

Direction DRV-RA  
Laboratoire de Génétique et Pathologie

**MEYRAND Mickaël**

Juillet-Août 2001  
Rapport de stage de BTS ANABIOTEC

**ifremer**

## **Etude des mortalités estivales de naissain de *Crassostrea gigas* à Fouras**



## REMERCIEMENTS

Je remercie André Gérard, directeur du laboratoire, pour mon accueil au sein de l'IFREMER.

Je remercie également mon maître de stage, Anne Thébault, de m'avoir accueilli au sein de la cellule veille. « Le grand Programme Morest »... je m'en souviendrai ...

Merci aux professionnels de Fouras.

Un grand Merci à Maëva, pour m'avoir aidé à brasser les poches d'huîtres, de m'avoir formé en Bio.Mol et de m'avoir soutenu quand je désespérais que la PCR daigne bien marcher ! Je n'oublie pas non plus Monique et Julien qui m'ont bien aidé pour les manip.

Enfin, je tiens à remercier Stéphane Robert et Daniel Razet pour les données de température, ainsi que tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, dans mon étude et dans la rédaction de ce rapport.



## Présentation de LA STATION IFREMER de La Tremblade

### Historique

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) est un établissement public à caractère industriel et commercial créé par le décret du 5 juin 1984. Il résulte de la fusion du CNEXO (Centre National d'Exploitation pour les Océans) et de l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes). Il est placé sous la tutelle de ministères chargés de la recherche, des pêches et cultures marines, de l'équipement, du logement, des transports. L'IFREMER est présent dans 78 laboratoires ou services de recherche répartis dans 24 stations ou centres sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

L'ISTPM a été pendant 69 ans à La Tremblade au service du bassin de Marennes-Oléron :

- ✓ 1913 : création de l'AEIO (Association d'Encouragement des Industries Ostréicoles et conchylicoles française) à La Tremblade,
- ✓ 1918 : création de l'OSTPM (Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes),
- ✓ 1928 : le laboratoire de l'AEIO devient à La Tremblade l'OSTPM,
- ✓ 1953 : transformation de l'OSTPM en ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes),
- ✓ 1954 : l'inspection sanitaire et le laboratoire de biologie sont individualisés à La Tremblade,
- ✓ 1984 : création de l'IFREMER.

### Présentation de l'institut

La station IFREMER de La Tremblade est chargée de la surveillance de l'environnement littoral et de l'étude des cheptels conchylicoles. Elle emploie une trentaine de personnes dont les cadres, les techniciens, les doctorants, les post-doctorants et le personnel administratif et logistique.

Outre le fait d'être laboratoire de référence communautaire pour l'Union Européenne en matière de suivi zoosanitaire, ses investigations en termes de recherche concernent spécifiquement la génétique et la pathologie des mollusques bivalves marins.

Elle regroupe 3 laboratoires :

- ✓ la **DEL** (Direction Environnement et aménagement du Littoral) dont les missions principales consistent à mettre en œuvre des réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs une qualité des eaux et des coquillages,
- ✓ la **DRV/LCPC** (Direction des Ressources Vivantes / Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes) qui étudie entre autres la croissance des coquillages, afin d'améliorer les productions du bassin,
- ✓ la **DRV/LGP** (Direction des Ressources Vivantes / Laboratoire de Génétique et Pathologie) qui travaille notamment sur les caractères génétiques dans le but d'améliorer les populations présentes dans le bassin, et contrôle les agents pathogènes.

## Présentation du laboratoire LGP

Le laboratoire de Génétique et de Pathologie de Ronce-les-Bains a été créé fin 1994, suite à une réorganisation de l'ancien laboratoire des Ressources Aquacoles de La Tremblade, puis remanié en 1996.

Les principaux objectifs du LGP visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de :

-La Pathologie : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, étude de l'impact de ces maladies, reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils de diagnostic, étude des mécanismes cellulaires de défense.

-La Génétique : obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies afin d'apporter des réponses aux épizooties, création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité et d'adaptation aux conditions du milieu d'élevage.

Le laboratoire LGP se répartit sur deux bâtiments. Le premier est principalement constitué de :

-6 salles de laboratoire (salle des centrifugeuses, salle d'histologie, salle de préparation des échantillons, salle de cultures cellulaires, salle de bactériologie/électrophorèse, 2 salles réservées à la Biologie moléculaire).

-1 salle de manipulation de radioéléments.

-1 salle climatisée pour la microscopie électronique à transmission.

-1 laboratoire photo, 1 salle de rangement des produits, 1 laverie.

-8 bureaux, 1 salle de réunion, 1 bibliothèque.

Le deuxième bâtiment de 1200m<sup>2</sup> est principalement constitué de :

-7 salles humides.

-2 salles de production du phytoplancton.

-1 laverie.

-1 laboratoire de biométrie.

-1 salle informatique.

-1 laboratoire de physiologie.

-8 annexes techniques.

Le laboratoire a également en charge la gestion de l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

-4 bassins de 300m<sup>3</sup> de réserves d'eau de mer.

-23 pompes de 10 à 300m<sup>3</sup>/h

-1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet.

-4 bassins de 20m<sup>3</sup> pour la production en masse de phytoplancton.

# SOMMAIRE

## REMERCIEMENTS

## PRESENTATION DU LABORATOIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	3
<b>1. CONTEXTE DE L'ETUDE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	5
<b>1.1. Mortalités estivales chez <i>Crassostrea.gigas</i></b> .....	5
Description des mortalités .....	5
Origine des mortalités .....	5
<b>1.2. L'Hôte : <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	6
<b>1.3. Le milieu : la presqu'île de Fouras</b> .....	7
Choix et description du site.....	7
Facteurs du milieu impliqués dans les mortalités .....	8
<b>1.4. Les agents pathogènes</b> .....	9
Données pathologiques.....	9
Description de la famille <i>Herpesviridae</i> .....	11
Virus type herpès chez <i>C. gigas</i> .....	13
<b>1.5. Diagnostic du virus Herpès chez <i>C. gigas</i></b> .....	13
<b>1.6. démarche épidémiologique d'étude des mortalités</b> .....	15
Généralités sur l'épidémiologie .....	15
Objectifs de l'étude sur Fouras .....	16
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b> .....	16
<b>2.1. Population statistique</b> .....	16
<b>2.2. Plan d'échantillonnage</b> .....	17
<b>2.3. Pesée et Biométrie</b> .....	17
<b>2.4. Suivi de la mortalité</b> .....	18
<b>2.5. Diagnostic du virus type herpès par PCR et HIS</b> .....	19
Caractéristiques de détection du virus type herpès .....	19
Technique de PCR appliquée à la détection de virus type herpès.....	20
Technique de l'Hybridation In Situ appliquée à la détection du virus type herpès.....	21
<b>2.6. Mesures des paramètres</b> .....	22
Les paramètres environnementaux sur le site de Fouras.....	22
Les paramètres biologiques .....	22
<b>2.7. Analyse des données</b> .....	23

<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>23</b>
3.1. L'évolution de la taille moyenne des naissains au cours de la période estivale 2001 .....	23
3.2. L'évolution de la mortalité du naissain au cours de la période estivale 2001 <sup>24</sup>	
Mortalités enregistrées de 1998 à 2001 .....	24
Mortalité sur les poches 1, 2 et 3 (concession A) .....	24
Mortalité 2001 sur les 12 poches .....	25
Moyenne des mortalités sur les concessions A, B, C et D .....	25
Mortalité sur les concession hautes et basses .....	25
3.3. Résultats des détections du virus type herpès au cours de la période estivale .....	26
Résultats PCR sur les huîtres non baillantes .....	26
Comparaison des résultats de PCR obtenus sur des animaux baillants et non baillants .....	26
Effet du site et de la poche sur la détection par PCR .....	26
Comparaison des résultats de PCR et d'HIS .....	27
3.4. Résultats des facteurs environnementaux .....	27
Effet de la salinité et de l'oxygène .....	27
Effet de la température .....	28
<b>4. DISCUSSION</b> .....	<b>28</b>
4.1. Les biais de l'échantillonnage .....	28
4.2. La mortalité sur le site de Fouras .....	28
L'évolution de la mortalité .....	28
Les fluctuations significatives de la mortalité .....	29
4.3. Explication de la mortalité sur Fouras .....	29
Lien entre mortalité et présence du virus type herpès .....	29
Lien entre les paramètres physiques du milieu et la mortalité .....	30
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>32</b>

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **ANNEXES**

## INTRODUCTION

L'**ostréiculture** en France se concentre sur le littoral Ouest Atlantique. En effet, le Bassin d'Arcachon et de Marennes d'Oléron représentent la majorité de la production nationale en huîtres. Cependant, cette activité est fragile et subit régulièrement des épizooties difficiles à combattre et pouvant entraîner d'importantes mortalités. En effet, la succession de maladies d'origines diverses a déjà causé d'importants dégâts.

Dans les années 1970, l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, fût atteinte d'une infection virale (Iridovirus) qui décima tous les cheptels, tandis que l'ensemble de la production d'huîtres plates était successivement parasitée par deux protozoaires, *Marteilia refringens* (Bonami et Grizel, 1971) et *Bonamia ostreae* (Comps *et al.*, 1980).

C'est pourquoi, vers la fin des années 70, l'ensemble du bassin ostréicole fut réensemencé à partir d'une autre espèce importée massivement, la Japonaise *Crassostrea gigas*, en provenance du Canada et du Japon. Celle-ci semble s'être bien adaptée aux conditions du milieu offert par l'environnement local et est aujourd'hui la plus élevée dans le milieu ostréicole français, d'où son importance économique.

Cependant, en 1986 des **mortalités estivales** ont été décrites localement (Bodoy *et al.*, 1988). Depuis 1991, des épisodes de mortalités ont été observés sur l'ensemble du littoral français (Renault *et al.*, 1994b). Se présentant sous forme sporadique surtout en période estivale, ces mortalités touchent le naissain produit en éclosérie ou provenant du captage naturel. Des études effectuées sur des populations d'adultes montrent que la mortalité varie avec la saison, qu'elle s'intensifie avec la température, en période de pré-ponte et avec le catabolisme du glycogène (P. Soletchnik *et al.*, 1999). Cependant, les causes réelles des mortalités anormales décrites chez le **naissain** de *C. gigas*, n'ont pas encore été complètement élucidées, en effet d'une année sur l'autre et d'un site à l'autre les mortalités sont différentes, ce qui ne favorise pas l'étude de ce phénomène.

Une étude portant sur des larves et du naissain (agé de sept à huit mois) issus d'épisodes de mortalité de 1991, par examen histologique suivis de recherche en microscopie électronique, ont mis en évidence la présence de particules virales (Renault *et al.*, 1994). Ces particules présentaient toutes les caractéristiques des *Herpesviridae*. En 1994 et 1995 cette infection a également été détectée sur des lots de naissain issus de forts épisodes de mortalités de toutes les côtes françaises. Afin de valider l'hypothèse d'une infection virale lors des



mortalités estivales, il a donc fallu travailler sur un nombre d'échantillons plus grand et optimiser la technique de détection. Un protocole de détection du virus type herpès par la méthode de la "Polymerase Chain réaction" (PCR) a été mis au point (Renault *et al.*, 1996).

Depuis 1997, un suivi régulier des mortalités estivales des naissains de *C. gigas* est établi sur le site de Fouras. Le protocole d'échantillonnage permettant d'estimer la mortalité a été étudié en 1997, et dès 1998 le suivi a été complété par l'étude d'autres facteurs : évolution de la prévalence du virus de type Herpès et de la maturation sexuelle (G. Allard, 1998), évaluation du taux de glycogène (M. Raude, 1999) au cours de la période estivale. Ces années là, les mortalités constatées sur le naissain d'huître creuse étaient relativement faibles.

La période de détection du virus correspondait au démarrage des mortalités mais le nombre d'individus infectés par PCR était relativement faible. Des différences de mortalités avaient été constatées entre des concessions distantes de 50 m, et des poches d'une même concession.

Afin de vérifier si la détection du virus n'est pas sous estimée, le pas de temps d'échantillonnage est restreint à une semaine et le diagnostic de la présence du virus effectué par PCR est confirmé par une seconde technique reposant sur une technique d'Hybridation In Situ (HIS). D'autre part, afin d'expliquer les différences de mortalité observées précédemment, on partira d'une origine commune de naissain qui subira exactement la même zootechnie quelque soit la poche et la concession étudiée. On n'étudiera donc pas la zootechnie.

L'objet ce stage visera donc à **estimer les mortalités estivales** de naissain, à les corrélérer éventuellement avec **différents paramètres environnementaux** (température, oxygène dissout, salinité) et la présence de virus Herpès.

Cette année, d'autres facteurs seront étudiés dans d'autres laboratoires sur d'autres facteurs, sur le même matériel biologique, recherchant par exemple l'impact de facteurs physiologiques, dans le cadre d'un programme MOREST.

Enfin, une base de données de pathologie, intégrée au sein d'un logiciel d'information géographique (ARCVIEW), sera complétée afin d'apporter des données historiques, sur le site de Fouras.

Le critère légal (Décret 98-391, de mai 1998) pour définir les mortalités anormales est une mortalité supérieure à 15 % en 15 jours pour du naissain ou des adultes. L'étude des mortalités est une obligation de l'IFREMER dès que ce seuil est atteint, et l'objet du réseau de pathologie des mollusques (REPAMO) est d'en exclure l'origine infectieuse (Thébault, 1999). Fouras est un site sentinelle pour l'étude des mortalités du naissain pour le REPAMO.

