. Ne pas souiller les outils de travail avec des gants sales. Les déchets sont éliminés dans un récipient dédié.

1 : Fixation (48 h) : les coupes de tissus transversales d'environ 5 mm d'épaisseur, passant par le manteau, les branchies et la masse viscérale (glande digestive, intestin), sont placées dans des cassettes d'inclusion puis dans du fixateur (Davidson ; Tableau 23) mélangé à de l'acide acétique (1 volume pour 9 de Davidson) au moment de la fixation.

Tableau 23 : Composition du fixateur Davidson

Composé	Volume (en mL)
Glycérol	400
Formaldéhyde 37 %	800
Ethanol 95 %	1200
Eau de mer filtrée	1200

2 : Déshydratation :

Ethanol 70 % pendant 24 à 48 h (voir plusieurs semaines si les tissus doivent être stockés)

Ethanol 95 % pendant 24 à 48 h

Ethanol 100 % pendant 24 à 48 h

Butanol 100 % pendant au moins 48 h (voir plusieurs semaines)

6 : Inclusion en paraffine liquide pendant 24 h dans l'étuve à 55-60 °C. Changement du bain de paraffine et de nouveau inclusion pendant 24 h dans l'étuve à 55-60 °C.

8 : Inclusion des échantillons en paraffine solide : coulage de la paraffine dans les barres de Leuckart, les échantillons sont orientés coupes vers le bas, la paraffine se fige à température ambiante.

9 : Des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, séchées une nuit à 40 °C puis colorées (colorations : Trichrome de Prenant-Gabe, Hématoxyline Phloxine Safran, ou Hématoxyline-Éosine).

Note : dans le cadre des travaux décrits dans la Partie 1, entre cinq et dix coupes de moules par lots (L1 à L20) ont été traitées pour la MO.

Fiche technique n°3

Prélèvement de l'hémolymphe, préparation et coloration des hémocytes pour l'observation en microscopie optique (Cytologie)

1 : Disposer les moules dans une solution anesthésiante (40 g de $MgCl_2$ dissous dans 300 mL d'eau osmosée + 600 mL d'eau de mer) pendant ~ 30 min.

2 : Lorsque les animaux sont anesthésiés (les moules ne se ferment plus à la suite d'un stimulus et le pied est étendu en dehors de la coquille ; Figure 79A), prélever dans le muscle adducteur ~ 40 µL d'hémolymphe à l'aide d'une seringue de 1 mL munie d'une aiguille de calibre 27 (afin de prévenir une potentielle fermeture anticipée de l'animal mal anesthésié, le bouchon de la seringue peut être disposé entre les valves ; Figure 79B). Dans l'attente de finir la série de prélèvements (12), disposer les premiers échantillons d'hémolymphe au frais, ou à minima, à la même température que celle de l'eau dans laquelle se trouve les moules (ici à 15 °C).

3 : Monter le système Shandon Cytoclip, la lame cerclée Cytoslide™ et le Cytofunnel® puis disposer les 40 µL d'hémolymphe et les 160 µL de NaCl à 2,5 % dans chambre à échantillon (flèche rouge ; Figure 79C). Disposer l'ensemble dans la cytocentrifugeuse Shandon Cytospin® et lancer le programme de centrifugation (800 rpm – 10 min).

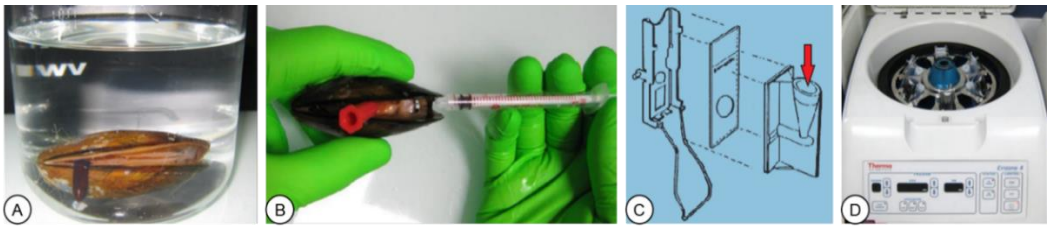


Figure 79 : Prélèvement de l'hémolymphe et préparation des lames de cytologie.

4 : Désolidariser l'ensemble, fixer à l'aide d'un spray fixateur et/ou laisser sécher à l'air libre. Ensuite, effectuer la coloration May-Grünwald Giemsa (MGG) :

2 min et 30 s dans du colorant May-Grünwald (éosine – bleu de méthylène) pur
2 min et 30 s dans de l'eau distillée
20 min dans une solution de Giemsa (éosine – azur de méthylène) diluée au 1/10ème
3 min de rinçage dans de l'eau distillée
5 min de séchage (ou plus)

5 : Laisser sécher et l'observation microscopique des hémocytes peut être réalisée (objectif x10, x40, x50 suivant ce qui est recherché).

Note : dans le cadre des travaux décrits dans la Partie 1, le protocole était en cours d'optimisation, ainsi la quantité d'hémolymphe prélevée était différente entre les individus et certains n'avaient pu être prélevés. En revanche, concernant les travaux de la Partie 3, le protocole décrit ici a rigoureusement été suivi.

Fiche technique n°4

Conception de deux PCR ciblant les gènes *R5.7* et *rtxA*

(1) Design de la PCR classique sur le gène *R5.7*

- Récupération de la séquence du gène *R5.7* disponible sur GenBank ® :

>NZ_PIGD01000004.1:c211591-209195 Vibrio sp. 10N.286.48.B8 Contig_4, whole genome shotgun sequence

ATGAGAATTCTACCGATTATTATTTCTCTTTCATTATCTCCACAAGCTTTTGCTAGTGACTGGCTAGAGCTTAATAACTTGCC
TAATTCCATCGAATACCCAACTTGGGTTCAGTCTGCCTATTCAGATGTCGATGTTCTCTCTCGCTCTACATCTGATCTCCACA
TCAACCTCAGTGACTGGGTTGCAGAGCAGAACCTTTACGTGACTAAGCCCTCCAAGATCGTCGTTTTTGCCGATACCATTGAG
GTTCCAGAAAACTTCAACTTGGTGGTGAATAACCAAAACATTCTCATTTTTGCCCGTAAAATTGTCGGACAAGGCGCCCCGAC
TTTCGTTCTCGGGCAACAAGGCGCTGCGGCATCAGTGACTGTGATTGCAGGAGAGATCGAAACTCCAATTAATGTCCTCGCTT
TCCAAAACGATGGCAGCATTACACGAGATGCCCTTTCAGCAGAAGATGGCGATGGAACCTCTGTGGCATTAGCAGGAGAACAC
TACCGCAGAACCACCATCGACTCGAACATTACTGGGCAAATGAAACTAGCGACCACACCTTTTACCGACATTGTTAACCGCTC
TTTTGATATGGCTGCCAGCTTATTCGACACCAACCCAGAGCTTAGTCTCGAACTGATTAATTGGATCGAGCAGAGTTTGCGTC
ACGCAGGCTCAGTGGTGGAAGATGACCCTATCCTTTCAGACCTATACCTCCAAACCGTAGCCTTCAAACAGTTCATTAGTTTC
AGCACTAAAGAGAGTAACTATGTGCCTTATCTCGACAAGGTGCTCTACCAAGGCAAATACGAAGCGTACCTGAATGCAATGAT
CGCGTATCAAGCGCAGTGGGATATCATTCAAGACAGAAGTACGGTGATCGAAGACAAGATTGAAGCTGCGAAGTTAGCACTCG
CTAACGTTGAAGACGTTCTCAGAGCACAAGAATCGATCATCACTCAAACCCAATCCAACATCGACAAAATAGGCGACAGCCTG
ACCGAGATCGACAGCCAATACAAAGCTCAGGAGCTTGTGACACTGAGTGCAAGAACCACTTACTTGGTCGGCGTGGAAAACTG
GAAAACTCAGCAAGAGCTCAATGCAGCCTTGGCTATCTTCAAAGCCATCGCAGAGATTGGCAGTGCCGTCAGTGGCGTATTCA
CAGGGAACCTATCTGGTGTGAACGACCTCACCGAACAATTAGCCAAAACCCCGGAGGCTTTAGATAAAGCGAAAAACTTAGTC
ACCAATATCAAATCAGTCACGGGGATCATTGATAGCGTTACTAAGACCATTTCGGGCATCGCACAGCTCACCGCCGATGTGAA
ATCGACCATCAAACTTCATAAAATCTCCGAAGCGATGGATGGCTTTGACTTTAATATTCCGACTTTGAATGAGAGTAATCTGG
CCTGGGATCTGATGATCACCGAGATCCGCAGTAACTTAAGACTTGCTGATAGCTTGGGAATTAAAGGCGCGAGACAATACCTA
GTCGAACTTGAAAAACAGGTGCTATTAGGCAAAGCAATTAACACCACTCAGCTTAACTTTGCACAAGAGCAAGCCAAACTCGT
CGACCTATTATTGACCAAGAACGTCACCGCTAATCAACAGCAAAGATTGAGTGACGCCATTGAGAGTTATCAGGTAGACAGCG
AAGGTTTCGACTCCATCGAGCGTGAGCTGTCGCGAGTGCTAATGCACTTCAAACGACCAATGTATGTGGCTTTATCTAACTAT
GTTCAGGCATACGAATACTGGGCGTTGAAACCAAGTGAGATCACACCTTCGCTGAATAAAAGTTACTTGGACTACCAGTTTGA
CCTCGCGTCCATAGAAAATGAGTATGTGAATGCACTCTCTTCATTCCAGCCAGCACCACAAGACTTCACTATCGACAACTACA
CCATCTCTAGCCCAGAGCAACTCGATAGCTTCGCAACCACTGGCGAGTTGAACTTCACAATTCCATTAGGGCAGGCACAACTA
TGTTCATTCGACCGAGTTAGACTCTCTACAGTACGTGTGTTCTTAGAAGGGGAAAACTTACCTTATGGCAAGCAGTTCAACCT
TGGAATATCGAGTTCAGGTAACTATGCCGACCGCTATCAAGATCAGGATTACCAATTCAGTTCTAATCCGGTCGCACGGGCGT
TTTACTACCGCTTAGATGATCCAACCACCAATGACGTTAGCATCATCACCGATGGCGCAGTGGCGAATAGGTTCGAGTATGCG
TACTTCCAACCAACTCCATTCTCGACATGGAATGTCACCCTCAACAACTACGATGAGGCAGACCAAGCCAACAACCAATACCT
AAAAGATGTCGAACAAATTAGGGTTGAGTTCTTAGGCAGTGGTATCCCGAATGGCAACAGTTGTTCTAACTGA

- Utilisation de l'outil « *PCR Primer Design* »[118] de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne) pour la conception des amorces.

[118] https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/

- Vérification du respect des critères et principes établis par Poitras & Houde (2002) pour le design d'amorces :

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Blast (total score)	Appariement
R5.7 sens	23	43,5	58,9	46,1	12 (<14)
R5.7 antisens	21	52,4	59,8	38,2	10 (<14)

- Choix des amorces :

Amorce *R5.7* sens : 5' TGGCTAGAGCTTAATAACTTGCC 3'

Amorce *R5.7* antisens : 5' CTTGGTAGAGCACCTTGTCGA 3'

- Volume total réactionnel égal à 25 µL et composé de :

  12,5 µL de Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgique)
  0,5 µL de chacune des amorces (20 µM)
  9,5 µL d'eau purifiée
  2 µL d'extrait d'ADN (2 µL d'eau purifiée pour le témoin négatif)

- PCR conventionnelle réalisée sur un thermocycleur T100™ (Bio-Rad, France) avec le thermo-programme suivant : dénaturation 10 s à 95 °C puis 30 cycles (10 s à 95 °C, 30 s à 55 °C, 40 s à 72 °C et une élongation finale de 3 min à 72 °C.

(2) Design de la PCR temps réel sur le gène *rtxA*

- Récupération des séquences du gène *rtxA* disponibles sur GenBank ® :

Vibrio splendidus strain 5S_122 Contig_17, whole genome shotgun
Locus: NZ_PIFU01000017.1_58926-74219

Vibrio lentus strain 10N.261.46.F8 10N.261.46.F8_contig_61, whole genome shotgun sequence
Locus: NZ_MCZK01000144.1_c220737-2054

Vibrio splendidus strain CECT 8714, whole genome shotgun sequence
Locus: NZ_FLQQ01000018.1_52989-67616

Vibrio tasmaniensis strain 10N.222.48.A2 10N.222.48.A2_contig_0, whole genome shotgun sequence.
Locus: NZ_MDBP01000001.1_c55743-43132

Vibrio cyclitrophicus strain 10N.286.45.A5 10N.286.45.A5_contig_36, whole genome shotgun sequence.
Locus: NZ_MCWN01000033.1_1024-13635

- Comparaison et alignement des séquences (MUSCLE) et sélection de la partie du gène la plus conservée entre les espèces :

CTAGGCGGCTACAACACGCACACCCAAATTGGGTCTGGCAACGGGTTGTGGTTAGCGGTCGGTGGCTTTAATGTCATGACACA
GGTTGGTAAGGGCGACATCGCTTCTGTACTTGTCGGTGGCGCGAATGTCATGACTAAAGTGGGTGACGGTGACCTCACGGCGG
GTATGCTTGGTGGCGCCAATATCATTACTCATATTAGCGGTGATGATACGGCCTCAAATACGACCGCAGTCGCACTTGGTGGT
GCAAACATCCTAACCAAAAAAGGCAATGGCAATGCGCTTGCCGTTATGGGAGGAGGCGCCAACGTACTTACACATGTTGGTGA
TGGCTCGACAACTGGCGTCATGGTTGGTGGGGCGAACATTCTAACCAAGGTGGGCGATGGCGATACCACAGGCATTATGTTGG
GTATTGGTAACGTATTGACTCATGTTGGCGATGGCCAAACACTTGGCGTAATGGGTGCTGCGGGTAATATCTTCACCAAAGTA
GGCGACGGCACTTCAATAGCCGCTATGATCGGCGTAGGCAATATCTTCACTCACGTTGGTGAAGGGAACGCGTGGGCGCTAAT
GGGCGGCCTAGGCAATGTATTTACCAAGGTTGGTCATGGTGATGCATTAGCGCTTATGGTCGCAGAAGCGAATGTCTTTACGC
ATATTGGTGACGGCACAACAGTCGCATTAATGATAGCAAAAGGTAATATCGCGACTAAGGTGGGTAATGGTACCTCGATAGCC
GCGATGGTAGGTAACGCAAATATATTCACTCAGGTGGGTAATGGCAGCACGTTTACTGCAATGCTTGGCCAAGCCAATATCAT
GACGAAAGTGGGTAATGACCTAACTGCTGCATTAATGATCGGTAAAGCGAATATCTATACTCACGTTGGTGATGGCACAAGCT
TAGGTTTATTTGCTGGCGAACTAAACGTGATGACGAAAGTGGGTAATGGCACAACCTTAGCCGCGATGTTTGGTAAAGCAAAC
ATTATGACTCACGTAGGAGATGGTCTTACTGGCGTACTAGCCCTTGGTGAAGCGAATATCATAACGAAAGTCGGTGATGACTT
CATGGGTGTTGTCGCAGCTGCGAAAGCAAACGTAGTGACCCATGTTGGTGATGCAACAACCGCAGCTGTGTTGGCGGGTAAAG
GTAATATCTTAACCAAAGTTGGCGAAGGAACCACCGTTGGTTTACTGATATCAAAAGTGGGCAATGTCATGACCCATGTGGGG
GATGGTACGACTATTGGTTTGGCGAAAGGTAAAGCTAACATCATCACAAAAGTGGGCGATGGATTAGGCGTTAACGTGGCCTG
GGGACAAGCAAATATCTTCACTCACGTTGGTGACGGTGATCGATACAACTTCGCCAAAGGTGAAGCGAACATCATCACCAAAA
TCGGTGATGGCCAAGAAGTTTCTGTGGTTCAAGGTAAGGCGAATGTCATTACTCACGTC

- Utilisation de l'outil « *PCR Primer Design* » de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne).

