

RAPPORT SUR LA SITUATION ZOOSANITAIRE

DU CHEPTEL *Crassostrea gigas*

CAS DU BASSIN DE MARENNES-OLERON

préparé par

H. GRIZEL

avec le concours de :

- l'Unité de Pathologie et d'Immunologie Générales de La Tremblade,
- cellules de contrôle zoosanitaire de Palavas, La Tremblade et La Trinité/Mer,
- des laboratoires RA de Port-en-Bessin, La Trinité/Mer,
- du laboratoire DEL d'Arcachon
- de l'Unité de Recherche Ecosystème Aquacole de La Tremblade.



RAPPORT SUR LA SITUATION ZOOSANITAIRE

DU CHEPTEL *Crassostrea gigas*

CAS DU BASSIN DE MARENNES-OLÉRON.

1 - HISTORIQUE

Le cheptel d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, du Bassin de Marennes-Oléron a subi ces dernières années des mortalités (mai 88, mai 91, été 1992 et hiver 92-93). Les examens histopathologiques pratiqués durant celles-ci n'ont pas permis de déceler d'agents pathogènes. Les causes avaient été attribuées essentiellement, pour les premiers cas, à un manque de nourriture corrélé avec des conditions de sécheresse (donc un manque d'apport d'eau douce pour le bassin) et à des surcharges trop importantes des biomasses de filtreurs, huîtres y compris. L'explication du dernier cas de mortalité survenue au cours de l'hiver serait d'un autre ordre : l'abaissement brutal des salinités, notamment dans les claires où étaient épurées soit des huîtres natives fragilisées, pour les raisons mentionnées précédemment, soit des huîtres transférées d'autres bassins et subissant des variations brutales de salinité, pourrait en être la cause.

Face à cette fragilisation quasi générale du cheptel Marenais et, craignant des mortalités importantes au cours du printemps et de l'été 1993, nous avons entrepris une campagne de contrôle zoosanitaire qui devait servir de point de référence. Cette campagne était également justifiée par l'observation, chez certains lots d'huîtres, notamment dans le nord du bassin (secteur de Fourras), mais aussi dans le bassin d'Arcachon, de lésions branchiales rappelant celles qui avaient été décrites lors de la maladie des branchies de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*.

La mise en évidence de lésions tissulaires associées à la présence de corpuscules et d'inclusions Feulgen positif (indique la présence d'ADN) nous a conduit à tenter de répondre aux questions suivantes :

1 - Qu'elle est l'étiologie de ces lésions, autrement dit, qu'elle est la nature de ces corpuscules et de ces inclusions ?

2 - Qu'elle est l'épimémiologie ou encore : qu'elle est l'importance des lésions ? Y a-t-il une association lésions amaigrissement des huîtres ? Retrouve-t-on des huîtres à branchies lésées dans d'autres bassins que les deux précités ? Beaucoup d'huîtres étant transférées depuis les bassins de Marennes et d'Arcachon vers les autres centres, retrouve-t-on ces corpuscules associés ou non à des lésions ?

En conséquence, la première étude suivante a été effectuée.