# **1. CONTEXTE DE L'ETUDE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **1.1. Mortalités estivales chez *Crassostrea.gigas***

### **Description des mortalités**

Sur le plan international, le Japon et la côte ouest des Etats Unis ont connu, dans les années 1960 et 1970, des mortalités estivales d'ampleur importante sur les élevages de *C. gigas* (Glude, 1975).

En France, depuis l'introduction massive de *Crassostrea gigas* en 1971-1972, des mortalités estivales de naissain d'huîtres ont été observées (Maurer *et al.*, 1986). Depuis 1991, des épisodes de mortalités ont été décrits sur l'ensemble du littoral français (Renault *et al.*, 1994b), sur des larves d'écloseries (Comps *et al.*, 1992), sur le naissain issu d'écloserie (Renault *et al.*, 1994a) et issu du captage naturel.

Au cours de 1994 et 1995, des mortalités plus fortes ont été constatées dans des zones non traditionnellement concernées (Thébault, 1998). Depuis 1996, les déclarations de la mortalité de naissain ont beaucoup diminué (Thébault, 1999). Ce phénomène de mortalité est localisé à des secteurs précis, à différentes échelles : un collecteur d'une même concession peut être concerné ou non et c'est la même chose à l'échelle des poches d'une même concession, entre concessions ou entre des bassins de production. Le phénomène semble être limité dans le temps au cours de la période estivale.

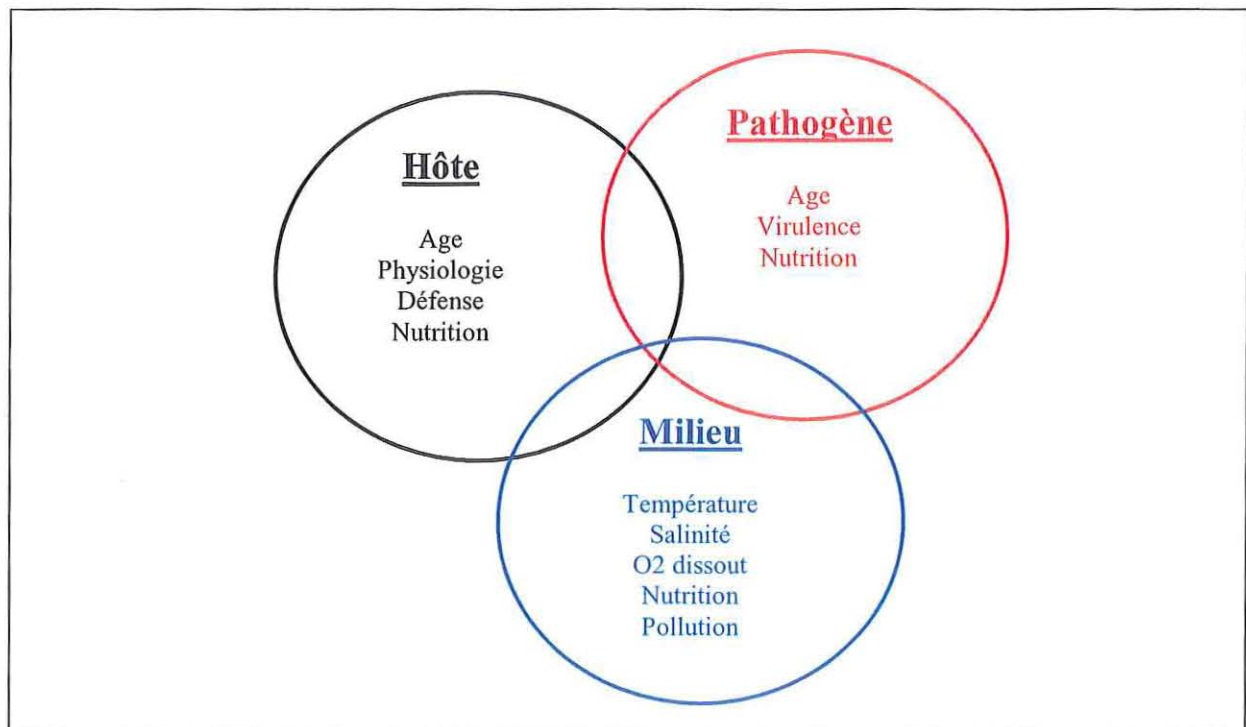
### **Origine des mortalités**

Le phénomène de mortalité estivale anormale est suivi depuis l'été 1981 (Maurer *et al.*, 1986). L'ensemble des hypothèses relatives au problème a surtout été déterminé à partir d'études réalisées sur des huîtres d'un âge supérieur à 18 mois. Les facteurs retenus sur ces classes d'âge sont les suivants :

- un niveau trophique insuffisant (Bodoy *et al.*, 1988),
- un déséquilibre physiologique (Soletchnik, 1999)
- des variations des conditions du milieu (Gouilletquer *et al.*, 1998).

Dés 1991, des observations en microscopie électronique à transmission révèlent la présence de particules virales de type herpès (Nicolas *et al.*, 1992, Renault *et al.*, 1994), sur des tissus présentant des lésions de nécrose, en absence d'autre agent infectieux, sur du naissain ayant présenté des mortalités estivales anormales. L'hypothèse d'une infection virale (agent pathogène) est alors émise chez le naissain de l'huître creuse (âgée de trois à sept mois).

Afin d'étudier les mortalités estivales il semble utile de rappeler les caractéristiques des trois compartiments suivants : l'hôte, le milieu et le pathogène (Toma *et al.*, 1991), (cf. fig. n°1).



**Figure n°1** : Mortalité résultant des interactions entre trois compartiments : milieu, hôte et pathogènes. (d'après Toma *et al.*, 2001)

## 1.2. L'Hôte : Crassostrea gigas

Parmi les différents facteurs susceptibles d'expliquer les mortalités estivales, on distingue ceux liés à l'hôte. Ainsi, l'effort de reproduction en période estivale pourrait être lié à une partie de ces mortalités.

Comme toutes les huîtres, l'huître creuse peut être hermaphrodite et peut changer de sexe au cours de sa vie. Certains facteurs (température, nutrition) sont susceptibles d'influer le changement de sexe (Gérard *et al.*, 1995).

La gamétogenèse est un phénomène rythmique, qui comprend différentes phases. Au repos hivernal, succède une phase de production, et de maturation des gamètes au printemps. En effet, dès la fin de l'hiver, les réserves disparaissent au profit de la glande génitale jusqu'à l'émission des gamètes au cours de l'été (Gouletquer, 1989). La ponte est sous la dépendance de la température de l'eau qui doit atteindre 18°C (Mann, 1979). Quinze jours à trois semaines après la fécondation en pleine eau la larve se fixe pour devenir **le naissain**.

De récentes études ont permis de montrer un lien entre la maturation gamétique et les mortalités d'huîtres âgées de 2 ans (Soletchnik *et al.*, 1997).

Du point de vue physiologique, les **réserves énergétiques** de l'huître de 2 ans sous forme de glycogène baissent au profit des lipides contenus dans les gamètes (Gabbot, 1976). Il a également été démontré une relation entre les constituants énergétiques et la gamétogenèse (Perdue *et al.*, 1981). Dans le cadre des mortalités estivales sur les adultes de Perquis et Ronce les travaux de *Gouletquer et al.*, 1998 montrent une relation entre une chute en glycogène et l'effort de reproduction maximal au moment des mortalités.

Au cours de la période estivale, le naissain (âgés de moins d'un an) présente une plus forte mortalité que les huîtres adultes. Or les études précédentes n'ont pas été menées sur cette classe d'âge et ne sont pas forcément extrapolables. Le naissain est plus difficile à étudier à cause de sa petite taille (en période estivale de 10 mm environ au démarrage de l'étude en Charente) : l'examen macroscopique ne suffit pas pour connaître l'état de maturation sexuelle, il faut alors effectuer une étude par histologie ce qui est beaucoup plus lourd, et qui n'est pas à ce jour, une technique standardisée, d'autre part l'étude des réserves énergétiques pose des problèmes analytiques.

D'autres facteurs internes, peu ou pas encore étudiés, notamment les caractéristiques du système immunitaire, et les marqueurs de stress physiologiques, en relation avec des facteurs environnementaux, pourraient également expliquer une partie des mortalités.

### 1.3. Le milieu : la presqu'île de Fouras

#### **Choix et description du site**

Située en plein cœur de la zone littorale Ré-centre-ouest, la presqu'île de Fouras est un site ostréicole de captage de l'huître creuse traditionnel. Ce site effectue des ventes sur tout le littoral français.

Le site de la Pointe de la Fumée est accessible à pied, et les concessions accessibles à des coefficients d'exondation compris entre 40 et 120. Ce site est partagé en 156 concessions. Ces concessions appartiennent à 117 concessionnaires (source info DDAM de la Rochelle). Le nombre de poches de naissain s'échelonnent de 6 à 1000 pour une concession.

Les concessions de la pointe de la fumée sont le plus souvent accessibles à pied, en fonction des coefficients de marée. Le captage du naissain se fait sur des collecteurs adaptés (coupelles, tubes ou cadres pléneaux). Ce naissain est détroqué en général au printemps suivant et mis en poches sur des tables (élevages en surélevé).

De plus, ce site a connu, en 1994 et 1995, des **mortalités estivales** importantes chez le naissain de *C. gigas*. Depuis, ce phénomène se reproduit, avec des taux de mortalités variant

chaque année. Enfin, en 1995, un virus de type herpès a été détecté par histologie sur du naissain moribond.

Par l'importance de ces critères, présence de naissain, accessibilité, mortalité, présence du virus herpès, la presqu'île de Fouras sera choisie comme site d'étude.

### **Facteurs du milieu impliqués dans les mortalités**

Sur l'estran, l'huître est soumise à diverses agressions. Les **facteurs liés au milieu**, susceptibles d'entraîner une mortalité significative en période estivale, sont d'origine diverses (cf : tableau n°1), et sont de différents ordres: biotique, abiotique ou d'origine anthropique.

Ces facteurs environnementaux sont à analyser à **différentes échelles spatiales** (le bassin, la concession, la poche) et **temporelles** (l'année, la saison, le cycle de marée) notamment dans des zones estuariennes et d'estran.

Parmi les paramètres importants et mesurables, on retiendra la température et la salinité qui caractérisent la masse d'eau, l'oxygène dissout, la turbidité (pouvant affecter la filtration), la quantité de phytoplancton présent.

A l'échelle de Perquis et de Ronce il n'a pas été trouvé de lien évident entre ces paramètres et la mortalité estivale des adultes (Gouletquer, 1998). Cependant, ces paramètres permettent de décrire les conditions d'apparition de ces mortalités.

En outre, le temps d'exondation, par son influence sur l'apport trophique, et la température de l'air, semblent être des paramètres environnementaux non négligeables.

La prédation (bigorneau perceur), la compétition (crépidules, balanes, bancs naturels...), ainsi que la gêne occasionnée par la prolifération des algues ou le surcaptage représentent des **facteurs biologiques** impliqués dans les mortalités chez l'huître, mais qui ont une importance relative selon les sites et les années.

D'autres facteurs peuvent intervenir sur la mortalité du naissain. En effet, certains polluants (urbains, industriels ou agricoles) issus des **activités humaines** peuvent y contribuer.

S'ajoutent également les **pratiques professionnelles** (zootechnie, transfert, stress provoqué lors de dragage...). Les pratiques zootechniques à risque sont notamment le transfert du naissain en période estivale, le détroquage, le criblage, et les manipulations sur les poches (dédoublage, changement de maille, retournement des poches, densité des poches etc...).

Ceci peut expliquer une partie des différences de mortalité entre concessions et concessionnaires (Allard, 1998, Raude, 1999), mais d'autres différences, notamment environnementales pouvaient aussi intervenir. Chez les adultes, il a été trouvé une différence

significative de mortalités entre l'élevage sur le sol et en surélevé (Gouletquer, 1998). Mais le naissain de moins d'un an n'est habituellement pas élevé au sol.

Facteurs d'origine non infectieuse	Exemples
Facteurs environnementaux	Manque de nourriture (mort phytoplanctonique en été) Bloom de plancton toxique (dinoflagellés) : <i>exemple en baie de Bourgneuff en 1995</i> Déficit en oxygène (malaïgue) : <i>exemple de l'étang de Thau en 1997</i> Dessalure, hausse de température
Facteurs biologiques	Prédation Compétition
Activités humaines	Pollutions
Activités professionnelles	Procédures zootechniques (transport des stocks...) Modification du milieu (dragage, surdensité...)

**Tableau n° 1** : Les facteurs d'origine non infectieuse susceptibles d'entraîner des mortalités chez l'huître.

#### 1.4. Les agents pathogènes

##### Données pathologiques

De nombreuses études ont été menées en Asie, aux Etats-Unis et en Europe sur la pathologie des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, *angulata* et *virginica* (Sindermann 1990, Elston, 1993, Nicolas *et al.*, 1992, Renault *et al.*, 1994). D'après la liste des maladies reconnues graves, à déclaration obligatoire, (Office International des Epizooties, 1997), les pathologies affectant les productions de coquillages sont parasitaires et virales. Un certain nombre d'agents parasitaires ou non ont cependant été décrits dans la littérature comme étant responsables de mortalités anormales (cf. : tableau n°2).