- Vérification du respect des critères et principes établis par Poitras & Houde (2002) pour la conception des amorces et sonde *Taqman* :

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Blast (total score)	Appariement
rtxA sens	18	50	55,2	36,2	12 (<14)
rtxA antisens	20	45	56,3	40,1	12 (<14)
rtxA sonde	32	43,8	66,9	60,2	12 (<14)

Amorce *rtxA* sens : 5' GGCCAAGCCAATATCATG 3'
Amorce *rtxA* antisens : 5' CGCCAGCAAATAAACCTAAG 3'
Sonde *rtxA* : 5' FAM-CGAATATCTATACTCACGTTGGTGATGGCACA-BHQ1 3'

- Volume total réactionnel égal à 25 µL et composé de :

  12,5 µL de Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgique)
  0,5 µL de chacune des amorces (20 µM)
  0,5 µL de sonde (10 µM)
  9 µL d'eau purifiée
  2 µL d'extrait d'ADN (2 µL d'eau purifiée pour le témoin négatif)

- PCR temps réel réalisée sur un thermocycleur Smart Cycler® (Cepheid, USA) avec le thermo-programme suivant : dénaturation 10 s à 95 °C puis 40 cycles (5 s à 95 °C, 30 s à 60 °C).

Fiche technique n°5

Amplification par PCR classique du gène *rpoB* pour la détection de *Francisella halioticida*

>JF290381.1 Francisella halioticida strain Shimane-1 DNA-directed RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds

AATTGAATCGGTAGTTAGATCTTCAGTAGAAAATGATATTGTTGGTGCTAAGCTTCAAAAAGCTAAAGGTCTTAAGAAAGGAG
CTGTTCTAACTAAAGAATTCCTAGAAAAACTTCCGTTTGCTAAATGGCTAGAGATATCTTTTGAAGATAAAAAGCTTAATGAT
AGAGTAGAAAAAGCTAAAGAGTATTACGATGAAGCAAAAATAGCGGTAGATGCTAAATTTGAAGTTAAGAAGAAATCTATTAC
TCAAAGTAATGAACTGTCTCCTGGTGTGATTAAAACAGTTAAAGTTTTTGTTGCTATCAAAAAACGTATTCAGCCAGGTGATA
AAATGGCTGGTAGACATGGTAACAAAGGTGTAGTATCTCGTGTACTACCTGTTGAAGATATGCCATATATGGAAGATGGTACT
CCTGTAGATGTTTGTCTAAACCCTCTAGGTATTCCATCTCGTATGAATATTGGTCAGATTCTTGAAGCACATTTAGGCTTAGC
ATCTTATGGTCTGGGTAAACGAATTGAAGAAACTCTAGAGCAGACTAAAAAAGTAGCTGAACTAAGAAAAACCTTAGAAGAAG
TTTATAATAGTGTTGGTAATAAAAAAGTTGACCTAGAATCTTTAAGTGATGAAGAAGTATTAACTCTTTGTGAAAACTTAAAG
GATGGTGTACCAATTGCGACTCCTGTGTTTGATGGTGCTAAAGAAGAAGATATTAAATCTTTACTGAAAATAGGTGGTTTTGC
AAGTAATGGTCAGATGAAACTTTTTGATGGTCGTACTGGCCAGTCATTTGATAGACATGTGACAGTTGGTTATATGTATATGT
TGAAACTTGATCACTTAGTAGATGATAAGATGCATGCTAGATCAACAGGGTCTTATAGTTTAGTTACGCAGCAACCTCTAGGT
GGTAAAGCACAGTTTGGTGGTCAAAGATTCGGTGAGATGGAAGTTTGGGCATTACAAGCATACGGTGCTGCTTATACGTTAAG
AGAAATGTTAACAGTTAAATCAGATGATATAGCTGGTAGATCTAAAATGTATAAGAATATAGTTGATGGTAAGTTGACTATGA
ATGTTGATGTTCCAGAATCGTTTAATGTT

Tableau 24 : Couple d'amorces utilisées pour la détection de *Francisella halioticida* (Brevik *et al.*, 2011)

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Amplicon (pb)
Fh-rpoB sens : 5' TGGTGCTAAGCTTCAAAAAGCT 3'	22	40,9	60,6	1058
Fh-rpoB antisens : 5' ACGATTCTGGAACATCAACATTCA 3'	24	37,5	60,3	

- Volume total réactionnel égal à 25 µL et composé de :

  12,5 µL de Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgique)
  0,5 µL de chacune des amorces (20 µM)
  9,5 µL d'eau purifiée
  2 µL d'extrait d'ADN (2 µL d'eau purifiée pour le témoin négatif)

- PCR conventionnelle réalisée sur un thermocycleur T100™ (Bio-Rad, France) avec le thermo-programme suivant : dénaturation 10 s à 95 °C puis 30 cycles (10 s à 95 °C, 30 s à 55 °C, 40 s à 72 °C et une élongation finale de 3 min à 72 °C.

- Amplicons ont été analysés avec le Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical, Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) et ceux ayant la taille attendue envoyés à Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne) pour purification et séquençage.

Fiche technique n°6

Amplification par PCR classique et séquençage du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (ADNr SSU) d'un parasite apicomplexe et analyse phylogénétique

- Extraction de l'ADN :

  - à partir de l'hémolymphe : prélèvement et regroupement des hémolymphes de moules infestées (200 µL/moules). Centrifugation à 300 g pendant 10 min puis élimination du surnageant. L'extraction d'ADN se fait sur les cellules culotées.

  - à partir de tissus : récupération des tissus (manteau, branchies, glande digestive) d'une ou plusieurs moules (en fonction de l'analyse : en individuel ou en *pool*[119]) et réalisation d'un broyat. L'extraction d'ADN se fait sur l'homogénat de tissus (50 mg).

Réalisation de l'extraction d'ADN à l'aide du QIAamp DNA minikit® (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) en suivant le protocole « *blood or body fluids* » excepté pour l'élution réalisée avec le « *Qiagen elution buffer AE* » qui a été faite dans un volume de 60 µL.

- Première amplification (PCR n°1) :

Utilisation des amorces construites par Thompson *et al.* (1997) à partir d'alignements (CLUSTAL_X) de plusieurs taxa d'apicomplexes (Tableau 25). Ces amorces permettent l'amplification d'une zone centrale du gène.

Tableau 25 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°1 (Thompson *et al.*, 1997)

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Amplicon (pb)
SFC-340 sens : 5' AGTTTCTGACCTATCAGC 3'	18	44,4	52,5	828
SFC-1260 antisens : 5' TCAGCCTTGCGACCATACTC 3'	20	55,0	61,4	

- A partir de la séquence obtenue, une amorce située aux environs de la moitié du gène a été conçue pour être utilisée avec des amorces universelles situées quant à elles aux extrémités du gène (Hillis & Dixon, 1991; Freeman, Yokoyama & Ogawa, 2008) afin de compléter le séquençage du gène de l'ADNr SSU.

[119] Les *pools* sont généralement constitués de broyats provenant de 3 moules en moyenne.

- Deuxième amplification (PCR n°2) :

Utilisation de l'amorce sens construite par Hillis & Dixon (1991) avec l'amorce construite à partir du premier séquençage obtenu à la suite de la PCR n°1 (en antisens) (Tableau 26).

Tableau 26 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°2

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Amplicon (pb)
18e sens 5' CTGGTTGATTCTGCCAGT 3' (Hillis & Dixon, 1991)	18	50,0	56,3	860
MP-1000 antisens 5' CTGTTAATCATTACTTTGGTTC 3'	22	31,8	52,3	

- Troisième amplification (PCR n°3) :

Utilisation de l'amorce construite à partir du premier séquençage obtenu à la suite de la PCR n°1 (en sens) avec l'amorce antisens construite par Freeman *et al.* (2008)

Tableau 27 : Couple d'amorces utilisées pour la PCR n°3

	Taille (pb)	GC %	Tm (°C)	Amplicon (pb)
MP-1000 sens 5' GAACCAAAGTAATGATTAACAG 3'	22	31,8	52,3	947
18gM antisens 5' CTTCCGCTGGTTCACCTACG 3' (Freeman et al., 2008)	20	60,0	62,1	

- Séquence de l'Apicomplexe (*Margolisiella islandica*) identifié chez la pétoncle islandaise (*Chlamys islandica*) (Kristmundsson *et al.*, 2011a) initialement utilisée au début du développement et permettant de visualiser les positions des différents couples d'amorces utilisés :

>JN227668.1 Margolisiella islandica isolate MF-2011 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

TCTGGTTGATTCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCCAAGTTCTGCTTCTTGAAGAAGTACA
CTGCAGATAGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTACTTGATGTTTGATTGCTACTCGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATA
CGTGCGCAAAATCTTACTGCCTGTCGGTAAGATAGTGTTTATTAGATAAAGAACCAATCTGCTTTGCAGCTTCTGGTGATTCA
CAATAACTAAACGAATCGCACGGCCTTGTGCTGGCGATGCATCTTTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTAAGGTAT
TTGCTTACCGTGGCAGTGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATTCTGACACAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAAATCACATACGTGTT
TTGTAATTGGAATGAGTGGGAAGTAAAGCTTCACACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTC
CAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGACGATTATTTCTACACCTACCTCT
GGGTTCGTCGTGGCTAATAACGTTATCTATCTGTCATGTACTGTACTTTATTGTGCTGTATTTTGCCGGATCCTTTACTTTGA
GAAAATTTGAGTGTTTCAAGCAGGTATTTTGCCATGAAAACTGCCGCATGGAATAATACGATAGGACTGTGGTTCTATTTTGT
TGGTTTCTAGAACCAAAGTAATGATTAACAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAAGAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTT
CTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA
GATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAAGTTGTCACGATTTGACACTTTCAGCACCTTATGAG
AAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGT
GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTT
CTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCT
TAGCCTGCTAAATAGGGGTGAGAACCATTCGTTCTTCGCCTCCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTGTATAACGCAAGGAAGTTTG
AGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACACTGATGTATTCAGCGAGTTAATCTTTGG
CCGAGAGGTAATCAGAGTAATCTTGTGAAAATACATCGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTCAACGAGGAATT
CCTAGTAAGTACGAGTCATCAGCTCGTGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAGCG
ATCCGGTGAATTAGACGGACTGAGGTTTCGTTAGTTCTCTAATGGAATCACGGAAAGTTTTGTGAACCTTATCGCTTAGAGGA
AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCAGCGGAAG

- Protocole pour la réalisation des PCR :

Volume total réactionnel égal à 25 µL pour chacune des PCR et composé de :

12,5 µL de Premix Ex Taq® 2 X Takara® (Lonza, Verviers, Belgique)
0,5 µL de chacune des amorces (20 µM)
9,5 µL d'eau purifiée
2 µL d'extrait d'ADN (2 µL d'eau purifiée pour le témoin négatif)

PCR conventionnelle réalisée sur un thermocycleur T100™ (Bio-Rad, France) avec le thermo-programme suivant : dénaturation 15 min à 95 °C puis 40 cycles (30 s à 95 °C, 90 s à 57 °C, 90 s à 72 °C et une élongation finale de 3 min à 72 °C.

Amplicons analysés avec le Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical, Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) et envoyés à Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne) pour purification et séquençage dans les deux sens.

Séquence consensus pour chacune des trois PCR obtenue en alignant les séquences sens et antisens (MUSCLE).
Séquence finale du gène obtenue en concaténérisant les séquences

- Analyse phylogénétique réalisée sur MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) :

Comparaison et alignement de la séquence (MUSCLE) avec 36 séquences ADNr SSU d'apicomplexes disponibles sur GenBank® et utilisation et la méthode « *Neighbor Joining* » avec un « *bootstrap* » de 1000 réplications.

Fiche technique n°7

Protocole d'infection expérimentale de moules par plusieurs souches bactériennes

J-1 avant infection

1 : Repiquage des souches bactériennes à injecter (sous hotte) : prélever 1 colonie à l'œse de la souche en dormance dans du *marine Zobell* liquide et la repiquer dans 4 mL de *marine Zobell* liquide frais stérile.

2 : Incubation à 22 °C pendant 24 h.

3 : Préparation de la solution anesthésiante : peser 40 g de $MgCl_2$ et les dissoudre dans 300 mL d'eau osmosée. Préparer les béchers prêts à recevoir les moules infectées en fonction des différentes conditions testées (Figure 80).

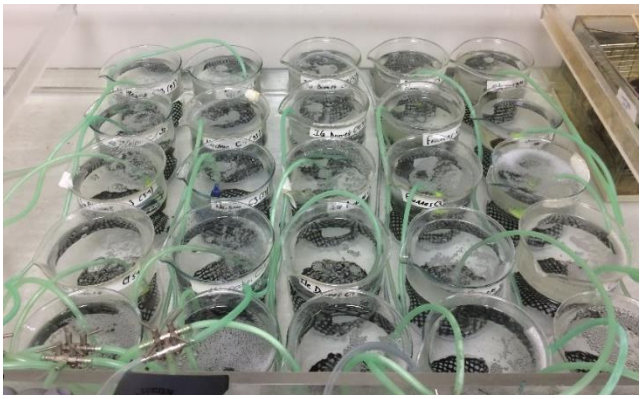


Figure 80 : Préparation des béchers avec de l'eau de mer (EDM) naturelle et bullages prêts à recevoir les moules infectées. En ligne, les 5 origines étudiées, en colonne les 5 conditions expérimentales testées (témoins négatifs ; moules infectées avec la souche 1 à 10^4 CFU, moules infectées avec la souche 1 à 10^7 CFU ; *idem* pour la souche 2).

Jour de l'infection

4 : Ajustement de la solution anesthésiante : ajouter 700 mL d'EDM à la solution de $MgCl_2$ diluée et immerger les moules dans la solution avec bullage pendant ~30 min.

5 : Préparation des solutions infectantes : diluer en cascade les souches testées repiquées de la veille.

Dilution 10^{-1} : 100 µL de solution pure + 900 µL d'EDMAS[120]

Dilution 10^{-2} : 100 µL de la dilution -1 + 900 µL d'EDMAS

↓

jusqu'à la dilution 10^{-7}

[120] Eau de Mer Artificielle Stérile (1 L d'eau ultrapure, 23 g de NaCl, 1,49 g de KCl, 0,3 g de $CaCl_2$ et 1,23 g de $MgSO_4$).

6 : Pour le dénombrement et le calcul de de la charge bactérienne pure (voir *infra*, étape 9), pour chaque souche testée 100 µL des dilutions 10^{-6} et 10^{-7} sont ensemencées sur *marine Zobell agar* puis incubés à 22 °C pendant 48 h.

7 : Infection des moules : 100 µL des dilutions 10^{-1} et 10^{-4} sont injectés par moule dans le muscle adducteur à l'aide d'une seringue à insuline. Pour les témoins négatifs, 100 µL d'EDMAS sont injectés. Les moules sont ensuite disposées dans leurs béchers respectifs avec bullage. Au total, 100 moules sont infectées par condition testée (20 moules par origine).

Après infection

8 : L'EDM est changée quotidiennement et à ce moment, une inspection des moules est faite attentivement afin de déceler les mortes, voir les individus moribonds (qui ne répondent pas de manière vivace à un stimulus extérieur).

9 : Détermination de la charge bactérienne pure (N) d'après la norme française (NF) ISO7218 : 2007

$$N\ (UFC/mL) = \frac{\Sigma c}{V \times 1{,}1 \times d}$$

Σc est la somme du nombre de colonies comptées sur deux boîtes de dilutions successives (10^{-6} et 10^{-7}) ; *V* est le volume déposé sur le milieu de culture en mL (0,1 mL) et *d* est la dilution correspondant à la première dilution retenue (10^{-6}).

Fiche technique n°8

Suivi de la néoplasie par cytologie dans deux stocks de moules de plus d'un an cultivées en Normandie - suivi réalisé entre juin et décembre 2018

1 : *Matériel biologique*

Les moules utilisées étaient cultivées sur bouchots au large de Agon-Coutainville (50)[121] et étaient issues de deux zones de captage : de l'île Dumet (moules de pelisse) et de Noirmoutier.

Elles avaient été captées au printemps 2017 et avaient été placées sur bouchots en Normandie à la mi-juillet pour les moules de Noirmoutier, et en septembre pour les moules de pelisse de d'île Dumet. Quelle que soit leur provenance, les moules avaient le même âge au début du suivi (> 1 an ; entre 14 et 15 mois).