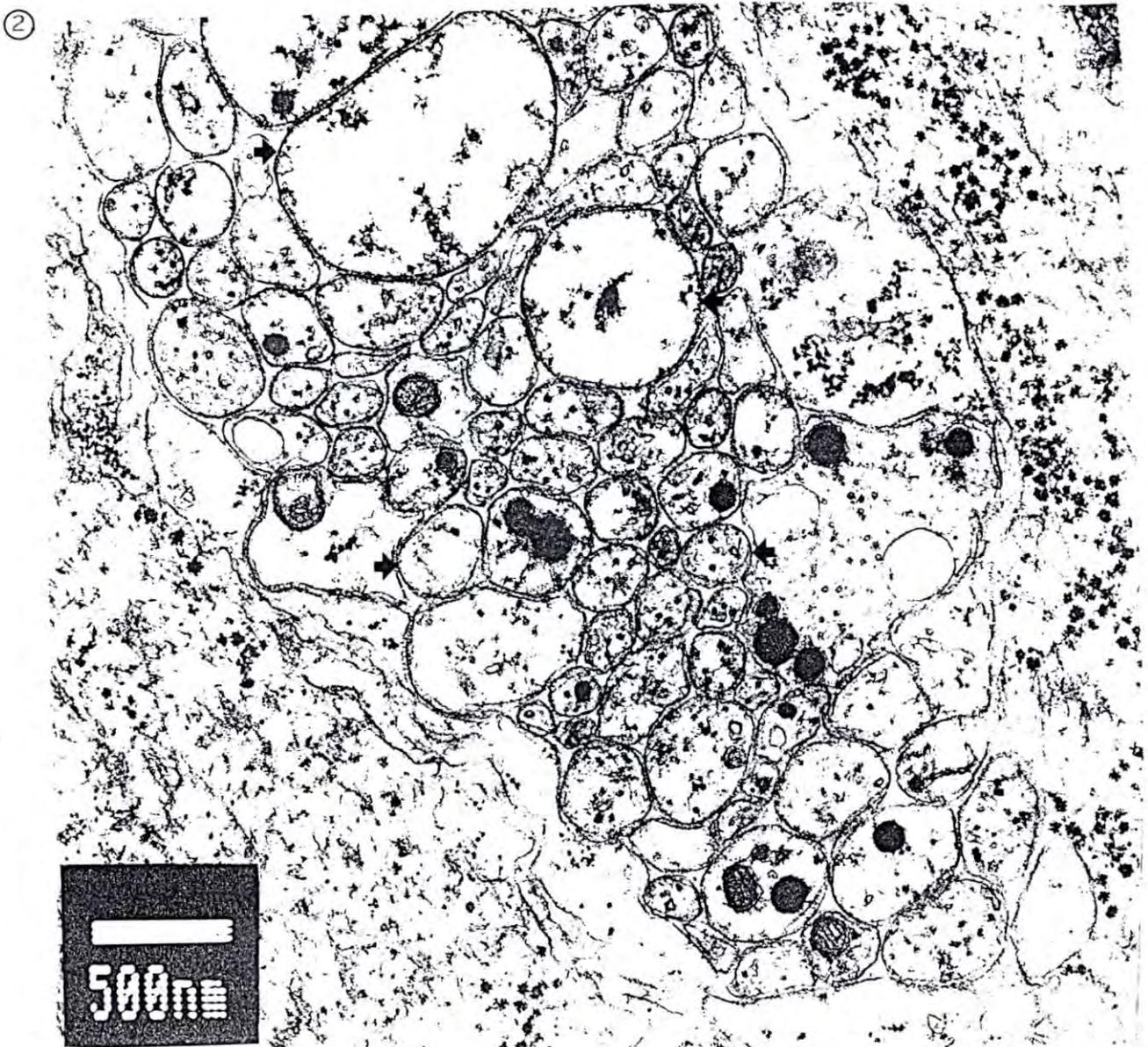
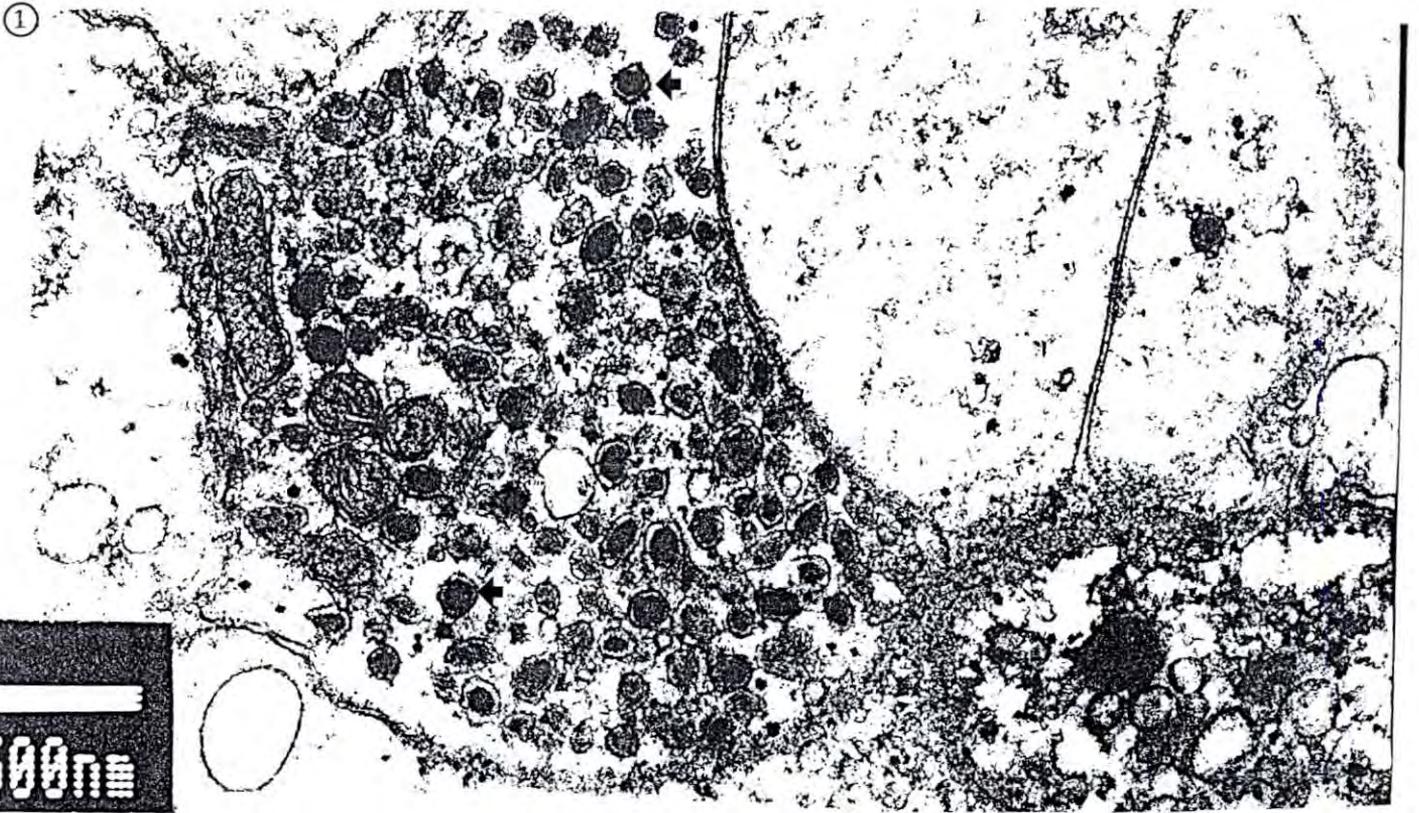
2 - IDENTIFICATION DES CORPUSCULES ET DES INCLUSIONS FEULGEN POSITIF.