Facteurs d'origine pathologique	Agent infectieux	Sources
Parasites	<i>Haplosporidium</i> (déclaration OIE) <i>Mikrocytos</i> (déclaration OIE) <i>Perkinsus</i> (déclaration OIE) <i>Mytilicola</i> Ciliés ( <i>Hexamita</i> ) <i>Polydora</i> <i>Ostracoclabe implexa</i> <i>Trichoderma</i>	Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Bower et al., 1994 Sallenave, 1999
Bactériennes	Rickettsies Nocardia <i>Vibrio splendidus</i>	Comps, 1980 Bower et al., 1994 Waechter, 2001 et Lacoste in press
Virales	Iridoviridae (déclaration OIE) Herpesviridae	Bower et al., 1994 Nicolas et al., 1992

**Tableau n°2** : Agents pathogènes impliqués dans la mortalité des huîtres creuses.

Chez l'huître creuse *C. gigas*, les parasites potentiellement agents de maladies graves et susceptibles d'induire des mortalités comme *Mikrocytos mackini* (Bower et al., 1994) ne sont pas présents en France. Pour d'autres parasites, l'espèce *C. gigas* semble moins sensible que *C. virginica*; c'est le cas vis à vis d'*Haplosporidium nelsoni* (Bower et al., 1994). Les autres agents parasitaires ont certainement un rôle affaiblissant lorsque l'atteinte devient trop sévère sur des organismes fragilisés (Bower et al., 1994).

Du point de vue bactérien, de nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves au stade larvaire dont l'huître creuse (Friedman et al., 1991). Des mortalités de *C. gigas* de 2 ans et plus ont pu être attribuées à une bactérie gram positif *Nocardia*. En France, un *Vibrio splendidus* (retrouvé sur parc chez des juvéniles moribonds), a été récemment associé à certaines mortalités de naissain en écloserie. La reproduction expérimentale de la maladie, par baignade à forte dose ou inoculation a confirmé sa virulence sur des larves comme sur du naissain de *C. gigas* (Waechter, 2001). De

la même façon un *Vibrio splendidus* a été isolé à partir d'un cas de mortalité de naissain en baie de Morlaix, avec une reproduction expérimentale concluante (Lacoste, in press).

Depuis 1972, un certain nombre de virus ont été décrits chez les bivalves marins. Ainsi, des mortalités massives d'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, ont été rapportées à la fin des années 1960 en France et associées à la détection de virus apparentés à la famille des *Iridoviridae* (Comps et al., 1976).

### Description de la famille *Herpesviridae*

La famille des *Herpesviridae* est caractérisée par un ensemble de structures spécifiques (fig. n°2). La **capside à symétrie icosaédrique** (162 capsomères) renferme le matériel génétique, soit un **double brin d'ADN linéaire** (120 à 200 kpb). Cette structure baigne dans un tégument fibreux, et l'ensemble est limité par une **enveloppe sphérique**. Les virus enveloppés sont en général peu résistants dans le milieu extérieur. Cette enveloppe est aussi indispensable pour infecter l'hôte. Le génome est organisé en séquences uniques et répétées qui selon leur arrangement permet de distinguer cinq différents types de virus : A, B, C, D et E. La pénétration du virus dans la cellule hôte se fait par fusion de l'enveloppe avec la

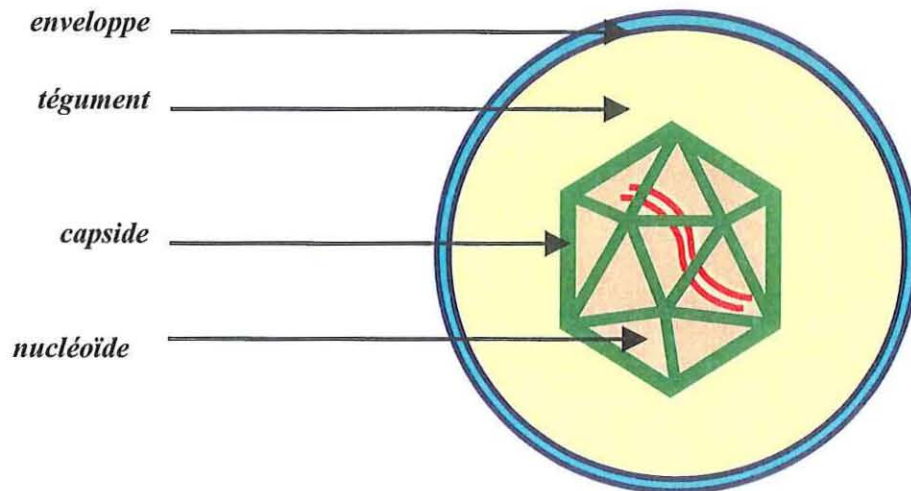
membrane cellulaire. Les nucléocapsides libérées, sont transportées du cytoplasme vers le noyau où les particules virales entrent par des phénomènes actifs. Les particules virales peuvent exister sous différentes formes chez l'hôte :

Sous forme **latente**, l'ADN viral peut être intégré au génome de l'hôte, ou persister dans le noyau des cellules sous forme non intégrée, l'ADN est alors circulaire (Garcia-Blanco et Cullen, 1991). La latence est une propriété commune à de nombreux virus de type Herpès. Le virus peut également être présent sous une forme de **multiplication peu ou pas productive**, chez les individus asymptomatiques. Le virus se maintient ainsi dans les organismes infectés. Sous des conditions stressantes telles qu'une élévation de la température ou un tri des animaux, le virus peut être réactivé. Il entre alors dans un cycle viral productif, si les conditions sont favorables au virus, ou dans un cycle viral abortif si les conditions sont défavorables au virus (cf. fig. n°3).

Le **cycle viral productif** correspond à la phase de **multiplication active**, c'est à dire à la production de particules filles intègres correspondant à des particules enveloppées et infectieuses libérées sous forme de vésicules dans le noyau et ensuite sous forme de virions enveloppés dans le milieu extracellulaire. Le cycle viral productif conduit à la mort cellulaire. Le nucléole présente une taille plus grande et se déplace contre la membrane nucléaire tandis



que la chromatine se marginalise. Le noyau prend alors une forme anormale et présente des excroissances. Puis, les altérations atteignent la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, aboutissant à la libération de particules virales infectieuses et la mort de la cellule (Le Deuff, 1995).



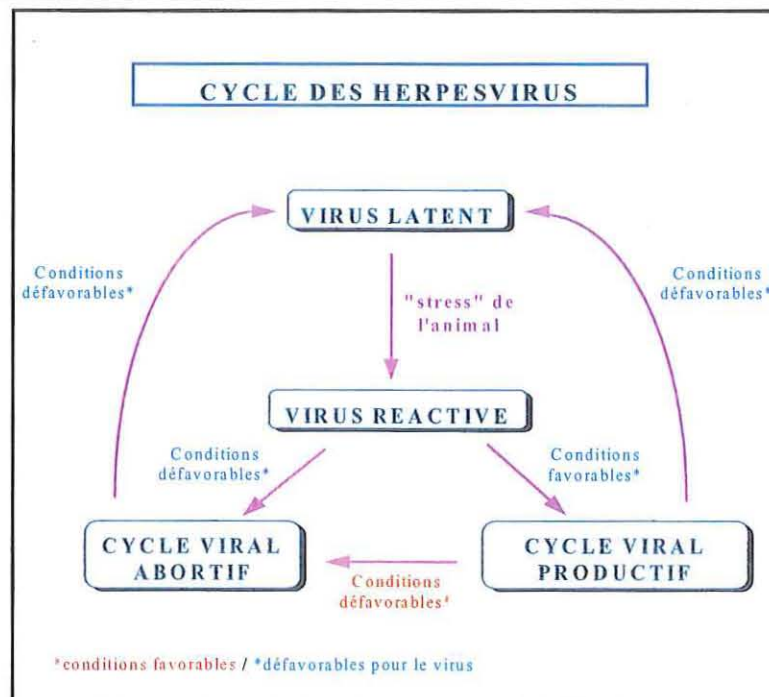
**Figure n°2 :** Structure générale d'un Herpesviridae

**L'enveloppe:** structure la plus externe du virus, elle est indispensable à l'infection de la cellule hôte.

**Le tégument:** structure fibreuse localisée entre la capside et l'enveloppe.

**La capside:** structure à symétrie icosaédrique (162 capsomères), formée de protéines, elle contient le nucléoïde.

**Le nucléoïde:** structure opaque aux électrons, constituée d'ADN viral bicaténaire et de protéines.



**Figure n°3:** Cycle des Herpesviridae

### **Virus type herpès chez *C. gigas***

Des infections impliquant des virus de type herpès sont décrites depuis le début des années 1990 chez diverses espèces de bivalves dans différentes régions du globe (Renault, 2000). Si l'effet pathogène de ce virus a pu être démontrée pour les stades larvaires (Le Deuff *et al.*, 1994), la reproduction expérimentale de la maladie sur le naissain est pour l'instant infructueuse. Par ailleurs, il a été montré que des températures élevées favorisaient le développement des infections à virus de type herpès (Le Deuff *et al.*, 1996). En effet, la température pourrait influencer la rapidité de développement de la maladie, mais elle pourrait également intervenir dans l'activation de virus présents chez les coquillages sous forme latente ou en cycle peu productif. Enfin, il semble aujourd'hui qu'un même virus soit capable d'infecter plusieurs espèces de coquillages différentes (Renault *et al.*, 2000b).

Des outils moléculaires ont été développés suite à la purification du virus infectant les larves d'huître creuse (Le Deuff & Renault, 1999 ; Renault & Lipart, 1998 ; Renault *et al.*, 2000a).

Sur le naissain, des virus ont été observés, d'abord suspectés en histologie puis confirmés comme étant apparentés aux virus de type Herpès en microscopie électronique (structure de la capsid, position intranucléaire), en association avec des mortalités importantes sur des lots de naissain de *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994).

Les conditions de transmission du virus dans le milieu extérieur ainsi que sur le naissain sont encore inconnues, mais la transmission verticale entre géniteurs et descendants est fortement soupçonnée (Le Deuff *et al.*, 1994). La purification des particules virales (Le Deuff, 1995), suivi du séquençage partiel a permis d'étudier d'autres caractéristiques (surtout génomiques) du virus. Grâce à ces études, de nouvelles techniques de détection, basées sur la reconnaissance de séquences d'ADN viral, ont été développées : la Polymérase Chain Reaction PCR (1996) et l'Hybridation In Situ (1999). Le virus a depuis été complètement séquencé et sa position phylogénétique au sein des *Herpesviridae* a été confirmée (Renault, com. Pers. 2001).

#### **1.5. Diagnostic du virus Herpès chez *C. gigas***

Le **diagnostic microscopique** effectué sur des coupes histologiques de matériel infecté à été la principale technique de détection utilisée lors des fortes mortalités de naissain *C. gigas* en 1994 et 1995. Des anomalies nucléaires, surtout localisées au niveau des tissus conjonctifs de différents organes, ont été observées. Ces anomalies consistent principalement en la présence de larges noyaux dont la chromatine est condensée en périphérie. Aussi, une

désorganisation généralisée des tissus affectés peut être observée, les réactions inflammatoires autour des cellules infectées restent cependant réduites. Enfin, il est possible d'observer des nécroses dans le cas d'infection avancée (Le Deuff, 1998). La détection par histologie s'avère difficile et non spécifique, en effet la confusion avec des lésions de nécrose post-mortem est délicate. C'est après examen en microscopie électronique à transmission que la présence virale est confirmée ou non (surtout au niveau des noyaux hypertrophiés). Des particules virales ont été décrites dans le noyau et dans le cytoplasme de certaines cellules infectées (Renault *et al.*, 1994a et 1994b)

Afin de traiter un nombre d'échantillons plus important et de façon plus spécifique que l'histologie, la technique de diagnostic par la **Polymérase Chain Reaction (PCR)** a été mise au point (Renault *et al.*, 1996). L'optimisation du protocole a permis d'obtenir une technique reproductible, avec un bon seuil de détection (2500 copies) (Renault, 2000).

Les résultats de détection du virus par PCR, sur les échantillons de naissain ayant présenté des mortalités entre 1997 et 2000 chez différents professionnels en France, sont délicats à interpréter (Thébault, 1999, 2000 et in press). En effet, le virus n'est pas systématiquement détecté, et présente un faible taux de prévalence (nb d'individus infectés/ nb d'individus analysés). En 1998 la détection du virus herpès coïncide avec le démarrage des mortalités à Fouras (fig. n°4) (Allard, 1998 et Thébault com. Pers.). En 1999, quasiment aucun échantillon n'a révélé la présence du virus. Cependant, ces deux années là, les mortalités de naissain étaient faibles, inférieures au seuil légal des mortalités anormales à Fouras.

Ainsi, différentes hypothèses peuvent expliquer ces résultats:

- la PCR n'est pas assez sensible,
- l'échantillon est pris trop tardivement après les mortalités,
- les mortalités ont différentes origines ou d'autres origines.

Ainsi, une deuxième technique moléculaire, l'Hybridation In Situ (HIS) sera donc adoptée pour la détection du virus type herpès chez le naissain (Renault *et al.*, 2001). Cette technique a été développée afin de confirmer la présence du virus type herpès sur des coupes histologiques de naissains d'huîtres. On peut ainsi localiser l'ADN viral dans les tissus des naissains de *C. gigas*.

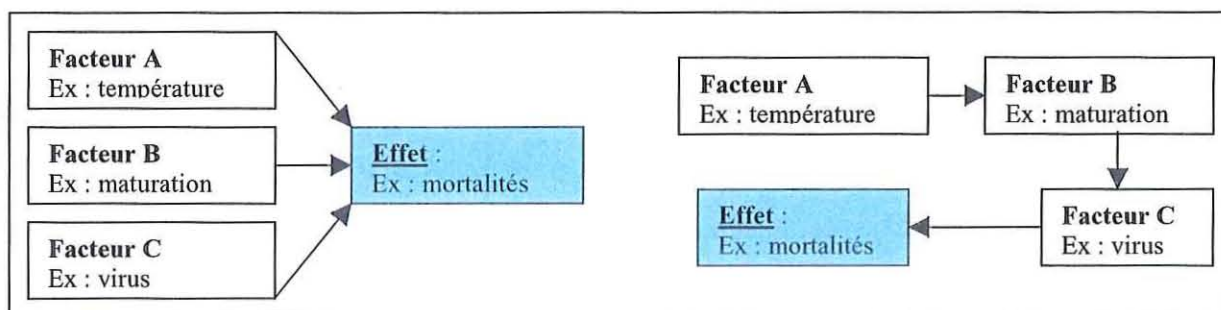
Afin d'éviter de prélever trop tardivement, le pas de temps pour les prélèvements sera donc restreint de bimensuel à hebdomadaire. Enfin d'autres facteurs seront étudiés.