2 : *Echantillonnage*

Les prélèvements ont été réalisés tous les deux mois, lors d'une marée à grand coefficient de juin à décembre 2018 (Tableau 28).

Tableau 28 : Plan d'échantillonnage des expérimentations réalisées entre juin et décembre 2018.

Marée (coeff. ≥ 80)	Date d'échantillonnage	Analyse cytologique
Semaine 24	13/06/2018	14/06/2018
Semaine 35	29/08/2018	29-30/08/2018
Semaine 41	09/10/2018	09/10/2018
Semaine 48	27/11/2018	28/11/2018

A chaque date d'échantillonnage, 100 moules de chaque origine été prélevées.

Une fois au laboratoire, les moules étaient disposées dans des aquariums de 15 L remplis d'eau de mer naturelle avec aération.

[121]Sur la concession de l'EARL Langlois Clouet, gérée par M. Benoit Clouet.

3 : *Suivi de la néoplasie*

Le jour même de l'échantillonnage (ou au plus tard le lendemain), les 200 moules étaient analysées en cytologie (Fiche technique n°3, p. 255) afin de détecter la présence d'individus néoplasiques.

Une fois colorées, les lames cytologiques étaient lues et les moules identifiées comme néoplasiques étaient isolées pour ensuite être utilisées dans le cadre des expérimentations de mise en contact (Fiche technique n°10, p. 273).

Fiche technique n°9

Suivi de la néoplasie par cytologie et cytométrie en flux (CMF) dans deux stocks de moules cultivées en Normandie - suivi réalisé entre février et septembre 2019

1 : *Matériel biologique*

Les moules utilisées étaient cultivées sur bouchots au large de Agon-Coutainville (50)[122] et étaient issues de deux zones de captage : de l'île Dumet (moules de pelisse) et de Noirmoutier.

Elles avaient été captées au printemps 2018 et avaient été placées sur bouchots en Normandie à la mi-juillet pour les moules de Noirmoutier, et en septembre pour les moules de pelisse de l'île Dumet. Quelle que soit leur provenance, les moules avaient le même âge au début du suivi (< 1 an).

2 : *Echantillonnage*

Les prélèvements ont été réalisés tous les mois lors d'une marée à grand coefficient (Tableau 29).

Tableau 29 : Plan d'échantillonnage des expérimentations réalisées entre février et mai 2019. *NA : prélevement non réalisé.*

Mois	Marée (coeff. ≥ 80)	Date
Février 2019	Semaine 6	22/02/2019
Mars 2019	Semaine 12	22/03/2019
Avril 2019	Semaine 16	17/04/2019
Mai 2019	Semaine 21	20/05/2019
Juin 2019	*NA*	*NA*
Juillet 2019	Semaine 29	18/07/2019
Août 2019	Semaine 35	30/08/2019
Septembre 2019	Semaine 40	01/10/2019

A chaque date d'échantillonnage, 100 moules de chaque origine été prélevées.
Une fois au laboratoire, les moules étaient disposées dans des aquariums de 15 L remplis d'eau de mer naturelle avec aération.

[122] Sur la concession de l'EARL Langlois Clouet, gérée par M. Benoit Clouet.

3 : *Suivi de la néoplasie en cytologie*

Le jour même, ou le lendemain de l'échantillonnage, les 200 moules étaient analysées en cytologie (Fiche technique n°3, p. 255).

4 : *Suivi de la néoplasie en CMF*

En plus des 40 µL d'hémolymphe prélevés pour la cytologie, 200 µL (volume optimale ; au minimum, 100 µL) étaient prélevés pour l'analyse en CMF (voir *infra*, Fiche technique n°11, p. 275).

Fiche technique n°10

Expérimentations de mise en contact de moules saines avec une moule néoplasique

1 : *Mise en contact de moules néoplasiques avec des moules saines*

Au total, quatre expérimentations de mise en contact (MEC1 à MEC4) ont été réalisées entre juin et décembre 2018. Chacune des expérimentations duraient 4 mois et étaient effectuées avec les moules issues des quatre suivis décrits dans la Fiche technique n°8 (p. 269).

Pour chaque origine, deux aquariums contenant chacun entre 44 et 48 moules non néoplasiques étaient constitués. Dans le premier aquarium, une moule néoplasique était ajoutée constituant ainsi l'aquarium de mise en contact (MEC) tandis que le second constituait l'aquarium témoin.

Conditions : température de l'eau = 15 °C (avec bullage) ; Volume des aquariums = 15 L.

2 : *Suivi de la mortalité et de la néoplasie dans les moules vivantes*

L'eau[123] des aquariums était changée tous les deux jours et à ce moment-là, une observation de l'état des moules était faite.

Lorsque l'état de l'animal mort le permettait, l'hémolymphe était prélevée et analysée en cytologie.

Deux suivis de la néoplasie dans les moules survivantes étaient réalisés, un intermédiaire à T2mois et un final à T4mois (Tableau 30).

Tableau 30 : Planning des expérimentations de mise en contact (MEC) et suivi de l'évolution de la néoplasie dans les moules.

Expérimentation	Date de début	T2mois	T4mois
MEC1	18/06/2018	06-07/08/2018	01/10/2018
MEC2	03/09/2018	19/10/2018	04/12/2018
MEC3	11/10/2018	10-11/12/2018	04/02/2019
MEC4	07/12/2018	04/02/2018	04/04/2019

Lorsque des moules témoins étaient identifiées comme étant néoplasiques lors du suivi intermédiaire, elles étaient enlevées de l'aquarium, en revanche si elles étaient identifiées dans les aquariums de mise en contact, elles étaient laissées en place.

[123] L'eau de mer utilisée était l'eau de mer pompée dans l'environnement et utilisée par les conchyliculteurs de la zone conchylicole de Agon-Coutainville.

Fiche technique n°11

Protocole pour la préparation et le marquage des hémocytes pour l'analyse des phases du cycle cellulaire des cellules et pour la détection de la néoplasie en cytométrie en flux (CMF)

1 : Disposer les 200 µL dans 750 µL d'éthanol absolu puis les ranger à -20 °C pendant au moins 48 h (cette étape a pour but de perméabiliser les cellules et de limiter le phénomène d'agréation, c'est pourquoi elle ne doit pas être passée).

2 : Marquage des cellules :

Centrifuger 5 min à 600 g
Retirer le surnageant
Ajouter 1 mL d'EDMAS
Vortexer pour remettre en suspension le culot et laisser 15 min à température ambiante
Centrifuger de nouveau 5 min à 600 g
Retirer une nouvelle fois le surnageant

/!\ La suite du marquage des cellules utilise des produits toxiques. Le travail doit être réalisé avec des EPI. Les déchets sont éliminés dans un récipient dédié.

Ajouter 500 µL de la solution de marquage (Tableau 31) dans le tube contenant l'hémolymphe et l'éthanol (si le volume initial d'hémolymphe est bien de 200 µL, s'il est plus faible, ajouté 250 µL)
Vortexer
Disposer à l'abris de la lumière au moins 30 min (si l'analyse doit être repoussée, le mélange peut se conserver 24 h à 4 °C)
Transférer 250 µL de chacun des échantillons dans une plaque 96 puits. Filmer et envelopper la plaque dans du papier d'aluminium pour la protéger de la lumière durant le transport vers le cytomètre. L'analyse peut se faire en tube s'il y a peu d'échantillons (< 10).

Tableau 31 : Solution de marquage des hémocytes pour l'analyse en CMF (quantité pour 20 échantillons).

Composé	Volume (en mL)
Iodure de propidium (IP) (1mg/mL)	0,500
RNase A (20mg/mL)	0,100
PBS	9,400

3 : Préparation du cytomètre CytoFLEX S (Beckman Coulter, Brea, USA) avant analyse :

Effectuer la procédure de lavage préanalyse avec de l'eau osmosée
Réaliser le contrôle qualité de l'appareil (utilisation de billes QC)
Rincer l'appareil (avec du détergent suivi par de l'eau osmosée) pour pouvoir procéder à l'analyse des échantillons

4 : Analyse des échantillons sur le cytomètre CytoFLEX S : sélectionner « s*low* » pour le « *sample flow rate* » (10µL/min) ; l'acquisition se fait jusqu'à atteindre 10 000 cellules dans la *gate P2* de l'IPVIOLET.

Toutes les cellules contenues dans un échantillon sont analysées simultanément par deux lasers :

- un laser bleu (longueur d'onde = 488 nm ; gain = 148) qui permet de déterminer la phase du cycle cellulaire des cellules : phase G0/G1 (phase d'activation des cellules), phase S (phase de synthèse de l'ADN) et phase G2/M (phase de mitose).

- un laser violet (longueur d'onde = 405 nm ; gain = 276) qui permet de détecter les cellules normales (diploïdes) et anormales (hyperploïdes) et ainsi d'établir la ploïdie des cellules.

L'analyse en CMF est basée sur les propriétés de l'IP qui s'intercale à l'ADN et qui émet de la fluorescence lorsqu'elle est excitée par un laser bleu/violet.

5 : Traitement des résultats bruts :

Pour chacun des échantillons, les fluorescences émises à la suite de l'excitation de l'IP par les lasers sont converties en 4 graphiques :

- deux nuages de points (Figure 81) : IPBLEU-H / IPBLEU-A et IPVIOLET-H / IPVIOLET-A qui permettent d'éliminer les doublets de cellules en ne sélectionnant que les cellules présentent dans la surface de la diagonale.

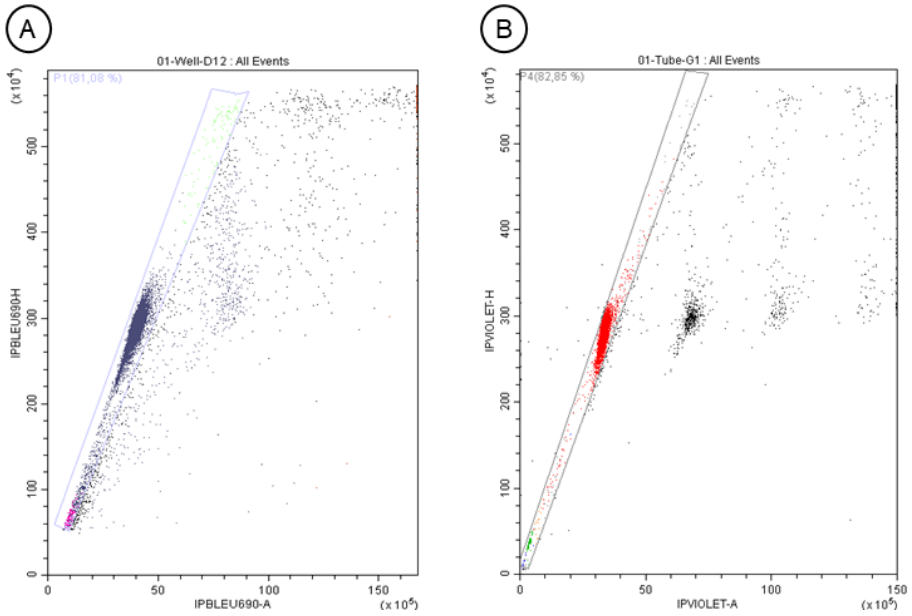


Figure 81 : Graphiques (nuages de points) IPBLEU-H / IPBLEU-A (A) et IPVIOLET-H / IPVIOLET-A (B) générés à la suite de l'analyse d'un échantillon normal (A) et néoplasique (B) permettant d'éliminer les doublets de cellules (en-dessous de la surface diagonale).

- deux histogrammes (Figure 82) : count / IPBLEU-A qui permet de visualiser le pourcentage de singulets de cellules en phases G0/G1, S ou G2/M et count / IPVIOLET-A qui permet de visualiser le pourcentage de singulets de cellules diploïdes et hyperploïdes.

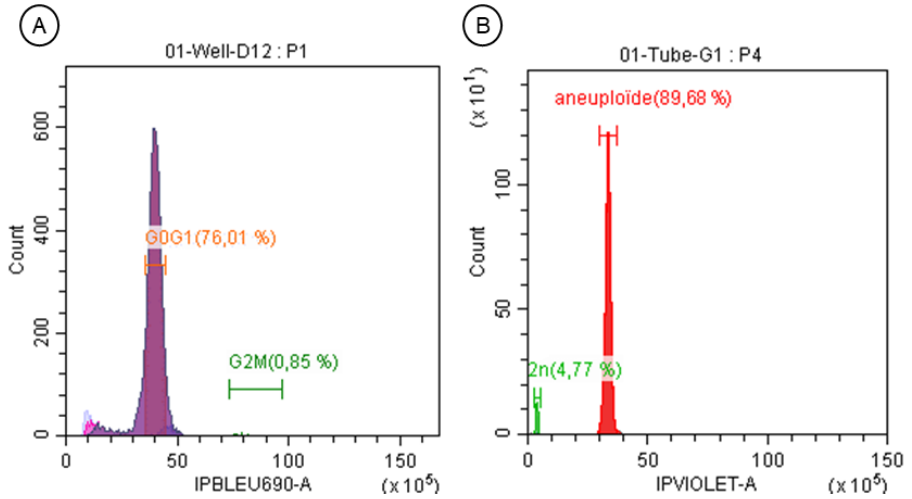


Figure 82 : Graphiques (histogrammes) count / IPBLEU-A et count / IPVIOLET-A générés à la suite de l'analyse d'un échantillon normal (A) et néoplasique (B).

Un tableau est également généré indiquant le nombre de cellules par pic et permettant alors de calculer les pourcentages de cellules en phases G0/G1, S ou G2M ainsi que les pourcentages de cellules diploïdes et aneuploïdes.

Pour chacun des pics, un Coefficient de Variation (CV) est calculé. Ce CV (exprimé en pourcentage) est une valeur statistique équivalente à l'erreur standard (ou l'erreur type) de la moyenne et donne donc une indication sur la précision et la fiabilité du pourcentage calculé pour chaque pic. Plus le nombre de cellules au sein d'un pic augmente, plus le CV % diminue et plus l'analyse est précise, *a contrario*, plus le CV % augmente, plus la résolution diminue. Ici, tous les CV % > 10 % dans l'IPBLEU-A ont été écartés pour le traitement des résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarset A.V., 1982. Freezing tolerance in intertidal invertebrates (a review). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, **73A** (4): 571-580, doi: 10.1016/0300-9629(82)90264-X

Adl S.M., Leander B.S., Simpson A.G.B., Archibald J.M., Anderson O.Roger., Bass D., Bowser S.S., Brugerolle G., Farmer M.A., Karpov S., Kolisko M., Lane C.E., Lodge D.J., Mann D.G., Meisterfeld R., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S.E., Smirnov A.V., Spiegel F., 2007. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst. Biol.*, **56** (4): 684-689, doi: 10.1080/10635150701494127

AFNOR, 2007. *NF EN ISO 7218 : Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations*

Agreste, 2019. *Enquêtes aquaculture 2016-2017* (No. n°2019-8-juillet 2019). Ministère de l'agriculture et de l'alimentation

Alim'agri, 2017. *Recensements de la conchyliculture, 2001-2012 - Résultats et analyses* (No. ANR-10-EQPX-17). Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture & Laboratoire d'Economie et de Management de Nantes Atlantique de l'Université de Nantes

Allain G., Bernard I., 2016. *Les mortalités de moules en 2014 et 2015 vues par les professionnels. Compte-rendu de la phase 1 : synthèse sur l'émergence, la propagation et l'installation des mortalités*. CRC Bretagne Nord

Alléguède V., 2001. *Impact de la prédation par les daurades royales sur la production de moule de pleine mer et recherche de nouvelles solutions.* (Mémoire CREUFOP). Université de Montpellier

Almada-Villela P.C., Davenport J., Gruffydd L.D., 1982. The effects of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **59** (2-3): 275-288, doi: 10.1016/0022-0981(82)90121-6

Arcère L.-E., 1756. Histoire de la ville de La Rochelle et du Pays d'Aulnis - Volume 1. Desbordes, 722 p.