Les examens de lésions en microscopie photonique sur coupes histologiques classiques et semi-fines et en microscopie électronique à transmission ont permis de confirmer la présence d'un procaryote présentant un cycle de type Chlamydien avec des corps denses aux électrons (corps initiaux) de 100 à 200 nm, et des corps reticulés de taille très variable, limités par deux unités membranaires.

Planche I

Figure 1. Vue en microscopie électronique d'une cellule renfermant des corps initiaux (Grossissement x 15.000).

Figure 2. Vue en microscopie électronique d'une cellule géante remplie de corps élémentaire. A noter la variabilité de la taille (Grossissement x 12.000).



Le diagnostic d'un procaryote de type Chlamydie-like a été étayé par celui de spécialistes en chlamydies de vertébrés (INRA, Tours) auxquels ont été soumis des clichés en ME. Une double confirmation a été faite par l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales par le test d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Chlamydia psitaci*, fournis par le laboratoire INRA. En effet, deux de ces anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte ou couplée à la peroxydase ont donné des marquages sélectifs correspondant effectivement aux corps de type *chlamydiens*. Leur emploi a également permis de vérifier la présence de ces chlamydies-like pratiquement uniquement au niveau des lésions branchiales du manteau. Enfin, les inclusions feulgen positif observées en microscopie photonique seraient très certainement de la chromatine condensée résultant de noyaux picnotiques qui auraient été phagocytés par des hyalinocytes. Des figures observées en ME confirment ces observations.

3 - EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE.

Les résultats indiqués ci-après sont encore partiels, malgré ce ils sont déjà intéressants en soi. Pour tenter de répondre aux questions précédentes, l'étude épidémiologique a été effectuée dans plusieurs centres ostréicoles du littoral français. Elle est basée soit sur des observations macroscopiques portant sur le dénombrement de lésions branchiales et sur l'état des coquillages, soit sur des observations macro et microscopiques.

3.1 - Normandie

Examens macroscopiques

Quatre vingt cinq huîtres provenant de quatre secteurs ont été examinées.

Lieu d'élevage	Taille	Engraissement	Branchies
Meuvaines Asnelles	naissain Commerciale	G	Néant
Baie des Veys	Commerciale	TG	Néant
St Vaast La Hougue	18 mois	G	Néant
Blainville	18 mois	MG	2/20 avec faible indentations

Des examens effectués sur le cheptel élevé en Normandie, il peut être retenu que :

1. Les huîtres étaient toutes dans un bon état physiologique,
2. les chlamydies sont présentes chez des huîtres d'origine différente,
3. elles ne sont pas forcément associées à des lésions mineures (tâche, légère indentation, branchie dentelée),
4. elles ne semblent pas affecter la qualité des huîtres.

Examens macroscopiques et microscopiques

Ils ont concerné 200 huîtres supplémentaires.

Nombre	Lieu d'élevage	Origine	Observations macroscopiques	Histologie
50	Grandcamp	Marennes	6 tâches branchies 3 indentations	5 cas Chlamydie
50	St Vaast La Hougue	Ecloserie	5 tâches	3 cas Chlamydie
50	Grandcamp	Ecloserie	3 tâches manteau 1 branchie dentelée	Absence Chlamydie
50	Gouville	Fouras	Pas d'anomalie	Absence Chlamydie

3.2 - Bretagne

Trois cents huîtres d'origine différente ont été examinées.

Nombre	Lieu d'élevage	Origine	Observations microscopiques	Histologie
50	Cancalle	Charon	2 tâches branchies 2 tâches manteau	1 cas Chlamydie
50	Aber Wrach	Ecloserie	1 tâche branchie	1 cas Chlamydie
50	Quiberon	Arcachon	6 tâches branchies	2 cas Chlamydie
50	Quiberon	Marennes	Pas d'anomalie	1 cas Chlamydie
50	Larmor Baden	Arcachon	Pas d'anomalie	Absence de Chlamydie
50	Etel		Pas d'anomalie	Absence de Chlamydie

L'analyse des résultats des huîtres de Bretagne confirme les faits précédents évoqués pour la Normandie.