## 1.6. démarche épidémiologique d'étude des mortalités

### Généralités sur l'épidémiologie

L'épidémiologie apporte une démarche pour aborder une maladie ou un trouble de la santé d'origine complexe. Ainsi, lorsque les essais de reproduction expérimentale des mortalités estivales de naissain s'avèrent infructueux, il faut revenir à des études par observation. Les mortalités anormales de coquillages se prêtent particulièrement bien à une approche par l'épidémiologie (Thébault, 2001).

L'épidémiologie descriptive a pour objectif d'identifier la ou les causes de la maladie, de rechercher toutes les origines possibles, ou au moins d'émettre des hypothèses sur celles-ci.



**Figure n° 5 :** Dans le cadre d'un effet plurifactoriel, les différents facteurs en présence peuvent être indépendants (figure de gauche), ou en interactions (figure de droite).

Les facteurs hôtes – agents -pathogènes peuvent chacun avoir un lien direct avec les mortalités, être liés entre eux (figure n°5 à droite), ou bien ne pas être liés et concourir à de la mortalité (figure n°5 à gauche). Dans la majorité des cas il s'agit d'une combinaison de ces deux types de situations.

La relation entre une cause et un effet est donc complexe. Pour l'étudier, il faudra (dans le cas de la figure 5 à gauche) étudier de façon exhaustive tous les facteurs pouvant être impliqués et retenir ceux qui sont le plus statistiquement corrélés aux mortalités. Dans le second cas (figure 5 à droite), seule une étude répétée dans le temps permettra de mieux déterminer la succession des événements.

Afin de mettre en évidence un ou des **facteurs de risques**, dans une **étude descriptive**, on utilise la règle des "3A" (Toma *et al.*, 2001) : il faut démontrer un phénomène d'Antériorité (le facteur précède l'effet), trouver une Association statistique entre le facteur et la pathologie et rechercher l'Absence de toute autre explication. Il existe d'autres critères de causalité pouvant être utilisés en milieu marin, dans le cadre

d'études descriptives (Thébault, 2001) ou analytiques. Dans les études analytiques on compare plusieurs groupes de sujets par rapport au facteur étudié.

Dans le cas d'étude par observation, il faut respecter un certain nombre de règles :

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>-Formuler l'hypothèse de départ</li><li>-Comparer les résultats obtenus avec l'hypothèse</li><li>-Vérifier la règle des "3A"</li><li>-Eliminer les biais et répondre à l'hypothèse du départ</li></ul> |
|--|

### Objectifs de l'étude sur Fouras

L'étude de 2001, effectuée sur le site de Fouras, vise à **estimer les mortalités estivales sur les juvéniles** et à **identifier différents facteurs de risque** pouvant être impliqués. Ainsi, cette étude permettra de confirmer la cinétique des *Herpesviridae*, étudiée grâce aux techniques d'**Hybridation in situ** et de **Polymérisation en chaîne (PCR)**, mais également de corrélérer les mortalités estivales de naissain avec différents **paramètres environnementaux** (température, oxygène dissout, salinité) relevés grâce à la **sonde YSI**.

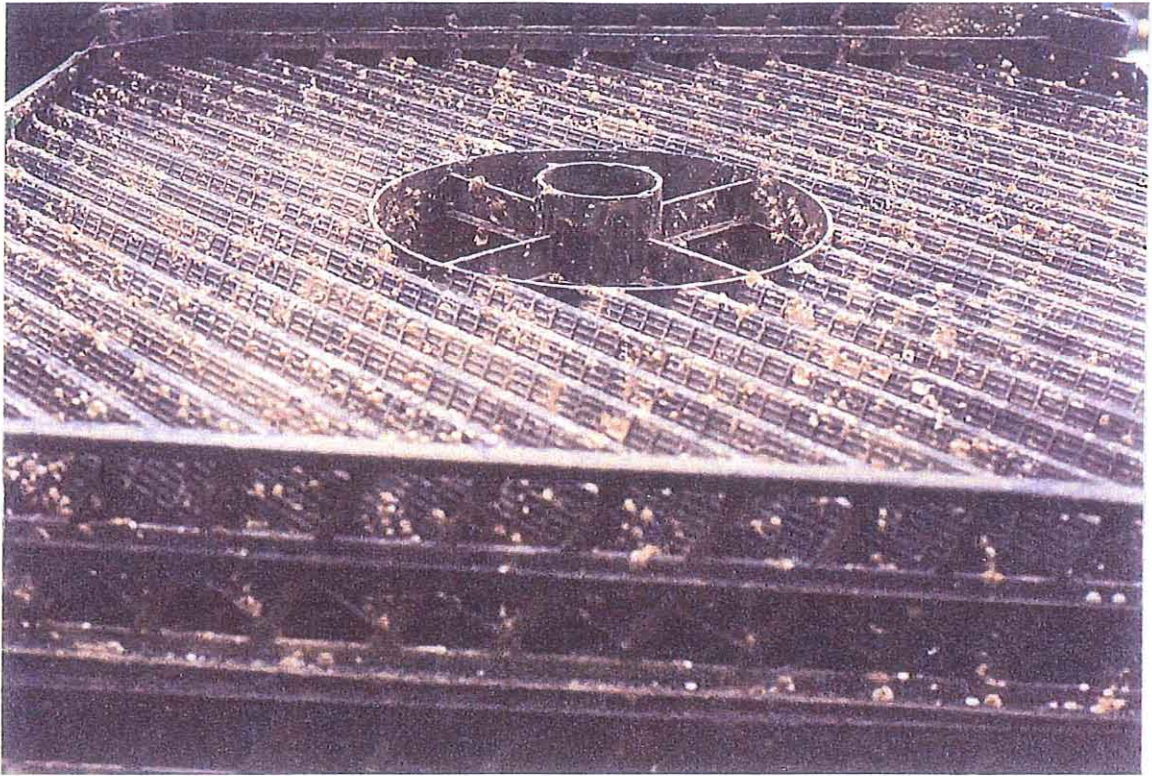
## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Population statistique

La population de naissain d'huîtres *Crassostrea gigas* qui a été utilisé au cours de l'étude a une origine commune. Ces animaux sont issus de collecteurs pléneaux (photo 1) placés à Fouras, dans le site des Ecouts (coeff. de 100) à la pointe de la Fumée après le 20 août 2000. Le 6 mai 2001, ces collecteurs, issus de la même concession, ont été ramenés à l'exploitation, puis criblés et mis en poches le 7 mai (photo 2 et 3). La classe de taille des animaux retenus était la plus fréquente dans ce criblage. La taille des animaux de l'étude était le 7 mai supérieure à 8 mm et inférieure à 10 mm. Chaque poche a été chargée à 3,5 kg, ce qui correspond à un effectif théorique par poche de 7000 individus. Douze poches de mailles de 8 mm ont été placées sur des concessions différentes de la presqu'île de Fouras, à la pointe de la Fumée, dans la zone de balancement des marées.

Six poches sont placées de manière à y avoir accès lors de marées de faibles coefficients d'exondation (40). Ces poches sont donc accessibles toutes les semaines. Trois poches ont été déposées sur la concession A et trois poches sur la concession de B (tableau 3 et carte 1).

Six autres poches ont été placées à des niveaux qui ne sont découverts que lors de fortes marées (coefficients de 85 et de 100), c'est à dire qu'elles ne seront accessibles au maximum



**Photo 1:** Vue sur les cadres pléneaux utilisés pour le captage naturel de *C. gigas* sur le site de Fouras.



**Photo 2:** Criblage du naissain d'huîtres creuses avant la mise en poche.



**Photo 3:** Mise en poche du naissain d'huîtres creuses sur les tables surélevées du site de Fouras.



**Photo 4:** Mode de prélèvement des échantillons.

que toutes les deux semaines. Trois poches ont été déposées sur la concession C et trois autres sur la concession D (tableau 3 et carte 1).

Concessions	A40	B40	C100	D85
Poches à coefficient 40	P1, P2, P3	P4, P5, P6	-	-
Poches à coefficient >80	-	-	P7, P8, P9	P10, P11, P12

**Tableau n°3** : Répartition des poches sur les différents sites de la pointe de la Fumée

## **2.2. Plan d'échantillonnage**

Le tirage des échantillons est qualifié d'aléatoire (effectué au hasard) et sans remise (les huîtres ne sont pas remises dans la poche). L'effectif échantillonné est considéré comme négligeable par rapport à l'effectif restant (< 10%).

- ↘ La poche est vidée dans un conteneur et l'ensemble est mélangé. Environ 300 individus sont prélevés au hasard à l'aide d'une bassine, pour prélever davantage au hasard que ne le ferait un prélèvement manuel (photo 4). Le volume de ces animaux est estimé sur une première mesure, marqué sur le récipient qui servira aux autres prélèvements. La poche est ensuite refermée et attachée sur la table. Les prélèvements sont directement conservés au froid (glacière) pendant 1 heure (temps du trajet) avant d'être triés et analysés au laboratoire.
- ↘ Les prélèvements sur les poches peu profondes (A40 et B40) se font tous les mardi de chaque semaine. Les prélèvements sur les poches plus profondes (C100 et D85) ne se font que toutes les deux semaines.

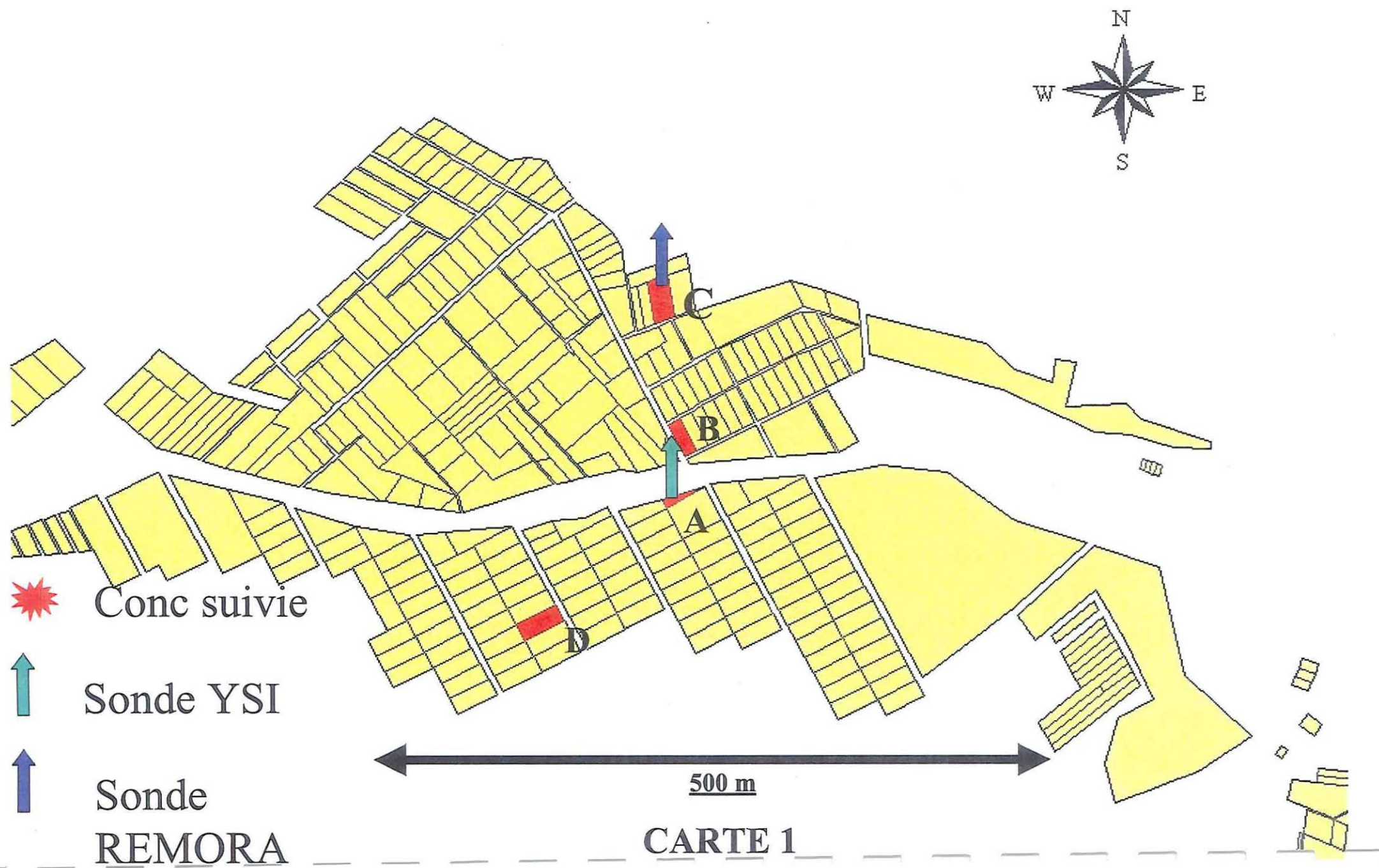
## **2.3. Pesée et Biométrie**

La pesée des prélèvements de chaque poche est effectuée en laboratoire. L'ensemble du prélèvement est pesé.