Arias C.R., Macián M.C., Aznar R., Garay E., Pujalte M.J., 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *J. Appl. Microbiol.*, **86** (1): 125-134, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00641.x

Arzul I., Chollet B., Boyer S., Bonnet D., Gaillard J., Baldi Y., Robert M., Joly J.P., Garcia C., Bouchoucha M., 2014. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **141** (02): 227-240, doi: 10.1017/S0031182013001418

Auffret M., Poder M., 1985. Recherche sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne Nord. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, **47** (1 et 2): 105-109

Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **63** (3): 393-405, doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.10.016

Avignon S., 2017. Impact de l'évolution spatio-temporelle de la limite septentrionale de répartition sur des traits de vie chez la daurade royale *Sparus aurata*. Thèse de doctorat, MNHN

Bakhmet I., Nikolaev K., Levakin I., 2017. Effect of infection with Metacercariae of *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae) on cardiac activity and growth rate in blue mussels (*Mytilus edulis*) in situ. *J. Sea Res.*, **123** (0): 51-54, doi: 10.1016/j.seares.2017.03.012

Balbi T., Fabbri R., Cortese K., Smerilli A., Ciacci C., Grande C., Vezzulli L., Pruzzo C., Canesi L., 2013. Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish Shellfish Immunol.*, **35** (6): 1906-1915, doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.027

Balseiro P., Montes A., Ceschia G., Gestal C., Novoa B., Figueras A., 2004. Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update, **27** (4): 9

Barber B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat. Living Resour.*, **17** (4): 449-466, doi: 10.1051/alr:2004052

Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kühn I., Möllby R., Bruscolini F., Donelli G., 1999. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** (6): 2748-2753

Barbosa-Solomieu V., Renault T., Travers M.-A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, **131** (0): 2-10, doi: 10.1016/j.jip.2015.07.011

Basuyaux O., Buret R., Laisney N., Jacquette J.-M., 2012. *Prédation par les perceurs dans le secteur conchylicole de la pointe d'Agon à Gouville sur mer*. SMEL

Basuyaux O., Lelièvre Y., 2003. *Infestation des cordes mytilicoles et optimisation de la collecte des perceurs*. SMEL

Bayne B., Brown D., Harrisson F., Yevich P., 1980. Mussel health. In: The International Mussel Watch. E. D. GOLDBERG, Washington DC, 163-235

Bayne B., Worrall C., 1980. Growth and Production of Mussels *Mytilus edulis* from Two Populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **3** (0): 317-328, doi: 10.3354/meps003317

Beaz-Hidalgo R., Balboa S., Romalde J.L., Figueras M.J., 2010. Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ. Microbiol. Rep.*, **2** (1): 34-43, doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x

Beaz-Hidalgo R., Doce A., Pascual J., Toranzo A.E., Romalde J.L., 2009. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in north-western Spain. *Syst. Appl. Microbiol.*, **32** (2): 111-117, doi: 10.1016/j.syapm.2008.12.002

Béchemin C., Soletchnik P., Polsenaere P., Le Moine O., Pernet F., Protat M., Fuhrmann M., Quéré C., Goulitquer S., Corporeau C., others, 2015. Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais. *Bull. Épidémiologie Santé Anim. Aliment.* (67): 6–9

Béchemin C., Soletchnik P., Polsenaere P., Le Moine O., Pernet F., Protat M., Fuhrmann M., Quéré C., Goulitquer S., Corporeau C., Renault T., Lapègue S., Travers M.A., Morga B., Garrigues M., Garcia C., Haffner P., Dubreuil C., Faury N., Baillon L., 2014. Surmortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014) - Rapport d'expertise

Ben Cheikh Y., Travers M.-A., Le Foll F., 2017. Infection dynamics of a V. splendidus strain pathogenic to Mytilus edulis : In vivo and in vitro interactions with hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, **70**515-523, doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.047

Ben Cheikh Y., Travers M.-A., Morga B., Godfrin Y., Rioult D., Le Foll F., 2016. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Dev. Comp. Immunol.*, **57** (0): 107-119, doi: 10.1016/j.dci.2015.12.014

Benabdelmouna A., Garcia C., Ledu C., Lamy P., Maurouard E., Dégremont L., 2018a. Mortality investigation of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in France: An experimental survey under laboratory conditions. *Aquaculture*, **495**831-841, doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.075

Benabdelmouna A., Ledu C., 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. *J. Invertebr. Pathol.*, **138** (0): 30-38, doi: 10.1016/j.jip.2016.06.001

Benabdelmouna A., Saunier A., Ledu C., Travers M.-A., Morga B., 2018b. Genomic abnormalities affecting mussels (*Mytilus edulis-galloprovincialis*) in France are related to ongoing neoplastic processes, evidenced by dual flow cytometry and cell monolayer analyses. *J. Invertebr. Pathol.*, **157** (0): 45-52, doi: 10.1016/j.jip.2018.08.003

Bernard I., Allain G., 2017. *Mortalités des moules en Bretagne nord : bilan des connaissances*. CRC Bretagne Nord

Bernard I., Charles M., Allain G., Burioli E.A.V., Villalba A., Le Foll F., Deydier Y., Houssin M., 2018. *Bilan de l'observatoire des mortalités de moules en Bretagne Nord pour la saison 2016-2017 et premiers éléments sur les organismes pathogènes présents*. CRC Bretagne Nord

Berthe F.C.J., 2002. *Pacem in terris pathogenibus bonae voluntatis* : molluscs-pathogens relationships prospects. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22** (2): 52

Berthe F.C.J., Le Roux F., Adlard R.D., Figueras A., 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17** (4): 433-448, doi: 10.1051/alr:2004051

Bierne N., Borsa P., Daguin C., Jollivet D., Viard F., Bonhomme F., David P., 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mol. Ecol.*, **12** (2): 447-461, doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x

Binet D., 1999. Les pêches côtières de la baie du Mont-Saint-Michel à la baie de Bourgneuf au début du XIXe siècle

Blanchard M., 2009. Recent expansion of the slipper limpet population (*Crepidula fornicata*) in the Bay of Mont-Saint-Michel (Western Channel, France). *Aquat. Living Resour.*, **22** (1): 11-19, doi: 10.1051/alr/2009004

Blegvad H., 1930. Mortality among animals of the Littoral Region in IceWinters. Rep. Dan. Biol. Station no. XXXV, Copenhagen, 1929. *ICES J. Mar. Sci.*, **5** (3): 430-432, doi: 10.1093/icesjms/5.3.430-a

Bompais X., 1991. *Les filières pour l'élevage des moules - Guide pratique*. Ifremer

Boromthanarat S., Deslous-Paoli J.M., Heral M., 1987. Reproduction et recrutement de *Mytilus edulis* L. cultivée sur les bouchots du bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, **16** (0): 317-326

Bouhier A., 1998. La mytiliculture en baie de l'Aiguillon et sur les rivages voisins (1960-1997). Permanences et nouveautés dans un vieux métier de la mer. *Norois*, **179** (1): 361-384, doi: 10.3406/noroi.1998.6880

Bower S.M., 2006. Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : néoplasie hémique des moules. Pêch. Océans Can., http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/hcnmu-fra.html

Bower S.M., 2009a. Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : *Mytilicola intestinalis*, maladie de vers rouges chez les moules. Pêch. Océans Can., http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mirwdmu-fra.html

Bower S.M., 2009b. Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : *Proctoeces maculatus*, maladie des trématodes chez les moules. Pêch. Océans Can., http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mtdmu-fra.html

Bower S.M., 2010. Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : Virus non identifié dans les inclusions de type viral des huîtres et de la signification inconnue. Pêch. Océans Can., http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/assortvirusoy-fra.html

Bower S.M., 2011. Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : Marteiliose des moules, *Marteilia refringens/maurini* des moules. Pêch. Océans Can., http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mrmaurmu-fra.html

Bower S.M., Blackbourn' J., Meyer G.R., Nishimura' D.J.H., 1992. Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoenis*) in British Columbia, Canada. *Aquaculture*, **107** (0): 201-210

Brevik Ø.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A., 2011. *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.*, **111** (5): 1044-1056, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x

Brienne H., 1964. *Observations sur l'infestation des moules du pertuis breton par* Mytilicola intestinalis *Steuer*. Ifremer

Brooks K.M., 1991. The genetics and epizootiology of hemic neoplasia in *Mytilus edulis*. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, USA

Bruto M., James A., Petton B., Labreuche Y., Chenivesse S., Alunno-Bruscia M., Polz M.F., Le Roux F., 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J.*, **11** (4): 1043-1052, doi: 10.1038/ismej.2016.162

Bruto M., Labreuche Y., James A., Piel D., Chenivesse S., Petton B., Polz M.F., Roux F.L., 2018. Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *ISME J.*, **12** (12): 2954-2966, doi: 10.1038/s41396-018-0245-3

Burioli E.A.V., Charles M., Bernard I., Pitel P.H., Houssin M., 2017. First description of disseminated neoplasia in *Mytilus edulis* in northern Brittany (France) and development of a rapide diagnostic tool. 2nd International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR). Sète, France

Burioli E.A.V., Charles M., Trancart S., Kristmundsson Á., Freeman M.A., Houssin M., in prep. Description of an apicomplexan parasite in the haemocytes of the blue mussel *Mytilus edulis* in Northern Brittany (France)

Burioli E.A.V., Trancart S., Simon A., Bernard I., Charles M., Oden E., Bierne N., Houssin M., 2019. Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *J. Invertebr. Pathol.*, **168**107271, doi: 10.1016/j.jip.2019.107271

Campbell S.A., 1970. The occurrence and effects of *Mytilicola intestinalis* in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **5** (1): 89-95

Canzonier W.J., 1972. *Cercaria tenuans*, larval trematode parasite of *Mytilus* and its significance in mussel culture. *Aquaculture*, **1** (0): 267-278

Carballal M., López M., Azevedo C., Villalba A., 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **29** (0): 127-135, doi: 10.3354/dao029127

Carballal M.J., Barber B.J., Iglesias D., Villalba A., 2015. Neoplastic diseases of marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.*, **131** (0): 83-106, doi: 10.1016/j.jip.2015.06.004

Carrasco N., Green T., Itoh N., 2015. *Marteilia* spp. parasites in bivalves: A revision of recent studies. *J. Invertebr. Pathol.*, **131** (0): 43-57, doi: 10.1016/j.jip.2015.07.016

Caspers H., 1939. Über Vorkommen und Metamorphose von *Mytilicola intestinalis* Steuer (Copepoda parasitica) in der süddlichen Nordsee. *Zool Anz.*, **CXXVI**161-171

Cawthorne D.F., 1979. A comparative study of the closure responses of some cirripede species exposed to falling seawater concentrations. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **59** (4): 811-817, doi: 10.1017/S0025315400036857

Chatchavalvanich K., Jindamongkon P., Kovitvadhi U., Thongpan A., Kovitvadhi S., 2006. Histological structure of gonads in the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1900. *Invertebr. Reprod. Dev.*, **49** (4): 245-253, doi: 10.1080/07924259.2006.9652214

Cheng T.C., 1984. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In: Invertebrate Blood. Boston, MA, 111-146

Chéramy J., 2001. Autoécologie et éthologie de l'annélide polychète *Polydora ciliata* (Johnston,1828)

Ciocan C., Sunila I., 2005. Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania. *Mar. Pollut. Bull.*, **50** (11): 1335-1339, doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.04.042

Cloern J.E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.*, **34** (2): 127-168, doi: 10.1029/96RG00986

CNC, 2016. La Production française. Com. Natl. Conchyl., http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx (consulté le 02 juin 2019)

Cochennec-Laureau N., Schapira M., Bouget J.-F., Manach S., Retho M., Le Merrer Y., Schmitt A., Pierre-Duplessix O., Gabellec R., Normand J., Combette A., 2018. *Expertise sur le contexte hydro-climatologique de la baie de Pénestin pour décrire les conditions physio-chimiques environnementales et l'impact possible sur les mortalités de moules.* Ifremer, DDTM 56, DML, SAMEL, Unité Cultures Marines

Coles J., Farley S., Pipe R., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organ.*, **22** (0): 59-65, doi: 10.3354/dao022059

Colwell R.R., Kaper J., Joseph S.W., 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Other Vibrios: Occurrence and Distribution in Chesapeak Bay. *Science*, **198** (4315): 394-396, doi: 10.1126/science.910135

Combette A., 2018. *REPAMO 2018 - Bulletins de la surveillance - Janvier à Décembre 2018*. Ifremer

Comps M., Pichot Y., Papagianni P., 1982. Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, **45** (3): 211-214

Cooper K.R., Brown R.S., Chang P.W., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **39** (2): 149-157, doi: 10.1016/0022-2011(82)90004-0

Cormier-Salem M.-C., Mbaye A., 2018. Les « terroirs » maritimes revisités - Fin ou renouveau dans le contexte de la globalisation des mers et des littoraux ouest-africains ? *Rev. D'ethnoécologie* (13): , doi: 10.4000/ethnoecologie.3433

Cosson-Mannevy M.A., Wong C.S., Cretney W.J., 1984. Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from Southern Vancouver Island waters, British Columbia. *J. Invertebr. Pathol.*, **44** (2): 151-160, doi: 10.1016/0022-2011(84)90006-5

Couteaux-Bargeton M., 1953. Contribution à l'étude de *Mytilus edulis* L. parasité par *Mytilicola intestinalis* Steuer. *ICES J. Mar. Sci.*, **19** (1): 80-84, doi: https://doi.org/10.1093/icesjms/19.1.80

CRC Bretagne Sud, Ifremer, 2015. PREDADOR : un répulsif acoustique pour lutter contre la menace des daurades royales

CRC Normandie-Mer du Nord, 2017. *Demande de dérogation pour la perturbation intentionnelle de goélands argentés sur l'archipel des îles Chausey* (Demande de dérogation pour la perturbation intentionnelle de specimens d'espèces animales protégées)

CRC Pays de la Loire, 2012. Carnet de Bord n°3 - Mytiliculture en Pays de la Loire

Cuénot L., 1891. Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. *Arch. Zool. Expérimentale Générale*, **9** (0): 13-90

Cuevas N., Zorita I., Costa P.M., Franco J., Larreta J., 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat. Toxicol.*, **162** (0): 152-164, doi: 10.1016/j.aquatox.2015.03.011

Cugier P., 2010. *Impact des facteurs environnementaux et des pratiques conchylicoles sur l'écosystème de la baie du Mont Saint Michel et la production conchylicole. Etudes de scenarii par modélisation (IPRAC)*. Ifremer

Cugier P., Struski C., Blanchard M., Mazurié J., Pouvreau S., Olivier F., Trigui J.R., Thiébaut E., 2010. Assessing the role of benthic filter feeders on phytoplankton production in a shellfish farming site: Mont Saint Michel Bay, France. *J. Mar. Syst.*, **82** (1-2): 21-34, doi: 10.1016/j.jmarsys.2010.02.013

da Silva P.M., Comesana P., Fuentes J., Villalba A., 2008. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol.*, **24** (5): 551-563, doi: 10.1016/j.fsi.2007.11.003

da Silva P.M., Soudant P., Carballal M.J., Lambert C., Villalba A., 2005. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Organ.*, **67** (1-2): 133-9

Davenport J., Chen X., 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (Mytilus edulis L.). *J. Molluscan Stud.*, **53** (3): 293-297, doi: 10.1093/mollus/53.3.293

Davey J.T., 1989. *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Cyclopoida): A ten year survey of infested mussels in a Cornish Estuary, 1978–1988. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **69** (04): 823-836, doi: 10.1017/S0025315400032197

de Lorgeril J., Lucasson A., Petton B., Toulza E., Montagnani C., Clerissi C., Vidal-Dupiol J., Chaparro C., Galinier R., Escoubas J.-M., Haffner P., Dégremont L., Charrière G.M., Lafont M., Delort A., Vergnes A., Chiarello M., Faury N., Rubio T., Leroy M.A., Pérignon A., Régler D., Morga B., Alunno-Bruscia M., Boudry P., Le Roux F., Destoumieux-Garzón D., Gueguen Y., Mitta G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.*, **9** (1): 1-14, doi: 10.1038/s41467-018-06659-3

Dégremont L., Maurouard E., Rabiller M., Glize P., 2019. Response to selection for increasing resistance to the spring mortality outbreaks in *Mytilus edulis* occurring in France since 2014. *Aquaculture*, **511** (0): 734269, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734269

Delaporte M., Synard S., Pariseau J., McKenna P., Tremblay R., Davidson J., Berthe F.C.J., 2008. Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry. *J. Invertebr. Pathol.*, **98** (2): 190-197, doi: 10.1016/j.jip.2007.12.005