3.3. Marennes-Oléron.

Vingt cinq lots de trente huîtres ont été observés macroscopiquement. Les analyses microscopiques des huîtres présentant des anomalies sont en cours.

Les résultats des analyses sont regroupés dans les tableaux ci-joints.

Concernant Marennes-Oléron, plusieurs remarques peuvent être faites après ces observations :

1. L'état général des huîtres au moment des examens (début avril) n'est pas satisfaisant. La majorité des huîtres sont peu grasses, maigres selon les lots.

2. Sur le même site, des lots élevés dans des conditions zootechniques satisfaisantes présentent comparativement un bon état physiologique par rapport aux lots élevés dans des conditions mal définies.

3. Ce constat est accentué pour les huîtres longues, dites "oreille de lièvre" et les huîtres naturelles reparquées.

4. Ces dernières sont généralement en mauvaises conditions, et présentent de nombreuses anomalies, particulièrement d'importantes accumulations hémocytaires verdâtres.

5. La prévalence de lésions branchiales (indentation, érosion, invagination) est nettement supérieure à celles des autres bassins.

6. Il ne paraît pas y avoir de relation entre la présence des lésions et l'état général des huîtres.

3.4. Arcachon.

Un contrôle général des huîtres du bassin d'Arcachon est en cours.

3.5. Méditerranée.

Trois lots, soit 150 huîtres ont été examinés macroscopiquement et en microscopie.

Nombre	Lieu d'élevage	Origine	Engraissement	Lésions et Histologie
50	Thau zone A	Marennes	G	Néant
50	Thau zone A	Marennes	G	Néant
50	Thau	Marennes	37 G-MG 13 M	Néant

Toutes ces huîtres originaires du bassin de Marennes-Oléron ne présentent pas de lésions et ne recèlent apparemment pas de Chlamydie-like. En outre, elles étaient dans l'ensemble, de très bonne qualité.

Origine	Age	Nombre	Engraissement	Lésions branchiales	Anomalies	Histologie
Charret bas	2-3 ans	29	18 MG 11 M	1 Erosion 1 Indentation		
La Blanche	2-3 ans	27	14 MG 8 M 5 TM	1 Indentation 1 Erosion		
Charret haut	2-3 ans	29	14 MG 9 M 6 TM	3 indentations 4 Erosions 1 Erosion	1 Tâche verte	
Craze		31	21 MG 10 M	4 Crénelures indentations 2 Crénelures	1 Tâche verte	
Ronce Plage	2 ans	28	13 MG 13 M 2 TM	2 Invaginations 1 Erosion		
Ronce Galon d'Or	2 ans	34	2 G 10 MG 15 M 6 TM	1 Invagination	1 Lésion manteau	
Bourgeois	30 mois		26 MG 3 M 1 TM	1 Invagination		
Ile de Ré	30 mois		1 MG 25 M 4 TM	4 Indentations	1 Tâche jaunâtre	

Tableau récapitulatif des observations faites sur les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. G = grasse ; MG = moyennement grasse ; M = maigre ; TM = très maigre.

Origine	Age	Nombre	Engraissement	Lésions branchiales	Anomalies	Histologie
Galon d'Or	42 mois	30	15 G 15 MG			
La Casse	30 mois	28	5 G 14 MG 7 M 2 TM	2 Invaginations 1 Invagination	Mytilicola	
Bourgeois	18 mois	30	1 G 19 MG 6 M 4 TM	1 Invagination 1 Perforation		
Banc Martin	30 mois	20	2 G 10 MG 5 M 3 TM		Infiltration hémocytaire	
Balise nord naturelle sol	5 ans	30	5 MG 14 M 11 TM		10 larges tâches vertes	
Ile de Ré		28	4 G 16 MG 4 M 4 TM	1 Erosion 3 Erosions	1 tâche verte	
Charret sol	30 mois	29	1 G 25 MG 2 M 1 TM	1 Erosion	3 Tâches vertes 1 Tâche verte	

Tableau récapitulatif des observations faites sur les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. G = grasse ; MG = moyennement grasse ; M = maigre ; TM = très maigre.

Origine	Age	Nombre	Engraissement	Lésions branchiales	Anomalies	Histologie
Seudre Naturelles	2-3 ans	30	23 MG 6 MG 1 TM	0 Indentations Erosions	0 Tâches vertes	
St Trojean	2 ans	28	17 MG 6 MG 5 TM	Indentations	Tâches vertes	
Ronce les Bains	3 ans	27	10 MG 6 M 10 TM	2 Invaginations 3 Indentations	1 Tâche verte	
Mus du Loup Naturelles		22	14 MG 8 M	2 Indentations 2 Invaginations	1 Tâche verte	
La casse naturelle		30	18 MG 9 M 3 TM	3 Indentations réduction feuillet 4 Nécroses-Erosions 3 Erosions	Tâches vertes Tâches vertes	
Brouage Naturelles	3 ans	30	10 MG 9 M 11 TM	2 Erosions	4 Tâches verdâtres manteau et palpe	
Mortagne Naturelles	4 ans	30	30 MT	3 Indentations	8 Tâches verdâtres	
L'Humet	2-3 ans	25	11MG 8 M 6 TM	1 dentelée 2 Indentation 1 Nécrose	1 Tâche verte	

Tableau récapitulatif des observations faites sur les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. G = grasse ; MG = moyennement grasse ; M = maigre ; TM = Très maigre.