La mesure de taille est effectuée sur les poches P1, P2 et P3 (Allard 40). Trente individus par poche sont prélevés au hasard (tirage aléatoire) et la taille est mesurée par un instrument à coulisse. La taille moyenne du naissain de chacune des trois poches est ainsi grossièrement suivie.



# suivi des concessions à Fouras en 2001



## 2.4. Suivi de la mortalité

Le comptage est effectué au laboratoire, après pesée, lavage grossier à l'eau douce, et séchage de quelques minutes.

Les critères pour définir le statut d'un individu sont les suivants :

- Si les deux valves sont soudées, l'individu est considéré comme vivant (viv),
- si les deux valves sont ouvertes et qu'il reste de la chair à l'intérieur, l'individu est considéré comme mort et baillant (bai),
- Si les deux valves sont ouvertes sans chair à l'intérieur, l'individu est considéré comme mort (2v).
- Si une valve supérieure est trouvée, avec une charnière encore visible, on la considère comme un demi individu mort (vsup).
- Si une valve inférieure est trouvée, avec une charnière encore visible, on la considère comme un demi individu mort (vinf).

Dans l'estimation de la mortalité, les "baillantes"(bai) et "ouvertes vides"(2v) sont ajoutées pour désigner le critère d'huître morte à deux valves (2vt).

Un individu qui meurt passe par les différentes phases suivantes :

vi  $\rightarrow$  bai  $\rightarrow$  2v  $\rightarrow$  vinf + vsup  $\rightarrow$  débris.

Les frottements finiront par abîmer les charnières, et feront disparaître les traces de cet individu mort.

Ceci permet de définir les critères suivants :

<b>Critère 1 :</b>	$(nb\ 2vt) / (nb\ viv + nb\ 2vt)$
<b>Critère 2 :</b>	$(nb\ 2vt + (nb\ vsup + nb\ vinf)/2) / (nb\ viv + nb\ 2vt + (vsup + vinf)/2)$
<b>Critère 3 :</b>	$Nb\ bai / (nb\ viv + nb\ 2vt + (vsup + vinf)/2)$

**Tableau n°4 :** critères pour le calcul de mortalité.

Le critère 3 met en avant l'état moribond de la population et traduit donc la mortalité la plus récente. Le premier critère traduira des mortalités récentes, et le second des mortalités plus anciennes. Ces trois critères sont cependant des mortalités cumulées puisque les mortes de la poche ne sont pas enlevées d'une fois sur l'autre (tirage aléatoire et sans remise) et que le

prélèvement est considéré comme négligeable (surtout au début). Une mortalité incidente hebdomadaire a été calculée à partir de la différence de deux critères 1 sur deux semaines successives.

## 2.5. Diagnostic du virus type herpès par PCR et HIS

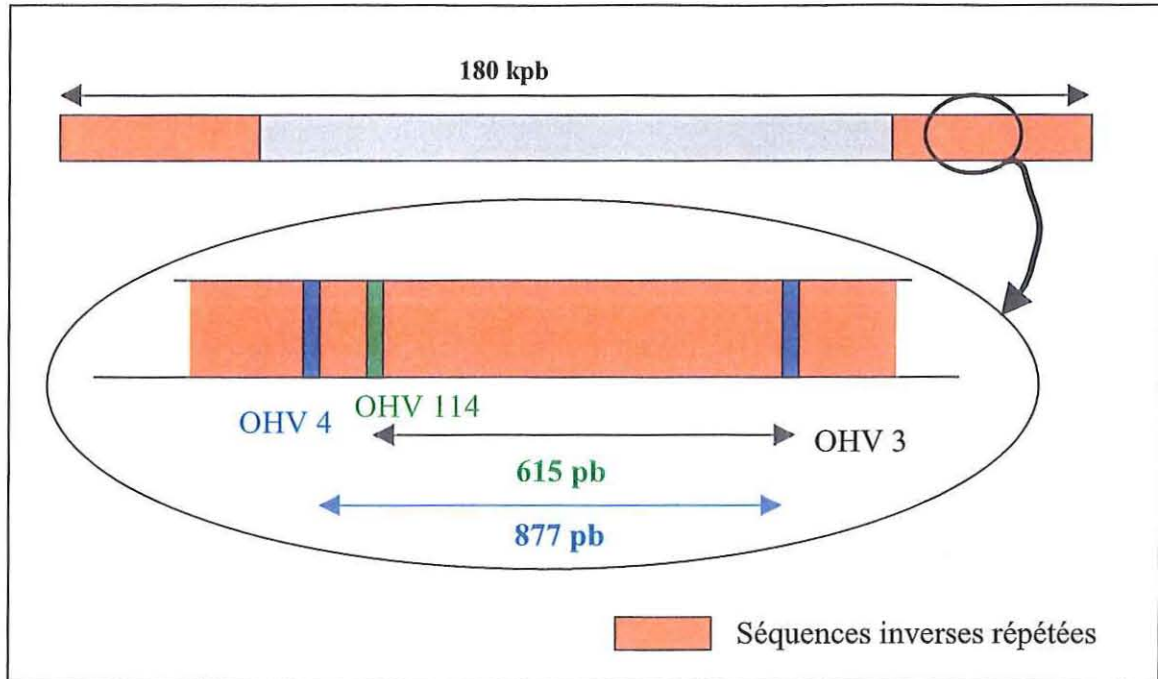
La PCR mise au point en 1985 par Saiki (Saiki et *al.*, 1988), est une réaction enzymatique de polymérisation de l'ADN. La particularité de cette technique réside dans le fait que les copies d'ADN néosynthétisées servent de matrice au cours des cycles d'amplification suivants, aboutissant ainsi à une amplification exponentielle du nombre de copies. Le principe général est rappelé en **annexe n°1**.

L'hybridation In Situ est une méthode moléculaire ayant pour but de détecter et de localiser des séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) par des sondes d'acides nucléiques dans des cellules ou des tissus. Le principe de la méthode réside dans l'hybridation spécifique d'une sonde marquée à sa séquence complémentaire (ADN ou ARN), dans des tissus fixés, suivi de la visualisation et de la localisation du duplex sonde/ cible.

### **Caractéristiques de détection du virus type herpès**

La structure du génome de ce type de virus, présente 2 régions de séquences répétées inverses. Afin d'augmenter les chances de détection du virus, ce sont souvent ces séquences répétées qui sont choisies préférentiellement pour être amplifiées.

Les séries d'amorces ont été construites à partir d'oligonucléotides de synthèse de séquences définies. Les amorces sont toujours utilisées en couple afin d'encadrer une séquence donnée. Le couple d'amorces OHV3/OHV4 et le couple d'amorces OHV3/OHV114 permettent d'amplifier une séquence à priori non codante du génome. Chacun de ces couples d'amorce encadre une zone, un fragment de taille définie (figure n°6).



**Figure n°6** : Structure du génome du virus type herpès de l'huître. Localisation des amorces utilisées en PCR (OHV114 / OHV3) et en HIS (OHV3 / OHV4).

La Polymérase Chain Reaction (PCR) utilise les amorces OHV3 / OHV114 (figure n°6). Les amorces OHV3 / OHV4 seront utilisées pour la détection par Hybridation In Situ.

#### Technique de PCR appliquée à la détection de virus type herpès

- 30 individus par poches et par unité de temps ont été prélevés afin d'être analysés en PCR. Cependant, face à une trop grande quantité d'échantillons, seulement 10 animaux vivants (soit 2 pools de cinq) seront analysés. Si le virus herpès est détecté dans au moins un pool, alors la totalité des animaux restant du lot concerné est analysée, afin de mieux déterminer la prévalence du virus dans les lots positifs.

De plus, lors du dénombrement effectué afin de calculer les pourcentages de mortalité du naissain, tous les animaux baillants (mort, les deux valves attachés, la chair encore présente dans la coquille) sont conservés. La totalité de ces animaux sera analysée.

- La préparation des échantillons ne comprend pas d'extraction d'ADN. Les animaux vivants ont été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Après décoquillage et décongélation, les huîtres sont mélangées et broyées par pools de 5 individus, et maintenues sur glace. Une fraction du mélange obtenu, de 100 mg à 500mg maximum, est ensuite diluée dans de l'eau bidistillée, puis subit un bain-marie bouillonnant de 10 mn pour éliminer les DNases. Seuls les surnageants obtenus après centrifugation (5 mn à 10000 tr/min) sont récupérés (**annexe n°2**).

- Les PCR sont réalisées avec les amorces OHV3 et OHV114 qui amplifient un fragment de 710 paires de bases. Un cycle d'amplification se présente en 3 étapes: dénaturation, hybridation et élongation. Ces étapes se réalisent à des températures particulières (Renault *et al.*, 2000) (cf. annexe 3).
- La Taq polymérase utilisée a une activité constante malgré les variations de température au cours des cycles de PCR.
- La mise en évidence de l'ADN amplifié se fait par marquage au Bromure d'Ethidium (BET). Les bandes obtenues après migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (20 minutes à 110Volts) sont visualisées sous lampe Ultra-Violet. Le fragment attendu avec les amorces OHV3-OHV114 est de 710 pb.
- Des témoins sont insérés pour contrôler chaque réaction : le témoin positif est préparé en ajoutant au mix une solution de 2500 copies d'ADN viral. Les témoins négatifs sont préparés en ajoutant au mix de l'eau bidistillée, ce qui permet de contrôler les éventuelles contaminations. Enfin, l'inhibition de réaction sera également contrôlée (annexe n°2). Le principe est de rajouter à un surnageant négatif un fragment d'ADN viral connu et de vérifier que sa détection est possible (Renault com. Pers., 2001). Ce fragment a été obtenu à partir d'une délétion de la séquence virale originale de 77 pb. Le fragment attendu de ce témoin d'inhibition est donc de 632 pb. Un témoin positif a été ajouté contenant de l'eau et le fragment.

#### **Technique de l'Hybridation In Situ appliquée à la détection du virus type herpès**

- Le protocole utilisé a été mis au point par Renault *et al.*, 2001, pour la détection de virus de type Herpès de l'huître.
- Pour chaque lot (une poche à une date), 20 animaux sont fixés dans un fixateur utilisé classiquement en histologie en milieu marin, le Davidson (Annexe n°11).
- Après fixation, le matériel biologique est inclus dans la paraffine. Des coupes histologiques sont effectuées et récupérées sur des lames silanisées pour l'Hybridation In Situ.

La sonde est une séquence d'ADN viral (environ 877 pb), marquée, amplifiée en PCR, à l'aide des amorces OHV3 / OHV4 et à partir d'ADN viral purifié. Le marquage (uniquement de l'Uracile) est effectué à la digoxygénine (DIG). La mise en évidence des fragments

marqués est effectuée sur gel d'agarose à 2% puis on compare au témoin préparé avec des nucléotides non marqués.

Après dénaturation, l'hybridation entre la sonde et le fragment d'ADN cible donne un duplex ADN / ADN marqué au DIG. La fixation de l'anticorps préparé à la peroxydase (Ac II) sur l'anticorps anti-DIG (Ac I) active l'enzyme. En présence de produits révélateurs de l'action enzymatique (Di-Amino-Benzidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) un signal de couleur jaune/marron peut être visualisé.

- On compare le résultat à un témoin négatif préparé avec des nucléotides non marqués et à un témoin positif qui est une lame d'un animal qui a été contrôlé positif en microscopie électronique.

## 2.6. Mesures des paramètres

### Les paramètres environnementaux sur le site de Fouras

La sonde YSI (photo 5), installée le 30 mai sur le site A40, est fixée à la même hauteur que les poches d'huîtres et permet d'enregistrer toutes les 15 min la température (de l'eau durant l'immersion et celle de l'air pendant l'exondation), la salinité et le taux d'oxygène dissout. Cette sonde est rapportée au laboratoire tous les quinze jours afin de collecter les données enregistrées. Une autre sonde, qui ne mesure que la température est en place depuis plus d'un an sur la concession C100, mais n'est relevée que tous les 3 mois (carte 1).

### Les paramètres biologiques

Différents facteurs biologiques susceptibles d'être impliqués dans les mortalités de naissain *C. gigas* au cours de la période estivale sont étudiés. Certains facteurs sont directement éliminés par la mise en place de l'étude (la zootechnie par exemple). D'autres sont étudiés sur les huîtres des poches P1, P2 et P3 de la concession A. Pour cela des échantillons issus de ces poches ont été envoyés chaque semaine de l'étude dans différents laboratoires de l'IFREMER dans le cadre du programme MOREST (tableau n° 5).



**Photo 5:** Sonde YSI permettant la mesure des paramètres environnementaux du site de Fouras.

Paramètres étudiés	Laboratoires IFREMER
Maturation gamétique (aspect qualitatif et quantitatif)	Argenton
Bactériologie	La Tremblade et Brest
Evolution des capacités de résistance à différents stress	La Trinité
Réserves en glycogène	La Tremblade
Réserves en lipides	Brest
Marqueurs de stress physiologiques	Brest
Evolution de l'immunité cellulaire	La Tremblade
Marqueurs de stress immunitaires moléculaires	DRIM Montpellier
Evolution de la concentration du phytoplancton	La Tremblade

**Tableau n° 5** : Liste des laboratoires et facteurs étudiés impliqués dans l'étude des mortalités estivales des naissains de *C. gigas* sur Fouras

Le schéma le plus multifactoriel possible, qui prend en compte les interactions entre l'animal, son environnement, et différents agents infectieux est la méthode d'approche qui est employée ici pour étudier ces mortalités estivales de naissain de 2001. Selon le schéma décrit précédemment (figure n°5), de nombreuses combinaisons de facteurs sont possibles, et plusieurs scénarios sont envisageables.