Desser S.S., Bower S.M., Hong H., 1998. *Pseudoklossia semiluna* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) : a coccidian parasite of the kidney of blue missels, species of *Mytilus*, from British Columbia, Canada. *Parasite*, **5** (1): 17-22, doi: 10.1051/parasite/1998051017

Devauchelle N., Barret J., Salaun G., 1995. *La Reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France*. Ifremer

Deydier Y., 2016. *Etude socio-économique de la conchyliculture en Bretagne Nord (2013)*. CRC Bretagne Nord

Dickie L.M., Boudreau P.R., Freeman K.R., 1984. Influences of Stock and Site on Growth and Mortality in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41** (1): 134-140, doi: 10.1139/f84-013

Didierlaurent S., Lamare V., Müller Y., 2017. *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758

Directive 95/70/CE, 1995. Directive 95/70/CE du Conseil du 22 décembre 1995 établissant des mesures communautaires minimales de contrôle de certaines maladies des mollusques bivalves. *J. Off. Union Eur.*, **L. 332** (0): 33-39

Directive 2006/88/CE, 2006. Directive relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et relative à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies. *J. Off. Union Eur.*, **L. 328** (0): 14-56

Dollfus R., 1927. Notules sur des copépodes parasitES de la faune française. *Bull. Société Zool. Fr.*, **LII** (2): 121

Dubremetz J.F., Ferguson D.J.P., 2009. The role played by electron microscopy in advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. *Int. J. Parasitol.*, **39** (8): 883-893, doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.009

Dundee D.S., 1953. Formed Elements of the Blood of Certain Fresh-Water Mussels. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **72** (3): 254, doi: 10.2307/3223452

Eggermont M., Bossier P., Pande G.S.J., Delahaut V., Rayhan A.Md., Gupta N., Islam S.S., Yumo E., Nevejan N., Sorgeloos P., Gomez-Gil B., Defoirdt T., 2017. Isolation of Vibrionaceae from wild blue mussel (*Mytilus edulis*) adults and their impact on blue mussel larviculture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **93** (4): 11, doi: 10.1093/femsec/fix039

Eggermont M., Tamanji A., Nevejan N., Bossier P., Sorgeloos P., Defoirdt T., 2014. Stimulation of heterotrophic bacteria associated with wild-caught blue mussel (*Mytilus edulis*) adults results in mass mortality. *Aquaculture*, **431** (0): 136-138, doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.014

Eiler A., Gonzalez-Rey C., Allen S., Bertilsson S., 2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **60** (3): 411-418, doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00303.x

Ellenby C., 1947. A Copepod parasite of the mussel new to the British fauna. *Nat. Lond.*, **CLIX** (0): 645-646

Elsner N.O., Jacobsen S., Thieltges D.W., Reise K., 2011. Alien parasitic copepods in mussels and oysters of the Wadden Sea. *Helgol. Mar. Res.*, **65** (3): 299-307, doi: 10.1007/s10152-010-0223-2

Elston R., Drum A., Allen S., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Organ.*, **8** (0): 51-59, doi: 10.3354/dao008051

Elston R.A., Kent M.I., Drum A.S., 1988a. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **4** (0): 135-142, doi: 10.3354/dao004135

Elston R.A., Kent M.L., Drum A.S., 1988b. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Dev. Comp. Immunol.*, **12** (4): 719-727, doi: 10.1016/0145-305X(88)90047-X

Elston R.A., Moore J.D., Brooks K., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Aquat. Sci.*, **6** (0): 405-466

FAO, 2009. *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) [Mytilidae]. Cult. Aquat. Species Fact Sheets, http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/fr/fr_bluemussel.htm (consulté le 02 juin 2019)

FAO, 2016. Demand for European mussels within the EU on the decline. GLOBEFISH - Inf. Anal. World Fish Trade, http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/450826/ (consulté le 02 juin 2019)

FAO, 2018. Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/

Farley C.A., 1969. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.*, **43** (2): 509-516, doi: 10.1093/jnci/43.2.509

Farley C.A., Otto S., Reinisch C.L., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chespeake bay soft shell clams, *Mya arenaria*. *Fish. Bull.*, **84** (4): 851-857

Figueras A.J., Jardon C.F., Caldas J.R., 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, **99** (1-2): 17-33, doi: 10.1016/0044-8486(91)90285-F

Fly E.K., Hilbish T.J., Wethey D.S., Rognstad R.L., 2015. Physiology and biogeography: The response of European mussels (*Mytilus* spp.) to climate change. *Am. Malacol. Bull.*, **33** (1): 136-149, doi: 10.4003/006.033.0111

Flye-Sainte-Marie J., Soudant P., Lambert C., Le Goïc N., Goncalvez M., Travers M.-A., Paillard C., Jean F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **377** (1): 1-11, doi: 10.1016/j.jembe.2009.06.003

FranceAgriMer, 2014. *L'image de la moule auprès des consommateurs et des professionnels*

François C., Garcia C., Lupo C., Travers M.A., Morga B., Tourbiez D., Faury N., Haffner P., Serpin D., Dubreuil C., Chollet B., Baillon L., Lapègue S., Renault T., 2015. *Bilan 2014 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*. Ifremer

Freeman, Kenneth R., 1974. *Growth, Mortality, and Seasonal Cycle of Mytilus edulis in Two Nova Scotian Embayments*

Freeman M.A., Yokoyama H., Ogawa K., 2008. Description and phylogeny of *Ceratomyxa anko* sp. n. and *Zschokkella lophii* sp. n. from the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan). *J. Fish Dis.*, **31** (12): 921-930, doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.00965.x

Frénal K., Soldati-Favre D., 2013. Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes. *médecine/sciences*, **29** (5): 515-522, doi: 10.1051/medsci/2013295015

Fuentes J., López J.L., Mosquera E., Vázquez J., Villalba A., Álvarez G., 2002. Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW of Spain). *Aquaculture*, **213** (1): 233-251, doi: 10.1016/S0044-8486(02)00046-7

Fuentes J., Reyero I., Zapata C., Alvarez G., 1994. Production traits of the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW of Spain) : relative effects of source of seed and growing environment. *Aquaculture*, **122** (0): 19-31

Fuentes J., Villalba A., Zapata C., Alvarez G., 1995. Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.*, **21** (0): 221-226, doi: 10.3354/dao021221

Gaitán-Espitia J.D., Quintero-Galvis J.F., Mesas A., D'Elía G., 2016. Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorphia): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Sci. Rep.*, **6** (1): 26853, doi: 10.1038/srep26853

Garcia C., Arzul I., Chollet B., Francois C., Goubet A., Joly J.-P., Miossec L., Robert M., Cuvelier N., Lefebvre A., Le Gagneur E., Ropert M., Mouillard G., Gerla D., Le Gal D., Rocher G., Langlade A., Bedier E., Nourry M., Martin J.-L., Constantini L., Masson J.-C., Martin A.-G., 2005. *Bilan 2004 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques marins*. Ifremer

Garcia C., Arzul I., Robert M., Chollet B., Joly J.P., Miossec L., François C., 2009. Detection of atypical *Marteilia refringens* in mussels, *Mytilus edulis* in France. 101st Annual Meeting National Shellfisheries Association (NSA). Savannah, Georgia

Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M., Nicolas J.-L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.*, **53** (2): 187-196, doi: 10.1007/s00248-006-9061-9

Gay M., 2004. Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle

Gay M., Berthe F., Le Roux F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.*, **59** (0): 49-56, doi: 10.3354/dao059049

Gay M., Waechter M., Lambert C., Escoubas J.-M., Cochennec N., Nicolas J.-L., Berthe F., Le Roux F., 2001. Caractérisation de bactéries pathogènes, *Vibrio splendidus*, isolées de bivalves marins. Journées Conchylicoles Ifremer 2001

Gerla D., 1990. *Exemple de gestion d'un bassin mytilicole - La Baie du Mont St - Michel*. Ifremer

Glize P., Gourmelen G., 2018. *Suivi de la mortalité de populations de moules en Pays de la Loire : Programme TESCOR 2*. SMIDAP & CRC des Pays de la Loire

Goedknegt M.A., Thieltges D.W., van der Meer J., Wegner K.M., Luttikhuizen P.C., 2018. Cryptic invasion of a parasitic copepod: Compromised identification when morphologically similar invaders co-occur in invaded ecosystems. *PLOS ONE*, **13** (3): e0193354, doi: 10.1371/journal.pone.0193354

González-Tizón A., Martínez-Lage A., Ausio J., Méndez J., 2000. Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. *Genome*, **43** (2): 409-411, doi: 10.1139/g99-138

Gosling E., 1992. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier Science. E. Gosling, Amsterdam, 589 p. (Coll. Developments in aquaculture and fisheries science)

Gosling E., 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. E. Gosling, Oxford, 443 p.

Goudenège D., Travers M.A., Lemire A., Petton B., Haffner P., Labreuche Y., Tourbiez D., Mangenot S., Calteau A., Mazel D., Nicolas J.L., Jacq A., Le roux F., 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters: Comparative genomics of *Vibrio aestuarianus*. *Environ. Microbiol.*, **17** (11): 4189-4199, doi: 10.1111/1462-2920.12699

Goulletquer P., Joly J.P., Le Gagneur E., Ruelle F., 1995. *La mytiliculture dans la Manche : Biomasses en élevage et croissance de* Mytilus edulis *L.* Ifremer

Goulletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N., Taillade S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes Oléron (France). In: ICES Mariculture Committee CM1998/CC:14 Theme Session: Population Biology. 14-21

Grizel H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linne et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc

Grizel H., Bonami J.R., Cousserans F., Duthoit J.L., Le Pennec M.A., 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche Bull. Institutionnel Pêch. Mar.*, **240**7-30

Grizel H., Tigé G., 1973. La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis* Linne. In: Actes CIEM, CM 1973/K:13 (Comité des crustacés, coquillages et benthos)

Gruet Y., 2002. Reconnaissance de quelques espèces communes de crustacés (balanes et crabes) : au site mésolithique de Beg-er-Vil (Morbihan, France). *Rev. Archéom.*, **26** (1): 125-139, doi: 10.3406/arsci.2002.1028

Guillou M., 1981. Les populations d'*Asterias rubens* L. (Echinodermata : Asteroidea) en baie de Douarnenez (Finistère). Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale

Gustafson P.V., Agar H.D., Cramer D.I., 1954. An electron microscope study of *Toxoplasma*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **3** (6): 1008-1022

Gutierrez M., Sarasquete M.C., 1987. A case of Hyaline Hemocytosarcome in the mussel, *Mytilus edulis* L. (Pelecypoda: Mytilidae) from the North-western coast of Spain. *Investig. Pesq.*, **50** (2): 265-269

Hanington P.C., Forys M.A., Dragoo J.W., Zhang S.-M., Adema C.M., Loker E.S., 2010. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107** (49): 21087-21092, doi: 10.1073/pnas.1011242107

Hazleton B.J., George R., 1977. Formed blood elements of the mussel *Elliptio complanatum*. *Proc. Pa. Acad. Sci.*, **51** (1): 54-56

Hill B.J., Alderman D.J., 1979. Observations on the experimental infection of *Ostrea edulis* with two molluscan viruses. *Haliotis*, **8** (0): 297-299

Hillis D.M., Dixon M.T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *Q. Rev. Biol.*, **66** (4): 411-453, doi: 10.1086/417338

Hine P., 2002. Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a possible predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Organ.*, **51** (0): 49-60, doi: 10.3354/dao051049

Hine P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, **9** (5): 367-385, doi: 10.1006/fsim.1998.0205

His E., Cantin C., 1995. *Biologie et physiologie des coquillages*. Ifremer

Huehner M.K., Etges F.J., 1981. Encapsulation of Aspidogaster conchicola (Trematoda: Aspidogastrea) by unionid mussels. *J. Invertebr. Pathol.*, **37** (2): 123-128, doi: 10.1016/0022-2011(81)90065-3

Humphries J.E., Yoshino T.P., 2008. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, **32** (5): 554-562, doi: 10.1016/j.dci.2007.09.001

ICES, 2017. Disseminated neoplasms in bivalves - Originals by Alderman, D. J., Green, M. (No 11) and Balouet, G. (No 12) Revised by Tristan Renault and Susan Ford

Inglis S.D., Kristmundsson Á., Freeman M.A., Levesque M., Stokesbury K., 2016. Gray meat in the Atlantic sea scallop, *Placopecten magellanicus*, and the identification of a known pathogenic scallop apicomplexan. *J. Invertebr. Pathol.*, **141** (0): 66-75, doi: 10.1016/j.jip.2016.10.008

Jahangard S., Williams M., Mercer J., Ab Rahim E., Ingram B., 2010. *A technical report on hatchery production of blue mussel* Mytilus galloprovincialis *at the Victoria Shellfish Hatchery (VSH), Queenscliff - 2008*. Department of primary industries

Jones J.B., Scotti P.D., Dearing S.C., Wesney B., 1996. Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. *Dis. Aquat. Organ.*, **25** (1-2): 143–149

Jordan H.E., 1952. A Textbook of Histology. Appleton-Century-Crofts, NY, 687 p.

Kamaishi T., Miwa S., Goto E., Matsuyama T., Oseko N., 2010. Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. *Dis. Aquat. Organ.*, **89**145-154, doi: 10.3354/dao02188

Kawahara M., Kanamori M., Meyer G.R., Yoshinaga T., Itoh N., 2018. *Francisella halioticida*, Identified as the Most Probable Cause of Adductor Muscle Lesions in Yesso scallops *Patinopecten yessoensis* Cultured in Southern Hokkaido, Japan. *Fish Pathol.*, **53** (2): 78-85, doi: 10.3147/jsfp.53.78

Kawahara M., Meyer G., Lowe G., Kim E., Polinski M., Yoshinaga T., Itoh N., 2019. Parallel studies confirm *Francisella halioticida* causes mortality in Yesso scallops *Patinopecten yessoensis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **135** (2): 127-134, doi: 10.3354/dao03383

Kent M.L., Elston R.A., Wilkinson M.T., Drum A.S., 1989. Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hemic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.*, **53** (3): 378-386, doi: 10.1016/0022-2011(89)90103-1

Kerr R., Ward G.M., Stentiford G.D., Alfjorden A., Mortensen S., Bignell J.P., Feist S.W., Villalba A., Carballal M.J., Cao A., Arzul I., Ryder D., Bass D., 2018. *Marteilia refringens* and *Marteilia pararefringens* sp. nov. are distinct parasites of bivalves and have different European distributions. *Parasitology*, **145** (11): 1483-1492, doi: 10.1017/S003118201800063X

Kinne O. (Ed.), 1980. Diseases of marine animals. Vol. 1: General Aspects, Protozoa to Gastropoda. John Wiley & Sons, Ltd. Kinne, Otto, 466 p. (Coll. Diseases of Marine Animals)

Korringa P., 1963. *Polydora ciliata* as Pest in Mussel-Farming. Shellfish Committe n°80. International Council for the Exploration of the Sea

Korringa P., Lambert L., 1951. Quelques observations sur la fréquence de *Mytilicola intestinalis* steuer (Copepoda parasita) dans les moules du littoral méditerranéen français15

Kristmundsson Á., Erlingsdóttir Á., Freeman M.A., 2015. Is an Apicomplexan Parasite Responsible for the Collapse of the Iceland Scallop (*Chlamys islandica*) Stock? *PLOS ONE*, **10** (12): e0144685, doi: 10.1371/journal.pone.0144685

Kristmundsson Á., Freeman M.A., 2018. Harmless sea snail parasite causes mass mortalities in numerous commercial scallop populations in the northern hemisphere. *Sci. Rep.*, **8** (7865): , doi: 10.1038/s41598-018-26158-1

Kristmundsson Á., Helgason S., Bambir S.H., Eydal M., Freeman M.A., 2011a. *Margolisiella islandica* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeridae) infecting Iceland scallop *Chlamys islandica* (Müller, 1776) in Icelandic waters. *J. Invertebr. Pathol.*, **108** (3): 139-146, doi: 10.1016/j.jip.2011.08.001

Kristmundsson Á., Helgason S., Bambir S.H., Eydal M., Freeman M.A., 2011b. Previously unknown apicomplexan species infecting Iceland scallop, *Chlamys islandica* (Müller, 1776), queen scallop, *Aequipecten opercularis* L., and king scallop, *Pecten maximus* L. *J. Invertebr. Pathol.*, **108** (3): 147-155, doi: 10.1016/j.jip.2011.08.003