Origine	Age	Nombre	Engraissement	Lésions branchiales	Anomalies	Histologie
Danias		31	3 G 13 MG 11 M 4 TM	7 Crênelures 2 Érosions	1 Tâche verte	
Charret sol	30 mois		1 G 25 MG 2 M 1 TM	1 Érosion	3 Tâches vertes 1 Tâche verte	
Ronce		34	12 G 17 MG 5 M	1 Indentation	1 Tâche jaune	

Tableau récapitulatif des observations faites sur les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. G = grasse ; MG = moyennement grasse ; M = maigre ; TM = très maigre.

3.6. Première analyse de la situation épidémiologique.

Les contrôles sur le cheptel français d'huîtres creuses révèlent :

1. La présence d'une Chlamydie-like dans les tissus de ces huîtres, en particulier au niveau des branchies et du manteau.
2. Cette Chlamydie est généralement associée à des micro ou macrolésions caractérisées par une dégénérescence cellulaire locale des tissus, et un flux d'hémocytes.
3. Cette Chlamydie n'est pas associée, à ce jour, à d'importantes mortalités.
4. Elle est présente dans la plupart des centres ostréicoles français.
5. Il ne semblerait pas que sa propagation se soit effectuée à partir d'un foyer infectieux initial.
6. Le bassin de Marennes-Oléron est le centre où les prévalences sont les plus élevées.
7. C'est également dans ce bassin où les conditions physiologiques des huîtres étaient les plus faibles.
8. Il n'y a pas de relation claire entre le transfert de lots depuis le bassin de Marennes-Oléron et la situation des autres centres.

4 - ETUDE DE PHYSIO-PATHOLOGIE.

Afin d'essayer de comprendre et d'apprécier le rôle de ces Chlamydies-like, autrement dit de vérifier leur pathogénicité, des expériences rapportées dans l'annexe 1 ont été réalisées.

La conclusion de celles-ci est qu'il n'apparaît pas de corrélation entre le degré d'infection (dans le cas de ces conditions expérimentales et avec les huîtres utilisées) et la physiologie de l'animal. Les facteurs essentiels sont la nourriture et le niveau physiologique initial..

5. TRAVAUX FUTURS.

Pour l'avenir, outre une surveillance de base qui sera maintenue sur le cheptel, IFREMER s'attachera à :

- essayer de purifier ces chlamydies afin de tenter de reproduire la maladie,
- affiner les connaissances sur son cycle,
- approfondir les relations présence de chlamydies ↔ état physiologique ↔ lésions tissulaires.

6 - CONCLUSIONS - RECOMMANDATIONS.

Compte tenu des connaissances acquises sur les Rickettsies et les Chlamydies, soit chez les Vertébrés, soit chez les Invertébrés, en particulier chez les bivalves marins, il est recommandé :

1. Dans les centres où les prévalences sont les plus élevées, de maintenir un haut niveau de zootechnie en prenant garde à la biomasse, aux densités, à la répartition des flux, aux conditions techniques, à la période de détroquage, au niveau d'élevage (coefficient marée).

2. Observer régulièrement le cheptel, en accordant une attention particulière aux branchies et au manteau (présence de lésions, indentations, perforations, tâches verdâtres ou jaunâtres) et de signaler celles-ci auprès des cellules de contrôle zoosanitaire d'IFREMER (Contact Y. Pichot, Palavas les Flots - G. Tigé, La Trinité/Mer - momentanément H. Grizel ou T. Renault, La Tremblade).

3. De signaler toutes les mortalités anormales de cheptel auprès des équipes IFREMER de votre région.

Car, il faut retenir que les Rickettsies ou les Chlamydies sont des organismes intracellulaires, souvent endémiques et jugés opportunistes, c'est-à-dire qu'ils se multiplient lorsque les conditions chez l'hôte deviennent favorables. Chez les bivalves en particulier, ces organismes ne semblent pas être la cause directe de mortalité mais ils peuvent s'installer lorsqu'ils trouvent un terrain favorable. Ils contribuent alors à l'affaiblissement de l'hôte.

La Tremblade le 10 juin 1993.



Ce rapport de synthèse effectué par H. Grizel a pu être réalisé grâce à l'ensemble des résultats obtenus par :

- l'Unité de Pathologie et Immunologie Générales (T. Renault et N. Cochenec),
- les cellules de contrôle zoosanitaires de La Trinité/Mer (G. Tigé et G. Audic), de Palavas (Y. Pichot), La Tremblade (B. Chollet),
- les laboratoires côtiers RA de Port en Bessin (P. Gouletquer), de la Trinité /Mer et de DEL Arcachon,
- l'Unité de Recherche en Ecosystème Aquacole (P. Soletchnik, Ph. Geairon et J. Prou).