### 2.7. Analyse des données

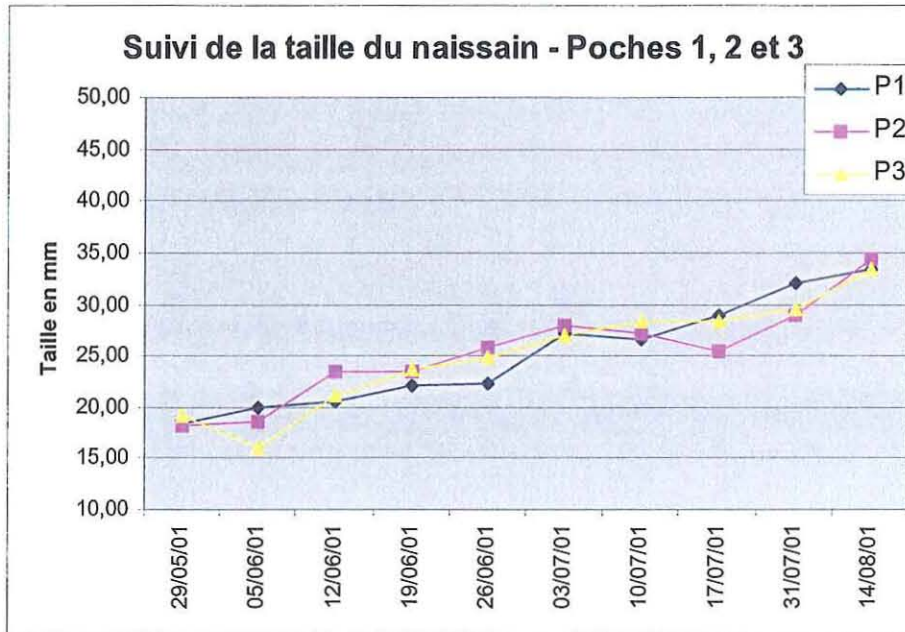
Les données seront analysées graphiquement en comparant les intervalles de confiance. Les tests utilisés seront ceux du X<sup>2</sup>. Les données issues des sondes de mesures sont des séries temporelles. Afin de mieux visualiser les résultats de ces séries temporelles des moyennes mobiles ont été calculées sous EXCEL. L'intervalle utilisé était soit un cycle de marée (48 périodes) soit 24 heures (96 périodes).

## 3. RESULTATS

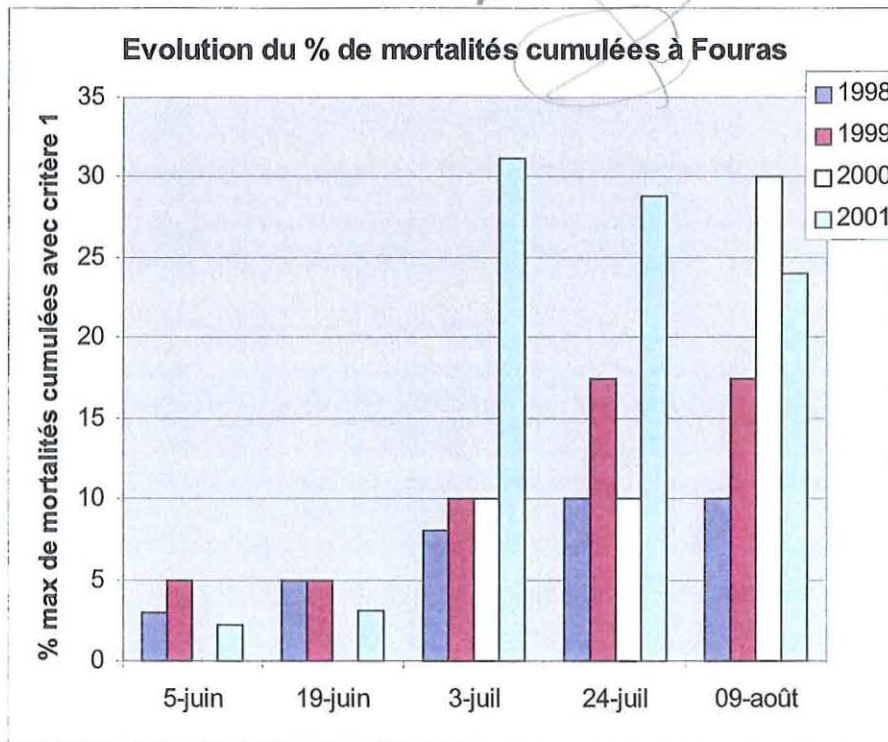
### 3.1. L'évolution de la taille moyenne des naissains au cours de la période estivale 2001

La taille moyenne du naissain *C. gigas* au cours de la période d'étude a été suivie uniquement sur les poches 1, 2 et 3 (concession A40). L'allure générale des courbes montre une croissance relativement linéaire des huîtres (Figure n°6). Sur les trois mois d'été (Juin, Juillet, Août), la taille des naissains est passé d'environ 18 à 35 mm.





**Figure n°6** : Evolution de la taille moyenne des naissains *C. gigas* au cours de la période estivale (poche 1, 2, 3 de la concession A40)



**Figure n°7**: Présentation des mortalités estivales enregistrées de 1998 à 2001.

### 3.2. L'évolution de la mortalité du naissain au cours de la période estivale 2001

#### **Mortalités enregistrées de 1998 à 2001**

Le nombre d'animaux comptés pour estimer les mortalités au cours de la période estivale en 2001 est d'environ 30 000 huîtres.

Depuis 1998 les mortalités estivales sur Fouras ont augmentées (figure n°7). En effet, elles sont passées de 10% en 1998 à plus de 30% en 2001. En 1998 et 1999 les mortalités étaient comprises entre fin juin et début juillet. Cette année les mortalités semblent un peu plus précoces. En 2000 il a été observé une recrudescence des mortalités début août, ce qui n'a pas été constaté cette année.

#### **Mortalité sur les poches 1, 2 et 3 (concession A)**

Le critère 1, comme le critère 2 et 3 décrivent des mortalités cumulées. Le phénomène de mortalité avec le critère 1, qui ne tient compte que des mortes avec 2 valves soudées sur les poches 1, 2, et 3 apparaît après le 19 Juin 2001 (fig.8). Le maximum de mortalité des poches 1 et 3 est atteint en même temps, soit le 3 Juillet.

Le critère de mortalité 2 (figure n°9), qui tient compte aussi des valves séparées, montre une certaine rémanence des mortalités par rapport au critère 1, mais ne change pas globalement les résultats obtenus par le critère 1.

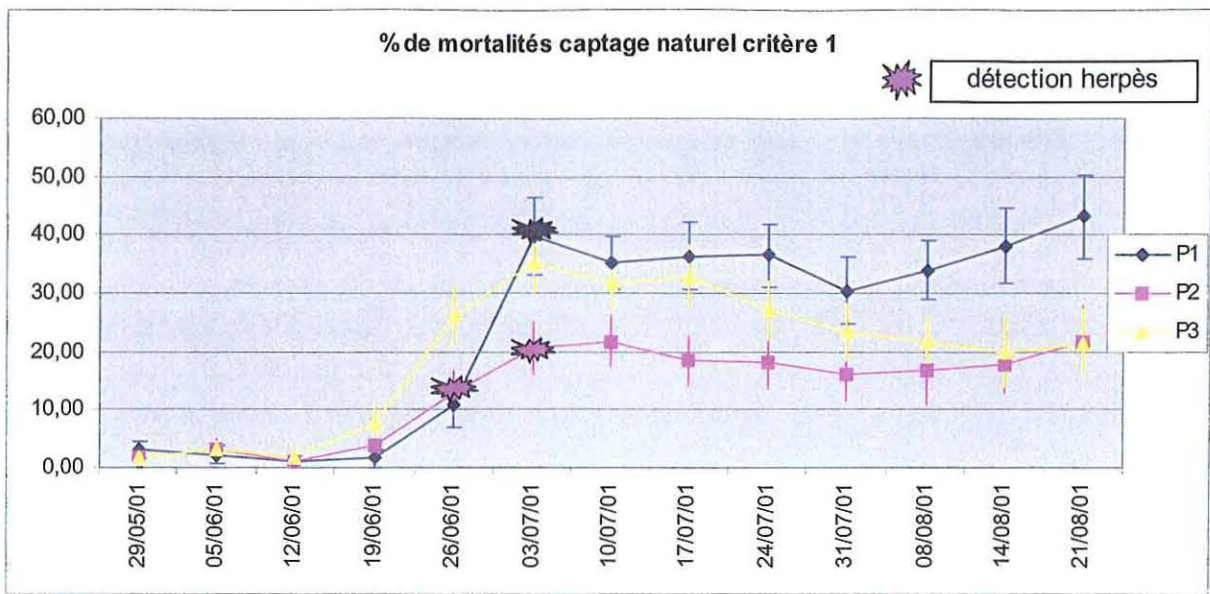
L'évolution du critère 3, qui ne tient compte que des baillantes sur les poches 1, 2 et 3, indique que le pourcentage de baillantes augmente mi-juin, est maximum entre le 26 juin et le 10 juillet, puis diminue jusqu'aux valeurs de départ (figure n°12). Le pourcentage d'animaux baillants est resté faible, au maximum de 12%.

La mortalité incidente hebdomadaire (à partir du critère 1), confirme les résultats précédents à savoir que l'augmentation des mortalités se sont surtout produites entre le 19 juin et le 3 juillet. Après cette date, il n'y a quasiment plus de mortalité, sauf, dans une moindre mesure à la mi-août (figure n°11).

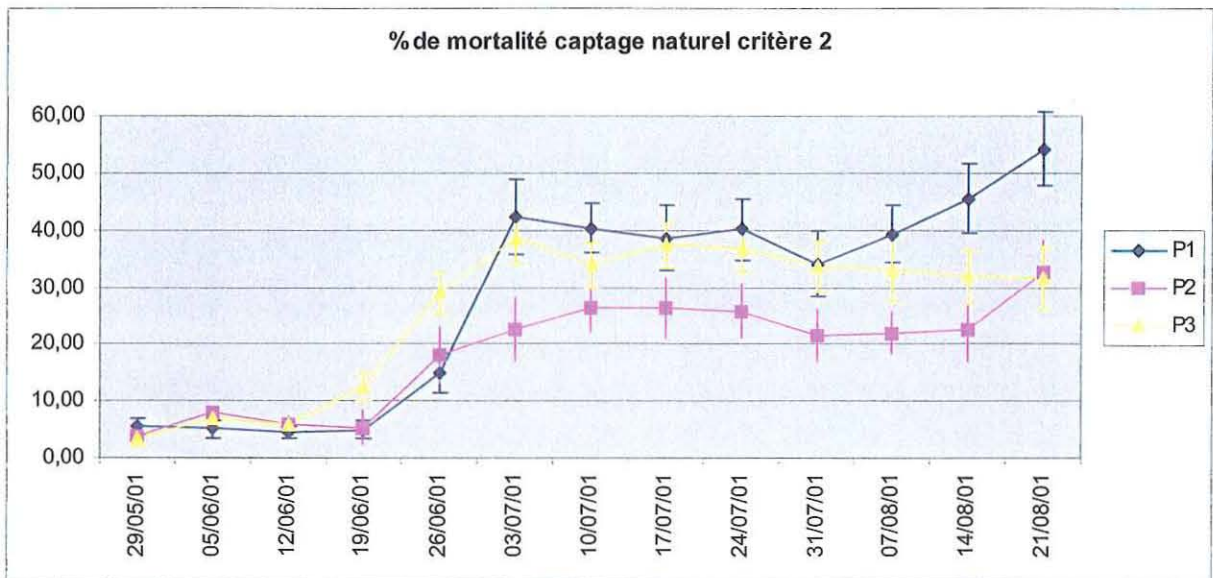
Suite à une probable erreur dans l'échantillonnage, les taux de mortalité enregistrés à la date du 07/08/01 étaient relativement discordants avec les résultats antérieures et postérieures. Ainsi, les données relatives au 07/08/01 ont été supprimées.

Le test de X<sup>2</sup> effectué entre le 19 juin et le 3 juillet sur les trois poches avec le critère 1 donne une différence significative.

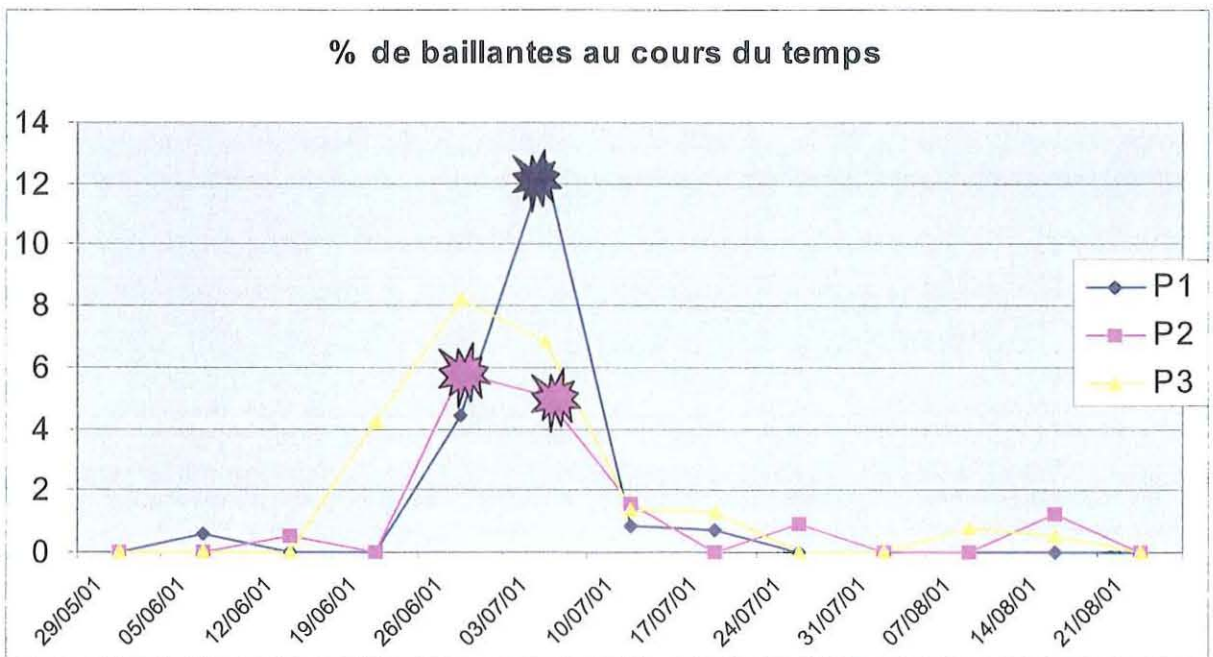
On note globalement une différence entre les poches à la fois dans la cinétique et dans les taux de mortalité atteints.