Kueh C.S.W., Chan K., 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bacteriol.*, **59** (1): 41-47, doi: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb01773.x

Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33** (7): 1870-1874, doi: 10.1093/molbev/msw054

Kwan T., Bolch C., 2015. Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. *Dis. Aquat. Organ.*, **116** (1): 37-46, doi: 10.3354/dao02905

Labecka A.M., Domagala J., 2019. Two pathways for spermatogenesis in *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae). *J. Molluscan Stud.*, doi: 10.1093/mollus/eyz012

Lacchini A.H., Davies A.J., Mackintosh D., Walker A.J., 2006. beta-1, 3-glucan modulates PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* defence cells: a role for PKC in H2O2 production and downstream ERK activation. *J. Exp. Biol.*, **209** (24): 4829-4840, doi: 10.1242/jeb.02561

Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M., Poulet S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Organ.*, **46** (2): 139–145

Lamare V., Castillo J.-P., Pastor J., 2017. *Sparus aurata* Linnaeus, 1758

Lambert L., 1935. Mytiliculture - La culture de la moule en Hollande. *Rev. Trav. Off. Pêch. Marit.*431-480

Lambert L., 1952. Un parasite de la moule, le cop rouge (*Mytilicola intestinalis* Steur). *Rev. Décologie - Terre Vie*, **0** (0): 80-94

Landsberg J.H., 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *J. Shellfish Res.*, **15** (2): 203-230

Lang W.H., Dennis E.A., 1976. Morphology and seasonal incidence of infection of *Proctoeces maculatus* (Looss, 1901) Odhner, 1911 (Trematoda) in *Mytilus edulis* L. *Ophelia*, **15** (1): 65-75, doi: 10.1080/00785326.1976.10425450

Laruelle F., Molloy D.P., Roitman V.A., 2002. Histological analysis of trematodes in *Dreissena polymorpha*: their location, pathogenicity, and distinguishing morphological characteristics. *J. Parasitol.*, **88** (5): 856-863, doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0856:HAOTID]2.0.CO;2

Lasa A., Cesare A. di, Tassistro G., Borello A., Gualdi S., Furones D., Carrasco N., Cheslett D., Brechon A., Paillard C., Bidault A., Pernet F., Canesi L., Edomi P., Pallavicini A., Pruzzo C., Vezzulli L., 2019. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environ. Microbiol.*, **00** (00): , doi: 10.1111/1462-2920.14750

Lauckner G., 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Diseases of marine animals. Vol. 2: Introduction, Bivalvia to Scaphopoda,Diseases of Marine Animals. (Coll. Diseases of Marine Animals), 477-961

Le Breton J., Lubet P., 1992. Resultats d'une intervention sur une parasitose à *Proctoeces maculatus* (Trematoda, Digenea) affectant la mytiliculture de l'ouest Cotentin. In: Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990. 107-118

Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J., Dagher Z., Leboulenger F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.*, **28** (2): 372-386, doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.011

Le Grand F., Kraffe E., Montaudouin X. de, Villalba A., Marty Y., Soudant P., 2010. Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment. *J. Invertebr. Pathol.*, **104** (2): 110-118, doi: 10.1016/j.jip.2010.01.011

Le Roux F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.*, **15** (4): 251-258, doi: 10.1016/S0990-7440(02)01176-2

Le Roux F., Lorenzo L., Peyret P., Audemard C., Figueras A., Vivares C., Gouy M., Berthe F., 2001. Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48** (4): 449-454, doi: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00178.x

Le Roux F., Wegner K.M., Baker-Austin C., Vezzulli L., Osorio C.R., Amaro C., Ritchie J.M., Defoirdt T., Destoumieux-Garzón D., Blokesch M., Mazel D., Jacq A., Cava F., Gram L., Wendling C.C., Strauch E., Kirschner A., Huehn S., 2015. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front. Microbiol.*, **6**, doi: 10.3389/fmicb.2015.00830

Léger L., Duboscq O., 1917. *Pseudoklossia pectinis* n. sp. et l'origine des adéleidées. *Arch. Zool. Expérimentale Générale*, **68** (Suppl Notes Rev): 88-94

Lemire A., Goudenège D., Versigny T., Petton B., Calteau A., Labreuche Y., Le Roux F., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.*, **9** (7): 1523-1531, doi: 10.1038/ismej.2014.233

Loker E.S., Bayne C.J., Buckley P.M., Kruse K.T., 1982. Ultrastructure of Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Mother Sporocysts by Hemocytes of Juveniles of the 10-R2 Strain of *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, **68** (1): 84, doi: 10.2307/3281328

Lokmer A., Wegner K.M., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.*, **9** (3): 670-682, doi: 10.1038/ismej.2014.160

Lowe D.M., Moore M.N., 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis*. *J. Natl. Cancer Inst.*, **60** (6): 1455–1459, doi: https://doi.org/10.1093/jnci/60.6.1455

Lowe D.M., Moore M.N., 1979. The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Mar. Pollut. Bull.*, **10** (5): 137-141, doi: 10.1016/0025-326X(79)90081-X

Lowen J.B., 2008. To grow and survive or reproduce and die? Life-history strategies and ecological interactions between the mussels *Mytilus edulis* (Linneaus, 1758) and

Mytilus trossulus (Gould, 1850) in the northwest Atlantic. PhD Thesis, Memorial University of Newfoundland
Lubet P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, **23** (4): 390-548
Lubet P., 1973. *Exposé synoptique des données biologiques sur la moule Mytilus galloprovincialis (Lamarck 1819)* (FAO Rapports sur les pêches No. 88). FAO, Rome
Lubet P., 1974. La mytiliculture et son évolution récente. *Penn Ar Bed - Rev. Régionale Géographie Sci. Nat. Prot. Nat.*, **9** (77):
Lubet P., Dardignac M.J., 1976. Technologie de la mytiliculture. *Haliotis*, **5** (0): 19
Lupo C., Bougeard S., Chauvin C., Danion M., Allain G., Azéma P., Benoit F., Béchemin C., Berger K., Bernard I., Blachier P., Blin J.-L., Brieau L., Garcia A., Gervasoni E., Glize P., Lainé A., Lapègue S., Le Bihan V., Le Long C., Mablouké C., Poirier L., Raymond J.-C., Le Gall M., Le Bouquin S., 2019. *Revue systématique de la littérature relative aux facteurs de risque de mortalité des moules exploitées en France* (Rapport du Conseil scientifique et technique du programme de recherche en santé des coquillages : étude éco-épidémiologique). Ifremer / ANSES
Lupo C., François C., Arzul I., Garcia C., Joly J.-P., 2012. Défis de la surveillance des maladies chez les coquillages marins en France. *Epidémiologie Santé Anim.*, **61** (0): 27-42
Lupo C., Osta Amigo A., Fleury E., Robert S., Garcia C., Baillon L., Béchemin C., Canier L., Chollet B., Déchamps L., Dubreuil C., Faury N., François C., Godfrin Y., Lapègue S., Morga B., Travers M.-A., Tourbiez D., Masson J.-C., Vérin F., Cordier R., Gangnery A., Louis W., Mary C., Pénot J., Chevé J., Dagault F., Jolivet A.L., Le D., Lebrun L., Bellec G., Bouget J.-F., Cochennec-Laureau N., Palvadeau H., Grizon J., Chabirand J.-M., Pépin J.-F., D'Amico F., Maurer D., Orsoni V., Bouchoucha M., Roy V.L., Pouvreau S., Queau I., Lamoureux A., 2016. *Bilan 2015 du dispositif national de surveillance de la santé des mollusques marins*. Ifremer
Lupo C., Prou J., 2016. Enhanced surveillance of shellfish mortality to improve early detection and investigation of outbreaks of exotic or emerging infectious diseases: An example of a mass mortality outbreak of mussels, France 2014. *Prev. Vet. Med.*, **132** (0): 57-66, doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.08.007
Lydie C., Fleury E., Normand J., Garcia C., Geairon P., 2018. *REPAMO 2017 – Bulletins de la surveillance - Janvier à Décembre 2017*. Ifremer
Macián M.C., Garay E., González-Candelas F., Pujalte M.J., Aznar R., 2000. Ribotyping of *Vibrio* Populations Associated with Cultured Oysters (*Ostrea edulis*). *Syst. Appl. Microbiol.*, **23** (3): 409-417, doi: 10.1016/S0723-2020(00)80072-7
Mahé J.-L., 1994. Moules et mytiliculture en baie de l'Aiguillon. Rumeur des ages.
Mallet A.L., Carver C.E.A., Coffen S.S., Freeman K.R., 1987. Mortality Variations in Natural Populations of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44** (9): 1589-1594, doi: 10.1139/f87-192
Mallet A.L., Freeman K.R., Dickie L.M., 1986. The genetics of production characters in the blue mussel *Mytilus edulis*. I. A preliminary analysis. *Aquaculture*, **57** (0): 133-140
Mallet A.L., Haley L.E., 1984. General and specific combining abilities of larval and juvenile growth and viability estimated from natural oyster populations. *Mar. Biol.*, **81** (1): 53-59, doi: 10.1007/BF00397625
Markowitz K., Williams J., Krause M., 2016a. The trematode parasite *Proctoeces maculatus* in *Mytilus edulis*: detection of range expansion through qPCR
Markowitz K., Williams J., Krause M., 2016b. Development of quantitative PCR assay for detection of the trematode parasite *Proctoeces maculatus* in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **122** (2): 125-136, doi: 10.3354/dao03072
Marteil L., 1976. La conchyliculture française - 2e Partie - Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, **40** (2): 149-346
Matozzo V., Ercolini C., Serracca L., Battistini R., Rossini I., Granato G., Quaglieri E., Perolo A., Finos L., Arcangeli G., Bertotto D., Radaelli G., Chollet B., Arzul I., Quaglio F., 2018. Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through

histological, microbiological and biomarker analyses. *J. Invertebr. Pathol.*, **153** (0): 165-179, doi: 10.1016/j.jip.2018.02.018
Mayrand E., St-Jean S.D., Courtenay S.C., 2005. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? *Aquac. Res.*, **36** (10): 962-971, doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01302.x
McKindsey C.W., Thetmeyer H., Landry T., Silvert W., 2006. Review of recent carrying capacity models for bivalve culture and recommendations for research and management. *Aquaculture*, **261** (2): 451-462, doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.044
Mercier-Dupaty C.-J.-B., 1750. Mémoire sur les bouchots à moules pour servir à l'histoire naturelle du pays d'Aunis. Présenté par Jean-Louis Mahé (2013). Rumeur des Ages,
Metzger M.J., Reinisch C., Sherry J., Goff S.P., 2015. Horizontal Transmission of Clonal Cancer Cells Causes Leukemia in Soft-Shell Clams. *Cell*, **161** (2): 255-263, doi: 10.1016/j.cell.2015.02.042
Metzger M.J., Villalba A., Carballal M.J., Iglesias D., Sherry J., Reinisch C., Muttray A.F., Baldwin S.A., Goff S.P., 2016. Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, **534** (7609): 705-709, doi: 10.1038/nature18599
Meyer G., Lowe G., Gilmore S., Bower S., 2017. Disease and mortality among Yesso scallops *Patinopecten yessoensis* putatively caused by infection with *Francisella halioticida*. *Dis. Aquat. Organ.*, **125** (1): 79-84, doi: 10.3354/dao03130
Mikhailov A.T., Torrado M., Mendez J., 1995. Sexual differentiation of reproductive tissue in bivalve molluscs: identification of male associated polypeptide in the mantle of *Mytilus galloprovincialis* lmk. *Int. J. Dev. Biol.*, **39** (0): 545-548
Mikhailov A.T., Torrado M., Méndez J., Lopez M.J., 1996. Annual cycle of expression of connective tissue polypeptide markers in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, **126** (1): 77-89, doi: 10.1007/BF00571379
Mille D., 2017. *Etude de la déprédation aviaire sur les bouchots d'élevage mytilicole de Boyard.* (Volet productivité des études collaboratives CREAA - LPO menées pour le compte du CRC Poitou-Charentes. Bilan des deux saisons d'étude.). CREAA - LPO - CRC Poitou-Charentes
Mix M.C., 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *J. Fish Dis.*, **6** (3): 239-248, doi: 10.1111/j.1365-2761.1983.tb00072.x
MNHN, 2003. Inventaire National du Patrimoine Naturel, Site Web https://inpn.mnhn.fr (consulté le 06 août 2019)
Monfort M.-C., 2014. *The European market for mussels - GLOBEFISH Research Programme*. FAO
Moore J.D., Elston R.A., Drum A.S., 1991. Alternate Pathogenesis of Systemic Neoplasia in the Bivalve Mollusc *Mytilus*. *J. Invertebr. Pathol.*, **58** (2): 231-243, doi: https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90067-Z
Moore M.N., Lowe D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.*, **29** (1): 18-30, doi: 10.1016/0022-2011(77)90167-7
Moschino V., Del Negro P., De Vittor C., Da Ros L., 2016. Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): A five-year study using transplanted mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **128** (0): 1-10, doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.006
Munford J.G., DaRos L., Strada R., 1981. A study on the mass mortality of mussels in the laguna Veneta. *J. World Maric. Soc.*, **12** (2): 186-199, doi: 10.1111/j.1749-7345.1981.tb00294.x
Myrand B., Guderley H., Himmelman J.H., 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **197** (0): 193–207, doi: 10.3354/meps197193
Najdek M., Sapunar J., 1987. Total and methyl-mercury content in bivalves, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck and *Ostrea edulis* Linnaeus: Relationship of biochemical

composition and body size. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39** (1): 56-62, doi: 10.1007/BF01691789
Nakayama K., Nishijima M., Maruyama T., 1998. Parasitism by a Protozoan in the Hemolymph of the Giant Clam,*Tridacna crocea*. *J. Invertebr. Pathol.*, **71** (3): 193-198, doi: 10.1006/jipa.1997.4747
Narain A.S., 1972. Formed elements of the blood of the fresh water mussel, *Lamellidens corrianus*. *J. Morphol.*, **137** (1): 63-69, doi: 10.1002/jmor.1051370105
Nasfi H., Travers M.A., de Lorgeril J., Habib C., Sannie T., Sorieul L., Gerard J., Avarre J.C., Haffner P., Tourbiez D., Renault T., Furones D., Roque A., Pruzzo C., Cheslett D., Gdoura R., Vallaeys T., 2015. A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **31** (3): 461-475, doi: 10.1007/s11274-015-1800-y
Noël D., 1992. Etude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia). Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II
NOR: AGRG0825593A, 2008. Arrêté du 4 novembre 2008 relatif aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture et relatif à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies | Legifrance https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000019733219 (consulté le 01 octobre 2019)
Obert B., Michaelis H., 1991. History and ecology of the mussel beds (*Mytilus edulis* L.) in the catchment oarea of a Wadden Sea tidal inlet. In: Estuaries and coasts: spatial and temporal intercomparisons,ECSA19 Symposium. Fredensborg, (Coll. ECSA19 Symposium), 185-194
Oden E., Burioli E.A.V., Trancart S., Pitel P.H., Houssin M., 2016. Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus* sp. during mortality events. *Aquaculture*, **464** (0): 420-427, doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.024
OIE, 2019. Maladies, infections et infestations de la Liste de l'OIE en vigueur en 2019. OIE - World Organ. Anim. Health, https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2019/
Olsen A.B., Mikalsen J., Rode M., Alfjorden A., Hoel E., Straum-Lie K., Haldorsen R., Colquhoun D.J., 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *J. Fish Dis.*, **29** (5): 307-311, doi: 10.1111/j.1365-2761.2006.00714.x
OMS, 2018. World malaria report 2018
ONCFS, SRC Normandie-Mer du Nord, 2005a. *Les oiseaux prédateurs de moules dans le département de la Manche. Synthèse technique, Analyse des moyens de lutte.*
ONCFS, SRC Normandie-Mer du Nord, 2005b. *Les oiseaux prédateurs de moules dans le département de la Manche. Synthèse bibliographique, Phénologie du Goéland argenté et données complémentaires sur l'Eider à duvet et la macreuse noire.*
Oprandy J.J., Chang P.W., Pronovost A.D., Cooper K. r., Brown R.S., Yates V.J., 1981. Isolation of viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38** (0): 45-51
Ortigosa M., Esteve C., Pujalte M.-J., 1989. *Vibrio* Species in Seawater and Mussels: Abundance and Numerical Taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.*, **12** (3): 316-325, doi: 10.1016/S0723-2020(89)80080-3
Osta Amigo A., Robert S., Fleury E., Lupo C., Garcia C., Geairon P., Canier L., 2018. *Repamo 2016 – bulletins de la surveillance janvier à juin et décembre 2016*
Paillard C., Roux F.L., Borrego J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.*, **17** (0): 477-498, doi: 10.1051/alr:2004054

Papy L., 1941. L'homme et la mer sur la côte atlantique de la Loire à la Gironde. Etude de Géographie humaine. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 526 p.