ANNEXE 1

COMPTE RENDU EXPERIENCE ECOPHYSIO-PATHOLOGIE
mai 1993

Contribution equipe UREA

PROBLEMATIQUE: Infestation bacterienne (*Chlamydie sp...*) de l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron.

OBJECTIFS: Tester l'effet de l'alimentation sur l'évolution de la bacteriose.

PROTOCOLE: - création à partir d'un lot d'huîtres infesté à plus de 30%, de trois conditions alimentaires différentes.
- mise en élevage pendant un mois
- bilan physiologique et niveau d'infestation au terme du traitement.

Les trois conditions alimentaires sont:

- une situation de jeûne complet (lot 1).
- une condition d'alimentation naturelle renouvelée 4 fois, à raison d'une 1/2 heure par 24h (lot 2).
- une condition alimentaire naturelle enrichie 24h/24h par un mélange d'algues de culture: *T.Isochrysis*, *Tetraselmis sp.*, *Chaetoceros calcitrans* et *Pavlova lutherii* (lot 3).

Les mesures sont effectuées après un mois d' alimentation:

- fonction de respiration
- fonction de consommation
- production de biodépôts
- poids sec, et poids de coquille
- niveau macroscopique d'infestation (équipe patho du LABEIM)

- L'étude physiologique est réalisée en 5 cycles de mesures pour traiter un total de 22 à 24 huîtres par condition. Un bilan énergétique est établi sur la base de la matière organique. Ce bilan est effectué à partir d'une eau filtrée enrichie en *Tetraselmis sp*, regime standard expérimental. Ces mesures permettent de déterminer le potentiel de croissance des différentes populations soumises à ce régime particulier.

PRINCIPAUX RESULTATS:

Réponses physiologiques

Sur le plan croissance, la condition 3, enrichie en algues, se caractérise par plus de 90% d'animaux avec des croissances importantes de coquilles et un état de maturité sexuelle avancé. L'indice de condition (poids sec/poids de coquille * 100) est près de trois fois supérieur pour le lot 3 par rapport au lot 1 (figure 1). Cette situation particulière de maturation avancée pour le lot 3, accentuée par une forte montée de température, induit un ralentissement de la consommation pour ce lot (figure 2). En terme d'énergie, le potentiel de croissance ponctuel mesuré à partir d'une eau standard est faible pour cette condition (figure 3). Ce potentiel est bien évidemment nettement inférieur à celui développé par ce lot au cours du mois de traitement alimentaire enrichi en algues.

C'est pour la condition 2, que la consommation et le potentiel de croissance sont les meilleurs dans le cadre de cette expérience (figures 2 et 3). Pour la condition 1, l'intervalle de confiance associé à ces 2 fonctions est important, et traduit une hétérogénéité pour les individus de la condition de jeûne.

Une partie de ces résultats apparaît également sur l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée à partir de cette étude (figure 4); L'axe 1, horizontal, explique 47% de la variance, et l'axe 2, vertical, 33%. L'axe 1 tire vers la gauche poids sec et respiration, et l'axe 2 oriente vers le bas la consommation et la production de fécès.

Sur la figure 4, apparaissent:

- Un gradient pondéral négatif de la condition 1 à la condition 3
- Le recouvrement partiel des populations 1-2 et 2-3, en terme de réponse physiologique.
- L' inflexion vers le bas, vers une forte consommation, de la condition 2, et dans une moindre mesure, d'une partie de la population 1.
- La dispersion importante du lot 1 (condition de jeûne), avec l'identification d'une fraction de population, de petite taille, et dont la consommation est faible ou nulle.

Niveau d'infestation par la Chlamydie (Equipe Patho)

Dans le cadre de cette étude, le niveau d'infestation branchiale de la Chlamydie est évalué sur une échelle relative à 4 niveaux .

Au terme de l'étude, aucune différence significative d'infestation n'apparaît entre les conditions alimentaires, et le niveau d'infestation considéré. Par ailleurs, le nombre d'animaux infesté ou présentant des traces d'infestation passée serait important (environ 60%), mais le pourcentage d'huîtres fortement infesté est faible (4%).

De plus, les résultats de l'ACP (figure 4), où les niveaux d'infestation apparaissent, permettent de vérifier, qu'au sein d'une même condition, le niveau d'infestation n'est corrélée à aucune fonction physiologique mesurée.

CONCLUSION

Dans le cadre de cette étude, dans la limite des fonctions physiologiques mesurées, mais avec des niveaux d'infestation probablement faibles, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les valeurs des fonctions physiologiques et l'infestation par la Chlamydie.

Si le traitement alimentaire mis en oeuvre dans la condition 3 a permis une reprise de croissance importante et provoqué la maturation de cette population, il n'aurait pas modifié le degré d'infestation de cette population, comparé au contrôle de population à jeun...

Aucune mortalité n'est à signaler pendant le mois d'expérimentation pour les animaux soumis à un apport quotidien de nourriture.