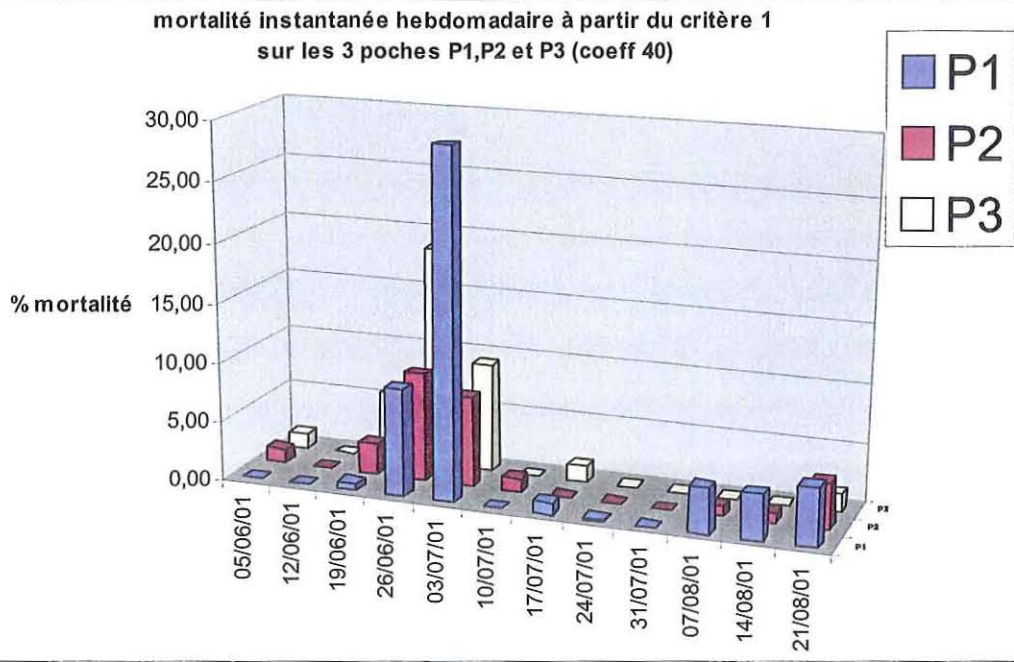
**Figure n°8** : Evolution des mortalités estivales sur les poches 1, 2 et 3, sous le critère 1.



**Figure n°9** : Evolution des mortalités estivales sur les poches 1, 2 et 3, sous le critère 2.



**Figure n°10** : Suivi du Pourcentage de la population d'animaux baillants.



**Figure n°11:** Evolution de la mortalité hebdomadaire instantanée (à partir du critère 1), sur les poches 1, 2 et 3.

La poche 2 se distingue des poches 1 et 3. Les mortalités atteintes sont inférieures aux deux autres poches (de l'ordre de 15 à 20%), et les écarts types ne se confondent pas avec ceux des autres poches (fig. n°8 et 9). La mortalité sur la poche 3 apparaît de manière précoce par rapport aux deux autres poches. Le test de X2 effectué le 3 juillet entre les trois poches donne un résultat significatif.

### **Mortalité 2001 sur les 12 poches**

Le phénomène de mortalité sur les 12 poches de captage naturel apparaît aussi dès le 19 Juin. Les maximums de mortalité sont atteints sensiblement en même temps, soit le 3 Juillet. On note globalement une différence entre les poches à la fois dans la cinétique et dans les taux de mortalité. Enfin, on observe, sur le graphique des mortalités (Critère 1 et 2), que la mortalité diminue globalement à partir du 24 juillet (fig. n°12 et fig. n°13 ).

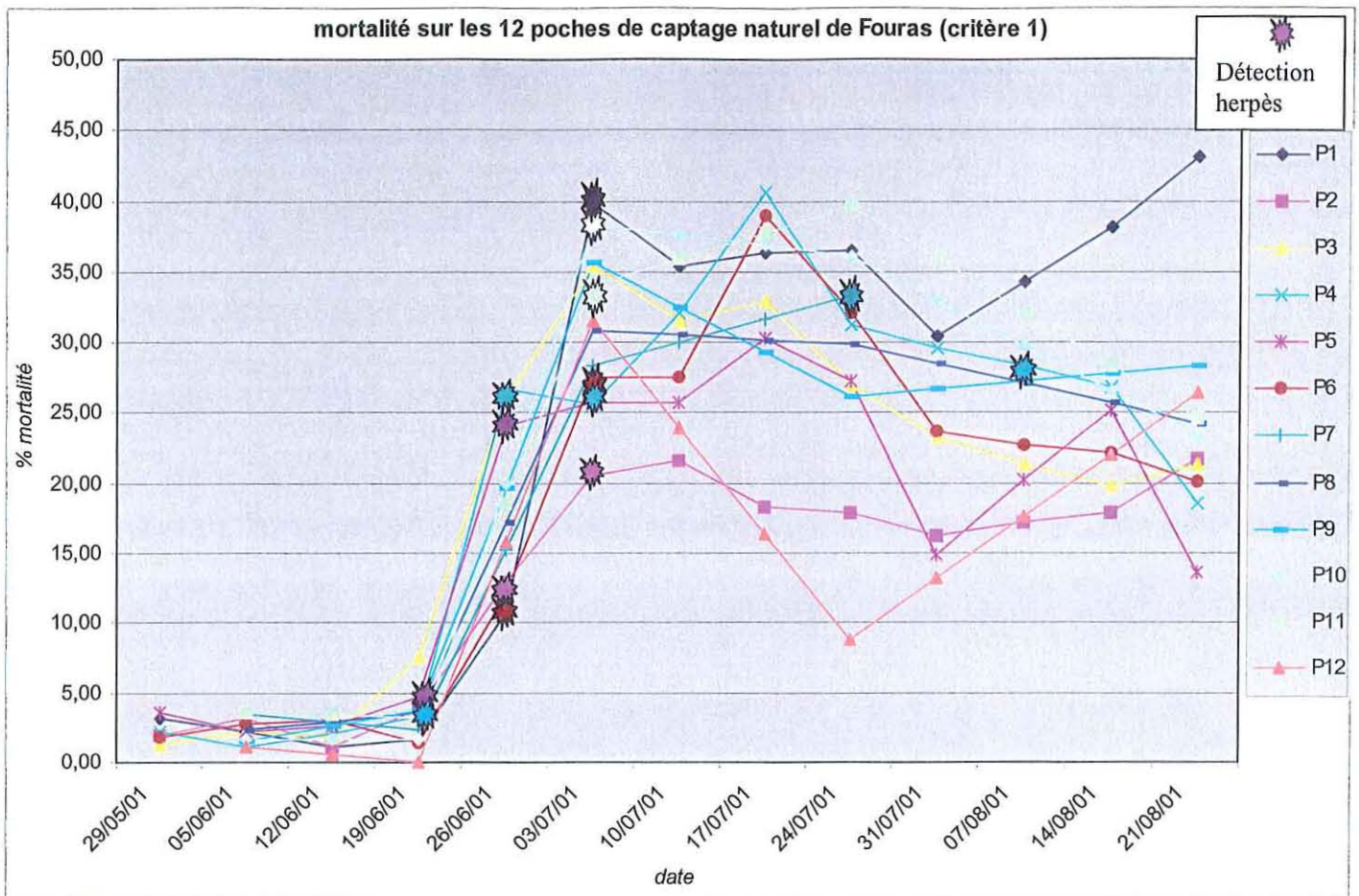
La mortalité instantanée hebdomadaire sur les 12 poches calculée à partir du critère 1, montre que la période de la mortalité estivale de 2001 s'étale en fait du 19 juin au 10 juillet (fig. n°14).

### **Moyenne des mortalités sur les concessions A, B, C et D**

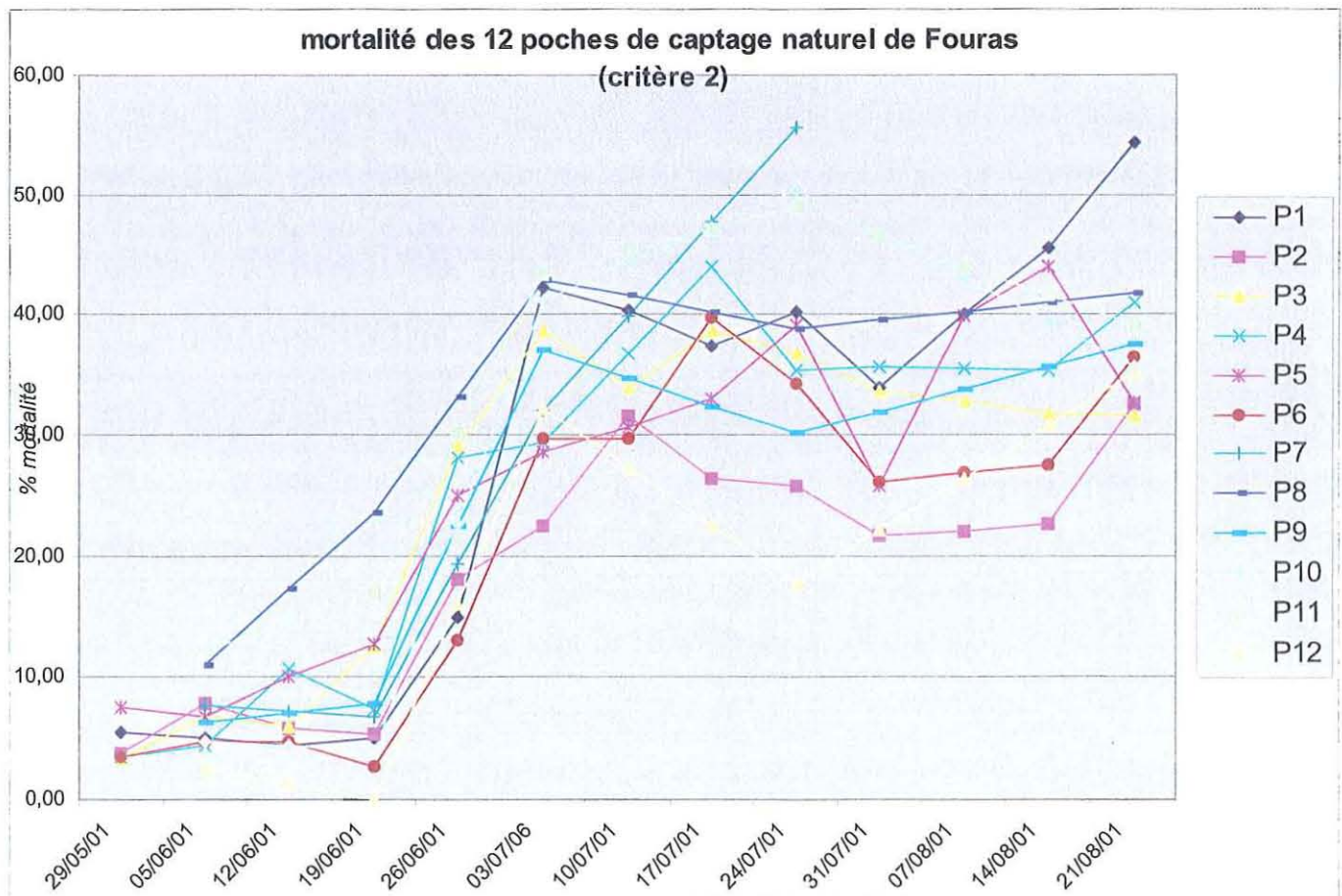
La moyenne des mortalités enregistrées sur les trois poches de chaque concession est représentée par la figure n°15. On note effectivement que la mortalité démarre au même moment sur les quatre concessions A, B, C et D (le 19 Juin). On remarque que les courbes représentatives des quatre concessions A, B, C et D évoluent parallèlement, et présentent peu de différences entre elles. On estime qu'il n'y a pas de différences nettes entre les concessions.