Parisi M.-G., Li H., Jouvet L.B.P., Dyrynda E.A., Parrinello N., Cammarata M., Roch P., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.*, **25** (6): 834-840, doi: 10.1016/j.fsi.2008.09.005

Passarelli M.C., Riba I., Cesar A., DelValls T.A., 2018. What is the best endpoint for assessing environmental risk associated with acidification caused by CO2 enrichment using mussels? *Mar. Pollut. Bull.*, **128** (0): 379-389, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.055

Paul D., 1983. The incidence and effects of *Mytilicola intestinalis* in *Mytilus edulis* from the rias of Galicia, north west Spain. *Aquaculture*, **31** (0): 1-10

Peperzak L., Poelman M., 2008. Mass mussel mortality in The Netherlands after a bloom of Phaeocystis globosa (prymnesiophyceae). *J. Sea Res.*, **60** (3): 220-222, doi: 10.1016/j.seares.2008.06.001

Pépin J.F., Benabdelmouna A., Bierne N., Bouget J.F., Chabirand J.M., Costes L., Dégremont L., Garcia C., Génauzeau S., Geairon P., Grizon J., Lamy J.-B., Ledu C., Jolivet A.L., Moine O.L., Normand J., Palvadeau H., Polsenaere P., Robert S., Saunier A., Schmitt A., Seugnet J.L., Soletchnik P., Tourbiez D., Travers M.-A., 2018. *Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles : description et facteurs liés - MORBLEU*. Ifremer

Pépin J.F., Benabdelmouna A., Degremont L., Guesdon S., Le Moine O., Morga B., Bierne N., Travers M.-A., Robert S., Soletchnik P., 2017. *Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens: description et facteurs liés – MORBLEU*. Ifremer

Pépin J.F., Soletchnik P., Robert S., Moine O.L., Thomas G., Seugnet J.L., Geairon P., Guesdon S., Béchemin C., 2014. *Synthèse - Rapport final des études menées sur les mortalités de naissains d'huîtres creuses Crassostrea gigas sur le littoral charentais pour la période de 2007 à 2012*. Ifremer

Pérez-Cataluña A., Lucena T., Tarazona E., Arahal D.R., Macián M.C., Pujalte M.J., 2016. An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. *Syst. Appl. Microbiol.*, **39** (6): 361-369, doi: 10.1016/j.syapm.2016.03.010

Pfeffer C.S., Hite M.F., Oliver J.D., 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (6): 3526-3531, doi: 10.1128/AEM.69.6.3526-3531.2003

Philipp E.E.R., Kraemer L., Melzner F., Poustka A.J., Thieme S., Findeisen U., Schreiber S., Rosenstiel P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLOS ONE*, **7** (3): e33091, doi: 10.1371/journal.pone.0033091

Pila E.A., Sullivan J.T., Wu X.Z., Fang J., Rudko S.P., Gordy M.A., Hanington P.C., 2016. Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Dev. Comp. Immunol.*, **58** (0): 119-128, doi: 10.1016/j.dci.2015.11.010

Pipe R.K., 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, **261** (2): 261-268

Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M., Ramanathan K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, **46** (1): 43-54, doi: 10.1016/S0166-445X(98)00114-3

Poitras E., Houde A., 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev. Biol. Biotechnol.*, **2** (2): 2-11

Polsenaere P., Soletchnik P., Le Moine O., Gohin F., Robert S., Pépin J.-F., Stanisière J.-Y., Dumas F., Béchemin C., Goulletquer P., 2017. Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *J. Sea Res.*, **123** (0): 39-50, doi: 10.1016/j.seares.2017.03.005

Preheim S.P., Timberlake S., Polz M.F., 2011. Merging Taxonomy with Ecological Population Prediction in a Case Study of Vibrionaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77** (20): 7195-7206, doi: 10.1128/AEM.00665-11

Prou J.M., Goulletquer P., 2002. The French Mussel Industry: Present Status and Perspectives. *Bull. Aquac. Assoc. Can.*, **103** (3): 17-23
Ramón M., Cano J., Peña J.B., Campos M.J., 2005. Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletin Inst. Espanol Oceanogr.*, **21** (1-4): 361-373
Rasmussen L.P.D., 1986. Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. *J. Invertebr. Pathol.*, **48** (1): 117-123, doi: 10.1016/0022-2011(86)90150-3
Rasmussen L.P.D., Hage E., Karlog O., 1985a. An Electron Microscope Study of the Circulating Leucocytes of the Marine Mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **45** (0): 158-167
Rasmussen L.P.D., Hage E., Karlog O., 1985b. Light and electronmicroscopic studies of the acute and long-term toxic effects of N-nitrosodipropylamine and N-methylnitrosurea on the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **85** (1): 55-65
Renault T., 2006. Les virus infectant les bivalves marins. *Virologie*, **10** (0): 35-41
Reno P.W., House M., Illingworth A., 1994. Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.*, **64** (3): 163-172, doi: 10.1016/S0022-2011(94)90025-6
Renwrantz L., 1990. Internal defence system of *Mytilus edulis*. In: Studies in Neuroscience, Neurobiology of *Mytilus edulis*. Manchester, 256-275
Riquet F., Simon A., Bierne N., 2017. Weird genotypes? Don't discard them, transmissible cancer could be an explanation. *Evol. Appl.*, **10** (2): 140-145, doi: 10.1111/eva.12439
Robert S., Bouget J.-F., Gabellec R., Louis W., Normand J., Blin J.L., Dagault F., Gerla D., Jolivet A.L., Penot J., Chabirand J.-M., Geairon P., Grizon J., Guesdon S., Moine O.L., Pepin J.F., Seugnet J.L., Brunet A., Soletchnik P., 2016. *Réseau national d'observation de la moule bleue Mytilus edulis, Mytilobs, campagne 2015*. Ifremer
Robert S., Le Moine O., 2003. *Expertise des élevages de moules après la canicule estivale : rapport final*. Ifremer
Robledo J.A.F., Caceres-Martinez J., Figueras A., 1994. *Mytilicola intestinalis* and *Proctoeces maculatus* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds in Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14** (3): 89-91
Robledo J.A.F., Santarém M.M., González P., Figueras A., 1995. Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture*, **133** (0): 311-322
Romalde J.L., Dieguez A.L., Lasa A., Balboa S., 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front. Microbiol.*, **4**, doi: 10.3389/fmicb.2013.00413
Romero A., Costa M., Forn-Cuni G., Balseiro P., Chamorro R., Dios S., Figueras A., Novoa B., 2014. Occurrence, seasonality and infectivity of *Vibrio strains* in natural populations of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **108** (2): 149-163, doi: 10.3354/dao02701
Ropert M., Olivési R., 2002. *Etat de l'activité mytilicole sur le secteur de Quend-Plage (Picardie)*. Ifremer
Sagristá E., Durfort M., Azevedo C., 1995. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus* : ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*, **132** (1-2): 153-160, doi: 10.1016/0044-8486(94)00391-Z
Saraiva S., van der Meer J., Kooijman S.A.L.M., Witbaard R., Philippart C.J.M., Hippler D., Parker R., 2012. Validation of a Dynamic Energy Budget (DEB) model for the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **463**141-158, doi: 10.3354/meps09801
Saulnier D., Reynaud Y., Arzul I., Miossec L., Roux F.L., Goarant C., 2007. Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole : quelques scénarios illustrés d'exemples
Sawabe T., Ogura Y., Matsumura Y., Feng G., Amin A.R., Mino S., Nakagawa S., Sawabe T., Kumar R., Fukui Y., Satomi M., Matsushima R., Thompson F.L., Gomez-Gil B., Christen R., Maruyama F., Kurokawa K., Hayashi T., 2013. Updating the *Vibrio* clades

defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.*, **4**, doi: 10.3389/fmicb.2013.00414

Seed R., 1976. Ecology. In: Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge, 13-65

Seed R., Suchanek T.H., 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture,Developments in aquaculture and fisheries science. Amsterdam, (Coll. Developments in aquaculture and fisheries science), 87-169

Sheir S.K., Handy R.D., 2010. Tissue Injury and Cellular Immune Responses to Cadmium Chloride Exposure in the Common Mussel *Mytilus edulis*: Modulation by Lipopolysaccharide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **59** (4): 602-613, doi: 10.1007/s00244-010-9502-9

Shepardson S.P., Heard W.H., Breton S., Hoeh W.R., 2012. Light and Transmission Electron Microscopy of Two Spermatogenic Pathways and Unimorphic Spermatozoa in *Venustaconcha ellipsiformis* (Conrad, 1836) (Bivalvia: Unionoida). *Malacologia*, **55** (2): 263-284, doi: 10.4002/040.055.0207

Siebert C., 2017. Recherche d'un nouveau marqueur de résistance aux fluoroquinolones chez *Francisella tularensis*. Thèse de doctorat, Université de Grenoble Alpes - Faculté de Pharmacie

Snieszko S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *J. Fish Biol.*, **6** (2): 197-208, doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x

Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P., Goulletquer P., 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat. Living Resour.*, **12** (2): 131-143

Soletchnik P., Robert S., 2016. *Eléments de connaissance sur la mortalité et la reproduction de la moule bleue (*Mytilus edulis*) sur la façade atlantique*. Ifremer

Soto E., Griffin M.J., Morales J.A., Calvo E.B., de Alexandre Sebastião F., Porras A.L., Víquez-Rodríguez X., Reichley S.R., Rosser T.G., Ware C., Byrne B.A., García J.C., LaFrentz B.R., Camus A.C., 2018. *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84** (16): 1-16, doi: 10.1128/AEM.00144-18

Soto E., Hawke J.P., Fernandez D., A Morales J., 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J. Fish Dis.*, **32** (8): 713-722, doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x

Soudant P., Paillard C., Choquet G., Lambert C., Reid H.I., Marhic A., Donaghy L., Birkbeck T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (=*Tapes*, =*Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture*, **229** (1-4): 401-418, doi: 10.1016/S0044-8486(03)00352-1

Strasser M., Reinwald T., Reise K., 2001. Differential effects of the severe winter of 1995/96 on the intertidal bivalves *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Mya arenaria* in the Northern Wadden Sea. *Helgol. Mar. Res.*, **55** (3): 190-197, doi: 10.1007/s101520100079

Suchanek T.H., 1978. The ecology of *Mytilus edulis* L. in exposed rocky intertidal communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **31** (1): 105-120, doi: 10.1016/0022-0981(78)90139-9

Sunila I., Williams L., Russo S., Getchis T., 2004. Reproduction and pathology of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) in an experimental longline in Long Island sound, Connecticut. *J. Shellfish Res.*, **23** (3): 731-740

Szuroczki D., Richardson J.M.L., 2009. The role of trematode parasites in larval anuran communities: an aquatic ecologist's guide to the major players. *Oecologia*, **161** (2): 371-385, doi: 10.1007/s00442-009-1388-8

Takatsuki S., 1934. On the Nature and Functions of the Amoebocytes of *Ostrea edulis*. *J. Cell Sci.*, **76** (s2): 379-431

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30** (12): 2725-2729, doi: 10.1093/molbev/mst197

Tanguy M., McKenna P., Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Danger J.-M., Siah A., 2013. Functional and molecular responses in Mytilus edulis hemocytes exposed to bacteria, Vibrio splendidus. *Dev. Comp. Immunol.*, **39** (4): 419-429, doi: 10.1016/j.dci.2012.10.015

Theisen B.F., 1973. The growth of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Disko and Thule district, Greenland. *Ophelia*, **12** (1-2): 59-77, doi: 10.1080/00785326.1973.10430120

Thieltges D.W., Hussel B., Hermann J., Jensen K.T., Krakau M., Taraschewski H., Reise K., 2008. Parasites in the northern Wadden Sea: a conservative ecosystem component over 4 decades. *Helgol. Mar. Res.*, **62** (1): 37-47, doi: 10.1007/s10152-007-0091-6

Thompson F.L., 2003. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53** (3): 753-759, doi: 10.1099/ijs.0.02490-0

Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C.B., Swings J., 2005. Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (9): 5107-5115, doi: 10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005

Thompson J., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25** (24): 4876-4882, doi: 10.1093/nar/25.24.4876

Travers M.-A., Boettcher Miller K., Roque A., Friedman C.S., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.*, **131** (0): 11-31, doi: 10.1016/j.jip.2015.07.010

Travers M.A., Morga B., Godfrin Y., Garrigues M., Garcia C., Dubreuil C., Tourbiez D., Chollet B., Osta Amigo A., Lupo C., Renault T., 2016a. A bacterial suspect implicated in *M. edulis* mortalities in France ? 1st International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR). Vigo

Travers M.-A., Pepin J.-F., Soletchnik P., Guesdon S., Le Moine O., 2016b. *Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais – MORBLEU*. Ifremer

Travers M.-A., Tourbiez D., Parizadeh L., Haffner P., Kozic-Djellouli A., Aboubaker M., Koken M., Dégremont L., Lupo C., 2017. Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet. Res.*, **48** (32): 1-8, doi: 10.1186/s13567-017-0438-1

Tsuchiya M., 1983. Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis* L. caused by high temperature on rocky shores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **66** (2): 101-111, doi: 10.1016/0022-0981(83)90032-1

Vassilenko E., Baldwin S.A., 2014. Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific Coast of Southern British Columbia, Canada. *J. Invertebr. Pathol.*, **117** (0): 68-72, doi: 10.1016/j.jip.2014.02.002

Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante F., Lanfranchi G., Novoa B., Roch P., Figueras A., Pallavicini A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, **12** (1): 69, doi: 10.1186/1471-2164-12-69

Ventura A., Schulz S., Dupont S., 2016. Maintained larval growth in mussel larvae exposed to acidified under-saturated seawater. *Sci. Rep.*, **6** (1): 1-8, doi: 10.1038/srep23728

Vezzulli L., Stagnaro L., Grande C., Tassistro G., Canesi L., Pruzzo C., 2018. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microb. Ecol.*, **75** (2): 495-504, doi: 10.1007/s00248-017-1051-6

Villalba A., Carballal M., López C., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.*, **46** (0): 213-216, doi: 10.3354/dao046213

Villalba A., Mourelle S., Carballal M., López C., 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.*, **31** (0): 127-139, doi: 10.3354/dao031127

Villalba A., Mourelle S.G., Lopez M.C., Carballal M.J., Azevedo C., 1993. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Organ.*, **16** (0): 61-72, doi: 10.3354/dao016061

Ward G.M., Bennett M., Bateman K., Stentiford G.D., Kerr R., Feist S.W., Williams S.T., Berney C., Bass D., 2016. A new phylogeny and environmental DNA insight into paramyxids: an increasingly important but enigmatic clade of protistan parasites of marine invertebrates. *Int. J. Parasitol.*, **46** (10): 605-619, doi: 10.1016/j.ijpara.2016.04.010

WoRMS, 2019. *Marteilia maurini* Le Roux, Lorenzo, Peyret, Audemard, Figueras, Vivarès, Gouy & Berthe, 2001. World Regist. Mar. Species, http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=563864 (consulté le 19 juillet 2019)

Yonemitsu M., Giersch R., Polo-Prieto M., Hammel M., Simon A., Cremonte F., Avilés F., Merino-Véliz N., Burioli E.A.V., Muttray A.F., Sherry J., Reinisch C., Baldwin S.A., Goff S.P., Houssin M., Arriagada G., Vazquez N., Bierne N., Metzger M.J., 2019. A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *eLife*, doi: 10.7554/eLife.47788

Zaroogian G., Anderson S., 1995. Comparison of cadmium, nickel and benzo(a)pyrene uptake into cultured brown cells of the hard shell clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **111** (1): 109-116, doi: 10.1016/0742-8413(95)00014-X