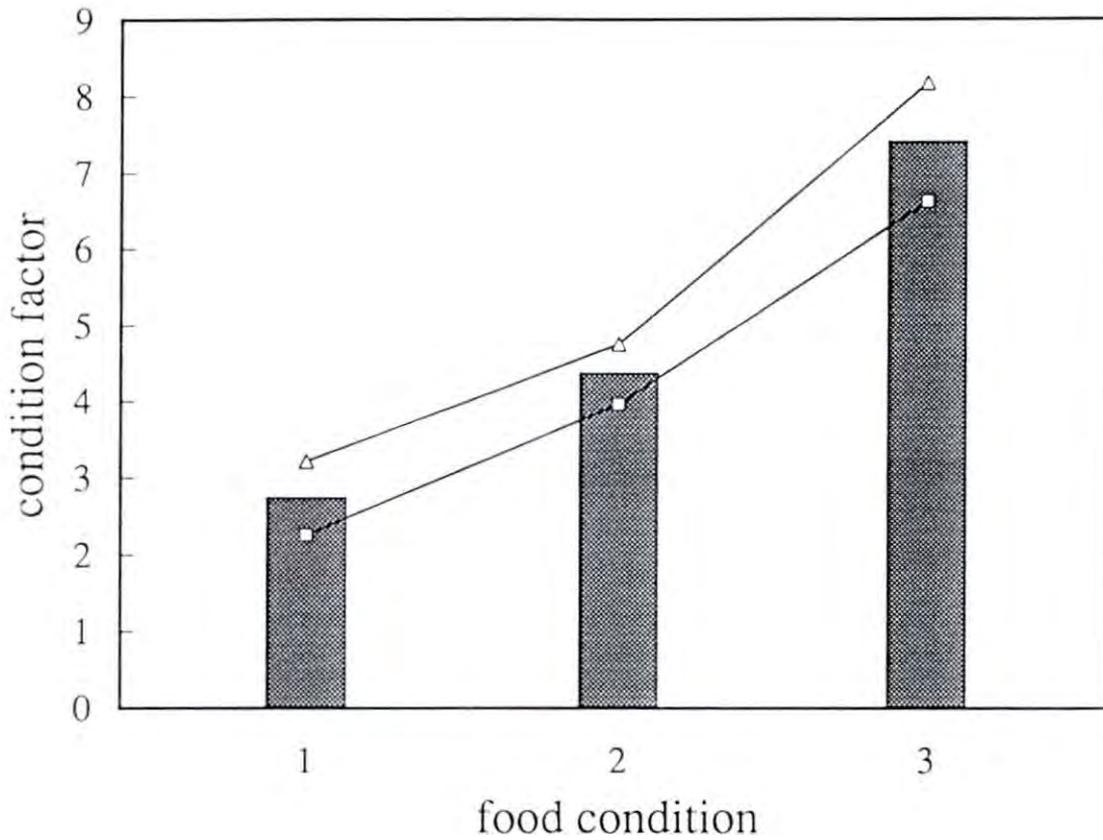


FIGURE 1. Indice de condition moyen pour les trois conditions alimentaires:

1: Jeûne:

2: Renouvellement et apport eau naturelle, 4*1/2 heure/24h.

3: Identique 2 + algues de culture 24h/24h.

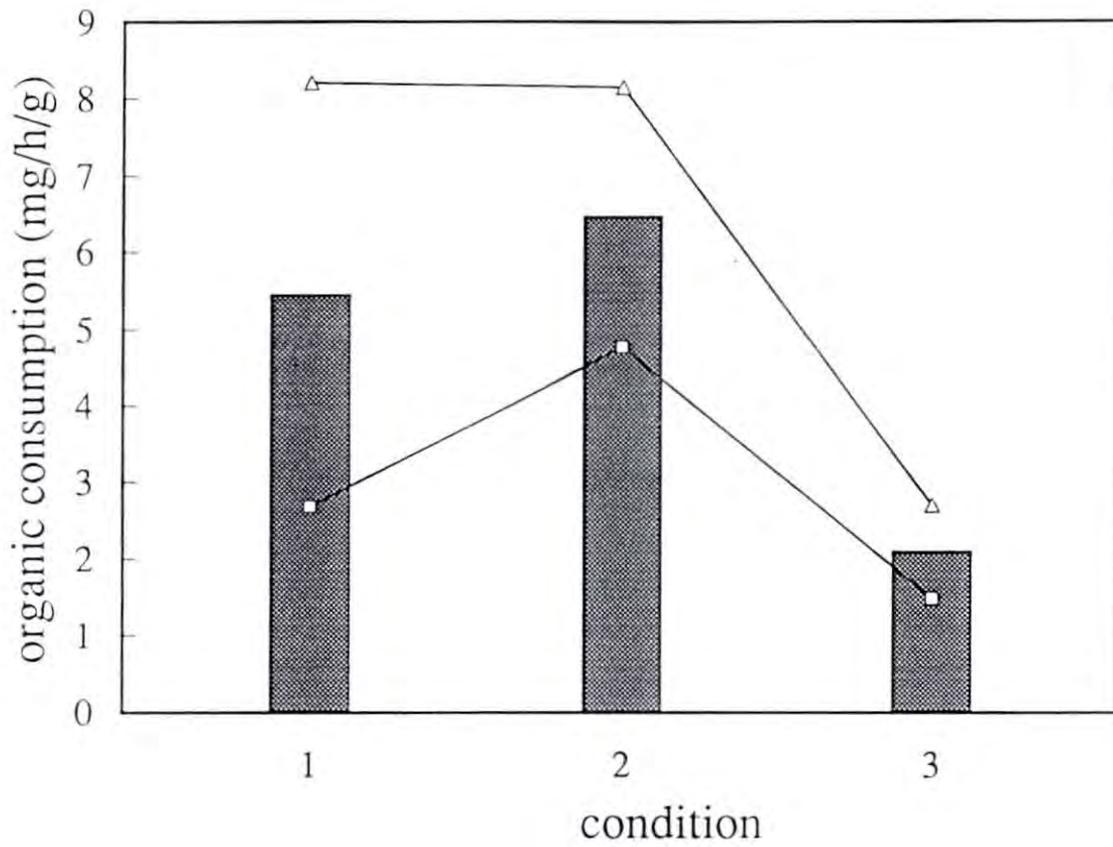


FIGURE 2. Consommation organique moyenne pour les trois conditions alimentaires (mg/h/g) testées avec l'eau standard.

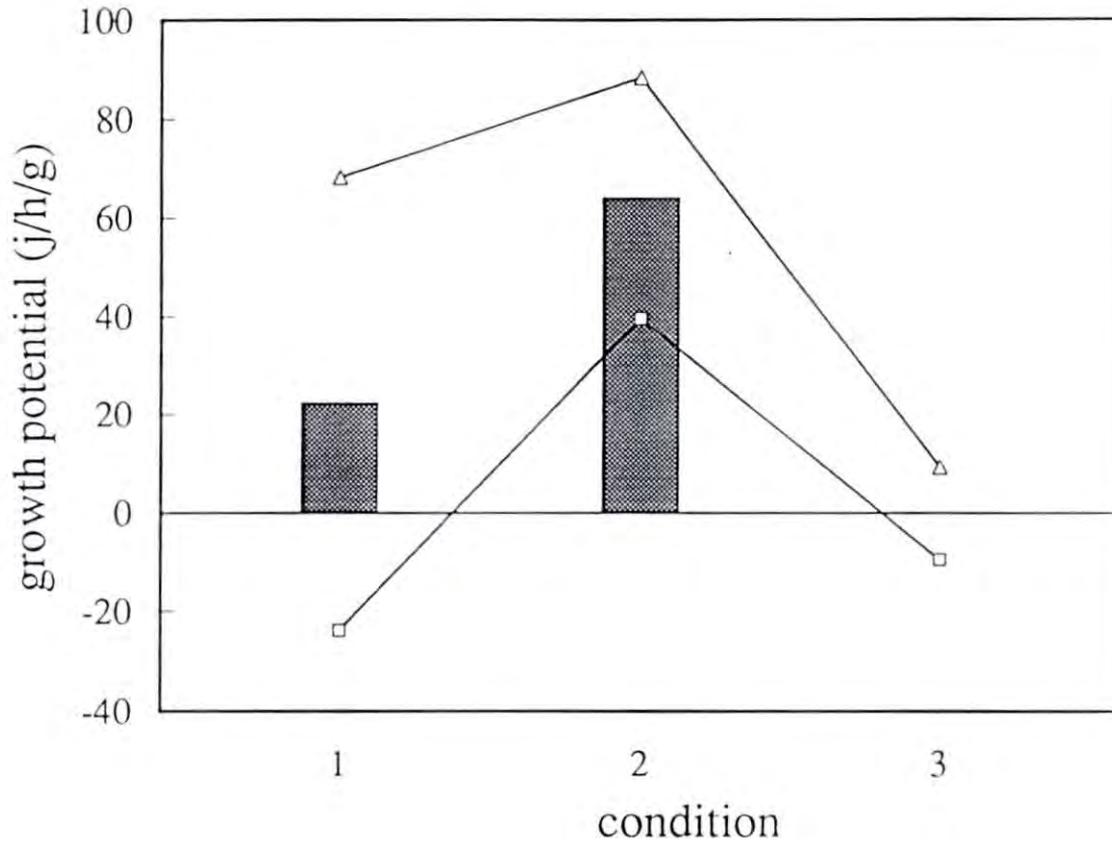


FIGURE 3. Potentiel de croissance des 3 lots d'huîtres (joules/heure/gramme) testés avec l'eau standard.

FIGURE 4. Analyse en composantes principales;

Axe horizontale: poids sec et respiration (46,8 % de la variance)

Axe verticale: consommation et production de fécès (33,3 % de la variance).

Nombres à 2 chiffres: Le premier indique la condition alimentaire, de 1 à 3, et le deuxième, le niveau d'infestation de la bacterie (0 à 3).