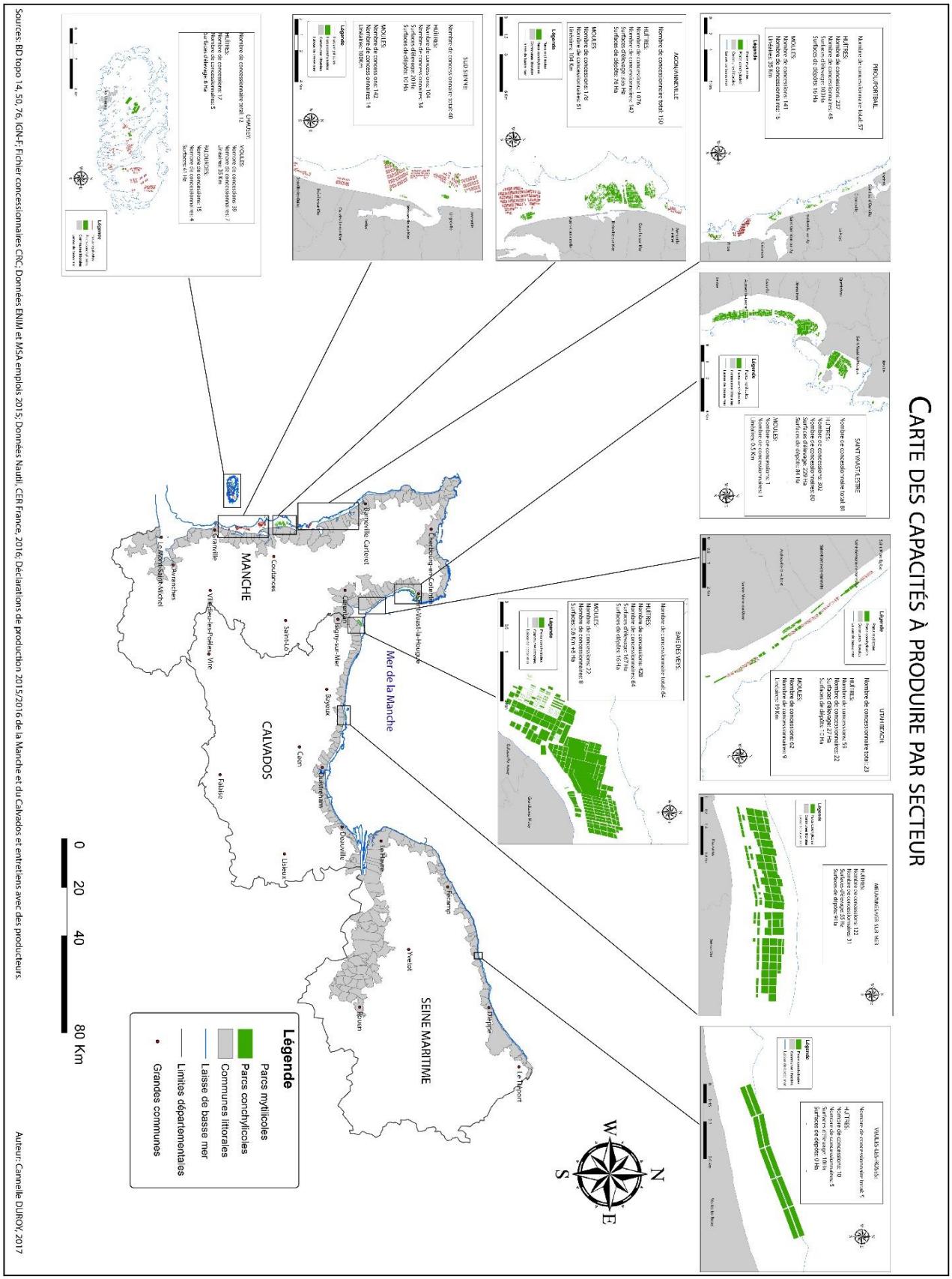
Zaroogian G., Voyer R.A., 1995. Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substances to brown cells of *Mercenaria mercenaria*. *Cell Biol. Toxicol.*, **11** (5): 263-271, doi: 10.1007/BF00757624

Zaroogian G., Yevich P., 1993. Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. *Environ. Pollut.*, **79** (2): 191-197, doi: 10.1016/0269-7491(93)90069-Z

Zupan, Saric, 2014. Growth and condition index - two important factors in mussel farming. *MESO*, **16**

ANNEXES

Annexe I


CARTE DES CAPACITÉS À PRODUIRE PAR SECTEUR
Légende
Parcs mytilicoles
Parcs conchylicoles
Communes littorales
Laisse de basse mer
Limites départementales
Grandes communes
MANCHE
CALVADOS
SEINE MARITIME
Mer de la Manche
0 20 40 80 Km
N
S
W
E
Sources: BD topo 14, 50, 76, IGN-F; Fichier concessionnaires CRC; Données ENIM et MSA emplois 2015; Données Nautil, CER France, 2016; Déclarations de production 2015/2016 de la Manche et du Calvados et entretiens avec des producteurs.
Auteur: Camelle DUROY, 2017

Annexe II

Second International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR)
Sète (France), 7-8 September 2017

INVESTIGATION ON BLUE MUSSEL HIGH MORTALITY IN FRANCE: A PHENOMENON WITH HIGH SPATIO-TEMPORAL VARIABILITY BUT NO CONCLUSIVE CAUSE.

Bernard I.[1], Charles M.[3], Allain G.[2], Villalba A.[4], Burioli E.A.V.[3], Houssin M.[3] and Deydier Y.[5]

[1]Eurêka Modélisation, 13 cité des gardiens de phare, 22740 Lézardrieux, France
[2]Armeria, 78 rue Foch, 56100 Lorient, France
[3]LABÉO Frank Duncombe – Pôle Recherche, UMR Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 1 route de Rosel, 14 280 Saint-Contest, France
[4]Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), Consellería do Mar, Xunta de Galicia, 36620 Vilanova de Arousa, Spain
[5]CRC Bretagne-Nord 2, rue du parc au duc - CS 17844 - 29678 Morlaix Cedex, France

ABSTRACT

In 2014, French mussel producers suffered high mortality rate in spring on their livestock, particularly in Charentais Sounds on the Atlantic coast. The phenomenon has repeated from year to year with varying mortality rate. This study aims to better describe the phenomenon, understand the factors behind the observed variability and identify a possible pathogen implied to provide diagnostic tools. For this purpose, a national survey of mortality rate has been conducted with mussel farmers and a monitoring program of mortality and disease detection in mussel farms from north Brittany has been started in 2016. The survey and the monitoring program both evidence that mortality started in spring or autumn and that mortality rates show high annual- and site- variability. The monitoring program put in light that mussels of the *Mytilus galloprovincialis* species are more resistant to the disease and that mortality peaks during maturation and spawning. No other factor has been identified to explain this variability, but several mechanisms are also suspected to be part of the phenomenon like dewatering or the age at commercialisation. Haemic neoplasia has been detected in one sample but repeated attempts to identified it again have failed until now, whereas lot of Vibrio species are able to kill mussels when injected, without any strain systematically associated with mortality events. Four years after the beginning of high mortality events of mussels, Vibrio splendidus and haemic neoplasia are still the principal suspects to explain the phenomena that seem heavily regulated by the environment.

Annexe III

Séquence partielle du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale (SSU rDNA) de l'apicomplexe retrouvé dans les moules *Mytilus edulis*

(Burioli *et al.*, in prep)

>MN148114.1 *Apicomplexa* sp. CAM71 ex *Mytilus edulis* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

TGACAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCAACTTCTTGAACAAGTATACTGCAGATAGCTCATTAAAACAGTTA
TAGTTCACTTGATGTTTAATTGCTATTCGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGCAAATGTTCTGC
TGCTTGCCAGTAGAACAGTGTTTATTAGATAAAGAACCAATCTGCTTTGCAGCTCCTGGTGATTCACAATAACTA
AACGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGCATCTTTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTCCGACGGTACGGTATT
TGCTTACCGTGGCGGTGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATTCTGACACAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACA
AATCACATACGTGTTTTGTAATTGGAATGAGTGGGAAGTAAAGCTTCACACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGA
ATTTCTGACGATCATTTCTGCGCTGCCTCAGGGTTGGTTGCGGTAAATGACGTCATCTATCTGACATGTGCAGTA
CTTTATTGTGCTGCATTTTGCCAGATCCTTTACTTTGAGAAAATTTGAGTGTTTCAAGCAGGTATTTGCCATGAA
AACTGCCGCATGGAATAATACGATAGGACTATGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGAACCAAAGTAATGATTAACA
GGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAAGAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTCTTAAAGACGAACTACTGCGAA
AGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
CCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAAGTCGTCACGATTTGACACTTTCAGCACCTTGTGAGAAATCA
AAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATTGACAGATTG
AGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTC
CGTTAACGAACGAGACCTTAGCCTGCTAAATAGGGGTGAGAACCATTCGTTCTTCGCCTCCTTCTTAGAGGGACT
TTGCGTGTCTAACGCAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGC
GCTACACTGATGTATTCAGCGAGTTAATCTTTGGCCGAGAGGTAATCAGAGTAATCTTGTGAAAATACATCGTGA
TGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCATGAGTCATCAGCTCGTGCTGAT
TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAGCGATCCGGTGAATTAGACGGACTGAGA
TTTCGTTAGTTCGCTAACGGAATCACGGAAAGTTTTGTGAACCTTATCGCTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA
GGTTTCCGTAG

Annexe IV

Third International Symposium on the Advances in Marine Mussel Research (AMMR)
Chioggia (Italy), 26-28 August 2019

EXPERIMENTAL INFECTION OF *MYTILUS EDULIS* BY TWO *VIBRIO SPLENDIDUS*-RELATED STRAINS: EVALUATION OF VIRULENCE, THE INFLUENCE OF THE ORIGIN OF THE MUSSELS AND SEASON ON THEIR SENSITIVITY

Charles M.[1, 2, §], Trancart S.[2], Oden E.[2], Houssin M.[1, 2]

[1] Normandy University, University of Caen Normandy, FRE BOREA, CNRS-7208, IRD-207, MNHN, UPMC, UCN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex 4, France

[2] LABÉO Frank Duncombe, 1 Route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

ABSTRACT

In 2014, France was affected by high and unusual mass mortality of mussels affecting several important production areas along the French coast of the Atlantic and English Channel, where production losses have reached 90 to 100 %. The phenomenon again affected farms on the west coast of France in the first quarter of 2016. The pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* has been considered as one of the causes of these events. Vibrios are among the major bacterial pathogens of marine organisms and have been identified as pathogens for several bivalve molluscs that may cause high economic losses. During mussel mortality events, different *Vibrio splendidus* strains were isolated from French moribund mussels and were linked to mortality. In this study, two strains from a *Vibrio* population assembly isolated during disease events in oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus edulis*) in 2014, and described as highly virulent for bivalvia, were used for infection assays. Pathogenicity in the mussel, *M. edulis,* of these two *Vibrio splendidus*-related strains –*Vibrio crassostreae* 7T4_12 and *V. splendidus* 3G1_6– were tested every month, respectively for a period of 13 and 9 months; in order to determine whether physiological and morphological conditions, impacted by the season, played a role in susceptibility to bacterial infections. Two concentrations were tested, one close to the natural concentration of *Vibrio* spp. in seawater (~10^5CFU/mL) and another much higher (~10^8CFU/mL). In addition, those experiments were conducted on mussels of the same age but from five different areas, in order to verify whether the origin of the mussels' capture could affect their sensitivity to Vibriosis. The observed mortalities are significantly different depending on the strain injected and the tested concentrations. *Vibrio*

splendidus is more virulent than *V. crassostreae* at the highest tested concentration and the tested environmental concentration has no pathogenic effect, whatever the used strain. Besides, mussels from one specific origin are significantly less sensitive to infection than others. However, the parameter that seems to be the most decisive in the sensitivity of animals to bacterial infection is the season; a criterion known to have a particular impact on the physiological and morphological conditions of the animals. The highest mortalities due to infection were observed in autumn and in spring. Reproductive status impacts host susceptibility toward infection; the highest concentration seems to cause a specific stress during the reproductive period leading to forced egg laying, promoting the fragility of mussels and their susceptibility to infections.

Étude des organismes pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (*Mytilus* sp.)

RESUME

Depuis 2014, les moules de certains bassins de production situés sur la façade atlantique et le long des côtes de la Manche subissent des épisodes de surmortalités. En conséquence, nombre de mytiliculteurs ont ainsi vu leur production se réduire drastiquement à la suite de ces mortalités singulières et inexpliquées. Ces événements ont perturbé tout un « socio-écosystème littoral » et ont généré des questionnements et des inquiétudes de la part des professionnels du secteur. En effet, avec plus de 50 000 tonnes de moules produites par an, la France se place au troisième rang européen en termes de volume (FAO, 2018) et occupe la première place au regard de la valeur du produit, avec un chiffre d'affaires annuel estimé à ~130 millions d'euros (Agreste, 2019) ; ainsi, la mytiliculture représente une part non négligeable de l'économie française. L'objectif de ce travail de thèse est de contribuer à la compréhension du phénomène de mortalité chez les moules en étudiant les organismes pathogènes, les états pathologiques et les conditions physiologiques des animaux qui peuvent plus ou moins être impliqués dans les mortalités. Ceci a été réalisé en vue d'apporter des éléments de connaissance supplémentaires au sujet de différentes hypothèses qui avaient été formulées lors des premiers épisodes de surmortalité. Pour ce faire, différentes approches ont été employées. Dans un premier temps, une démarche épidémiologique analytique a été utilisée ; d'abord dans le cadre d'une étude de suivi sur plusieurs mois des mortalités de moules de Bretagne Nord, puis de manière concomitante, dans les cas de déclarations de mortalités en Normandie/Hauts-de-France. De fait, les mortalités de moules ayant un caractère inédit, hétérogène et inexpliqué, sans agent étiologique spécifiquement identifié, il apparaissait important de considérer plusieurs paramètres biotiques, abiotiques, internes et externes à l'hôte. Ensuite, dans une stratégie différente, l'attention s'est portée sur l'étude de l'implication de différents critères, propres aux individus, sur leur sensibilité lors d'infections expérimentales bactériennes. Et pour finir, dans une démarche de suivi d'une maladie, des moules de Normandie ont été suivies pendant plusieurs mois afin d'évaluer la prévalence, l'évolution et l'incidence de la néoplasie hémocytaire sur les mortalités observées.

Mots-clés : *Mytilus* sp., surmortalités, organismes pathogènes, approche multiparamétrique

Study of pathogens, physiological and pathological conditions involved in abnormal mussel mortality (*Mytilus* sp.)

ABSTRACT

Since 2014, mussels from several production areas located on the Atlantic coast and along the English Channel have been affected by massive mortality events. As a result, many mussel farmers have experienced a drastic reduction in production following these unusual and unexplained mortalities. These events have disrupted a whole "coastal socio-ecosystem" and have generated questions and concerns from professionals in the mussel farming sector. Indeed, with more than 50,000 tons of mussels produced per year, France ranks third in Europe in terms of volume (FAO, 2018) and occupies the first place in terms of product value with an estimated annual turnover of ~130 million euros (Agreste, 2019); thus, mussel farming represents a significant part of the French economy. The objective of this PhD thesis is to contribute to the understanding of the phenomenon of mussel mortality by studying the pathogens, pathological conditions and physiological conditions of animals that may be more or less involved in mortality. This was done to provide additional knowle dge about different hypotheses that had been formulated during the first episodes of high mortality. Therefore, different approaches were used. First, an analytical epidemiological approach was used; initially as part of a follow-up study over several months of mussel mortalities in North Brittany, then concomitantly, in the case of mortality declarations in Normandy/Hauts-de-France. In fact, since mussel mortalities are unusual, heterogeneous and unexplained, without a specifically identified etiological agent, it seemed important to consider several biotic, abiotic, internal and external parameters of the host. Then, in a different strategy, attention was focused on studying the implication of different criteria, specific to individuals, on their sensitivity during experimental bacterial infections. And finally, in a process of monitoring a disease, mussels cultivated in Normandy had been followed for several months to assess the prevalence, evolution and incidence of hemocytic neoplasia on observed mortality.

Keywords: *Mytilus* sp., massive mortalities, pathogens, multiparametric approach