### **Mortalité sur les concession hautes et basses**

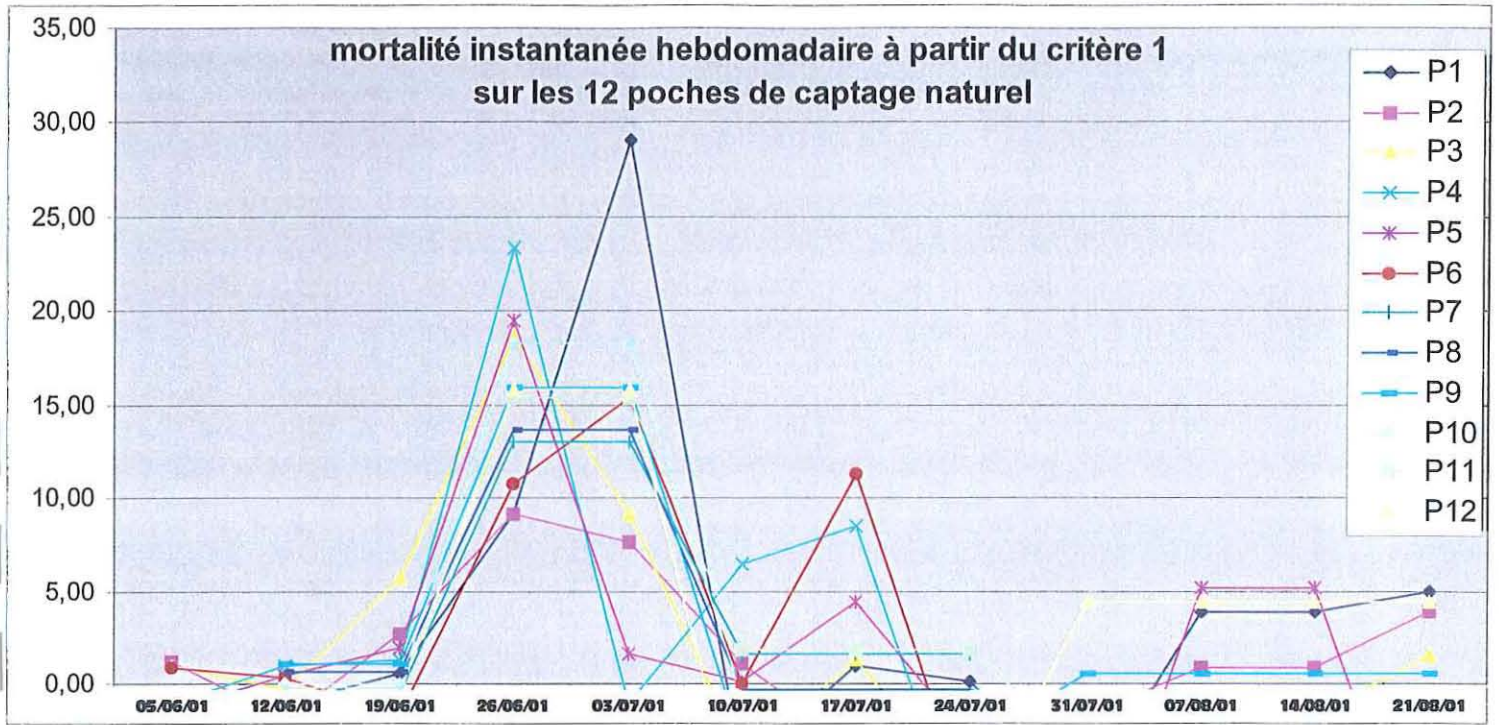
Les concessions hautes (A et B) et basses (C et D) présentent des taux de mortalités comparables (fig. n°16). Une différence non significative à 5% (test du X2) a été observée entre les concessions hautes et basses le 3 Juillet. Il n'a donc pas été trouvé d'effet du niveau d'exondation sur les mortalités.



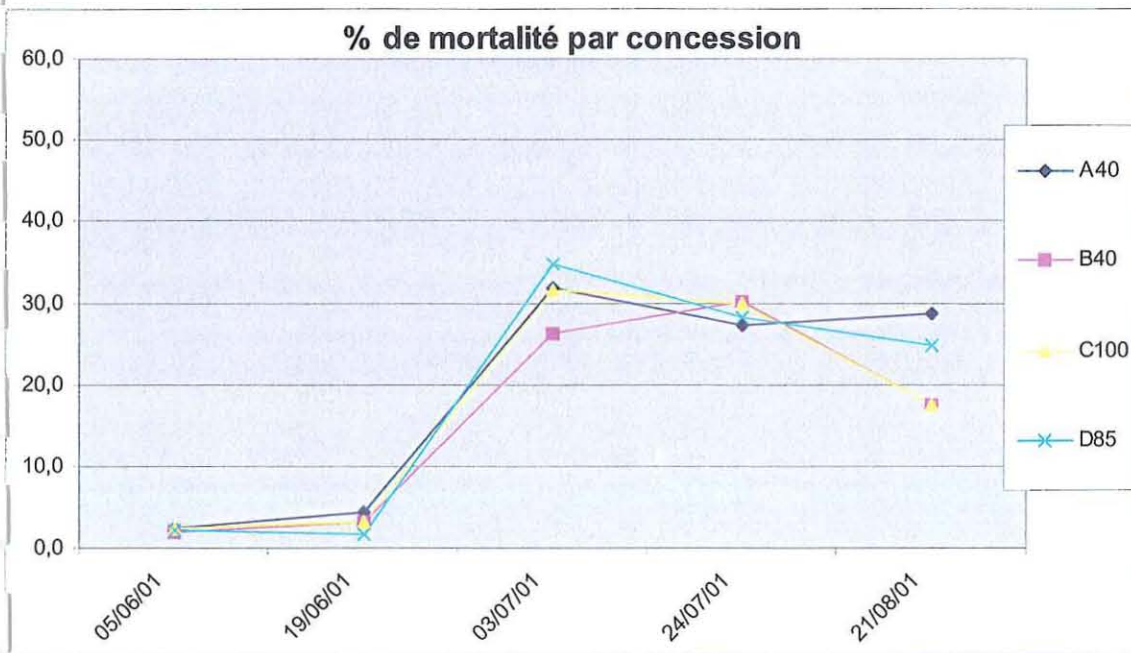
**Figure n°12** : Evolution de la mortalité des 12 poches au cours de la période estivale 2001 (critère 1)



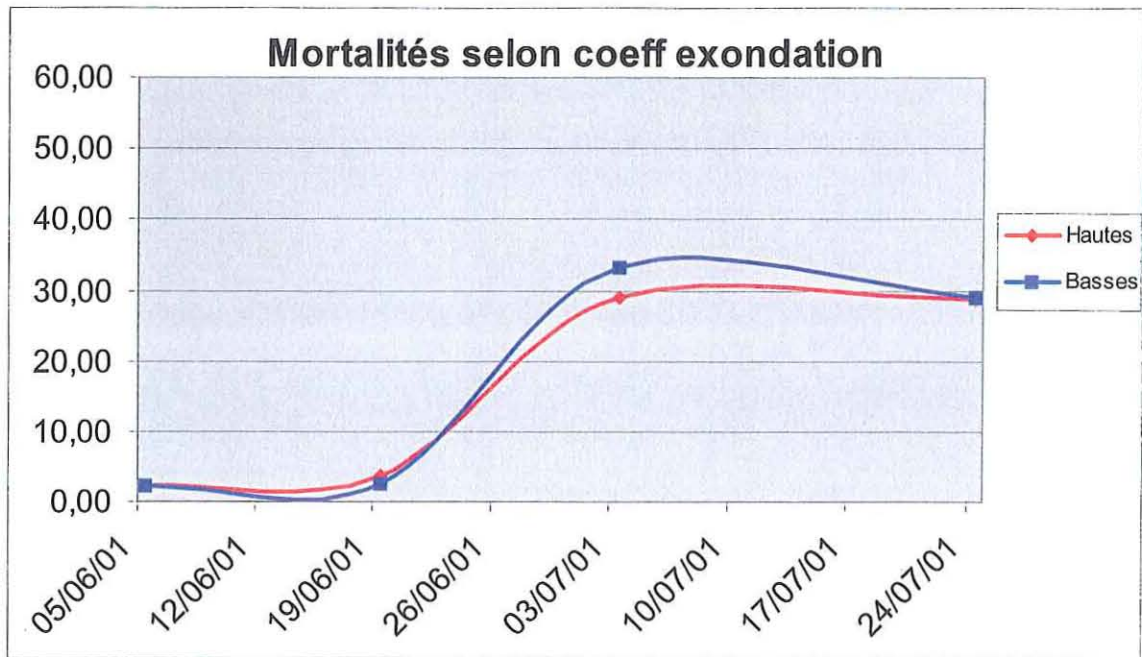
**Figure n°13** : Evolution de la mortalité des 12 poches au cours de la période estivale 2001 (critère 2)



**Figure n°14** : Mortalité instantanée hebdomadaire ,à partir du critère 1, sur les 12 poches de captage



**Figure n°15** : Taux moyen de mortalité , par concession



**Figure n°16** : Mortalités en fonction du coefficient d'exondation



### **3.3. Résultats des détections du virus type herpès au cours de la période estivale**

Le nombre total d'animaux examinés par PCR est de 1730 animaux. Afin de valider les résultats obtenus en PCR, un contrôle de l'inhibition des réactions a été effectué sur 12 pools des échantillons négatifs pris sur des pools non baillants de chaque semaine analysée. Il semble qu'il n'y ait eu aucune inhibition de réaction durant toute la période d'étude (photo n°6).

#### **Résultats PCR sur les huîtres non baillantes**

Le gel illustrant la détection d'ADN viral sur les échantillons est montré sur la photo 7. Tous les résultats de PCR sont indiqués dans le tableau 6. La première détection a lieu le 19 juin sur deux lots, soit sur un maximum de 10 animaux et un minimum de 2 animaux sur 120 animaux. Ensuite le taux de résultats positifs est encore plus faible, de 5 à 1 animal positif sur 120 ou 60 animaux. Globalement le taux d'animaux positif par PCR est inférieur à 10 voir à 5%.

#### **Résultats PCR sur les huîtres baillantes**

Deux pools d'animaux baillants se sont révélés positifs le 19/06/01. Le 26/06/01, ainsi que le 03/07/01, le pourcentage de pools positifs d'animaux baillants était d'environ 30%. Si on se ramène au nombre d'animaux ce taux est compris entre 25 et 5 animaux positifs sur 135 animaux le 26/6 ; entre 8 et 40 sur 145 animaux le 3 juillet. Ensuite les pools d'animaux baillants sont tous négatifs (tableau 6).

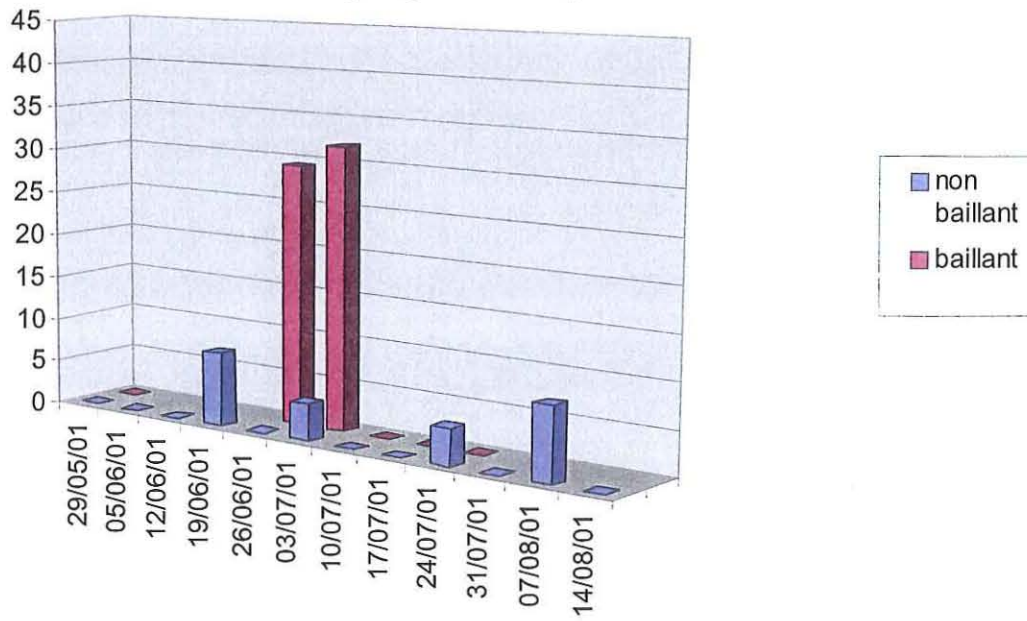
#### **Comparaison des résultats de PCR obtenus sur des animaux baillants et non baillants**

La différence des taux de positifs entre des pools non baillants et baillants, pris à la même date, du 26 Juin au 10 juillet montre une différence de % entre ces deux populations (tableau 6, fig. n°17).

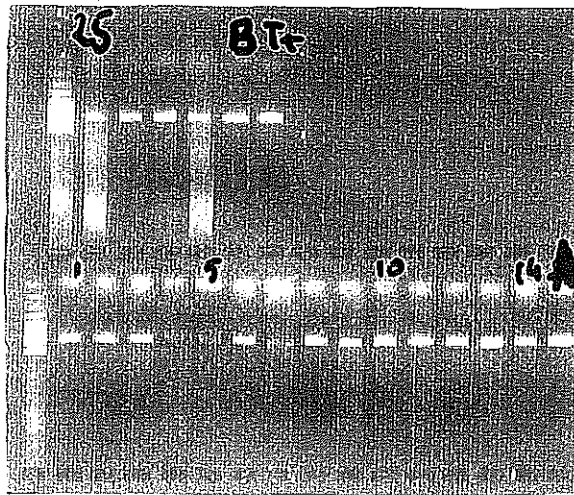
#### **Effet du site et de la poche sur la détection par PCR**

Au cours du suivi des huîtres non baillantes, il a été observé une répartition aléatoire des détections sur le plan spatial. En effet, les poches positives ne l'ont été qu'une seule fois (P2, P4, P5, P7, P9). Au niveau des concessions, le même phénomène a été observé: la concession A est positive une seule fois, la concession B, 2 fois, comme la concession C, tandis que la concession D n'a pas été trouvée positive. Les concessions C et D étant les plus

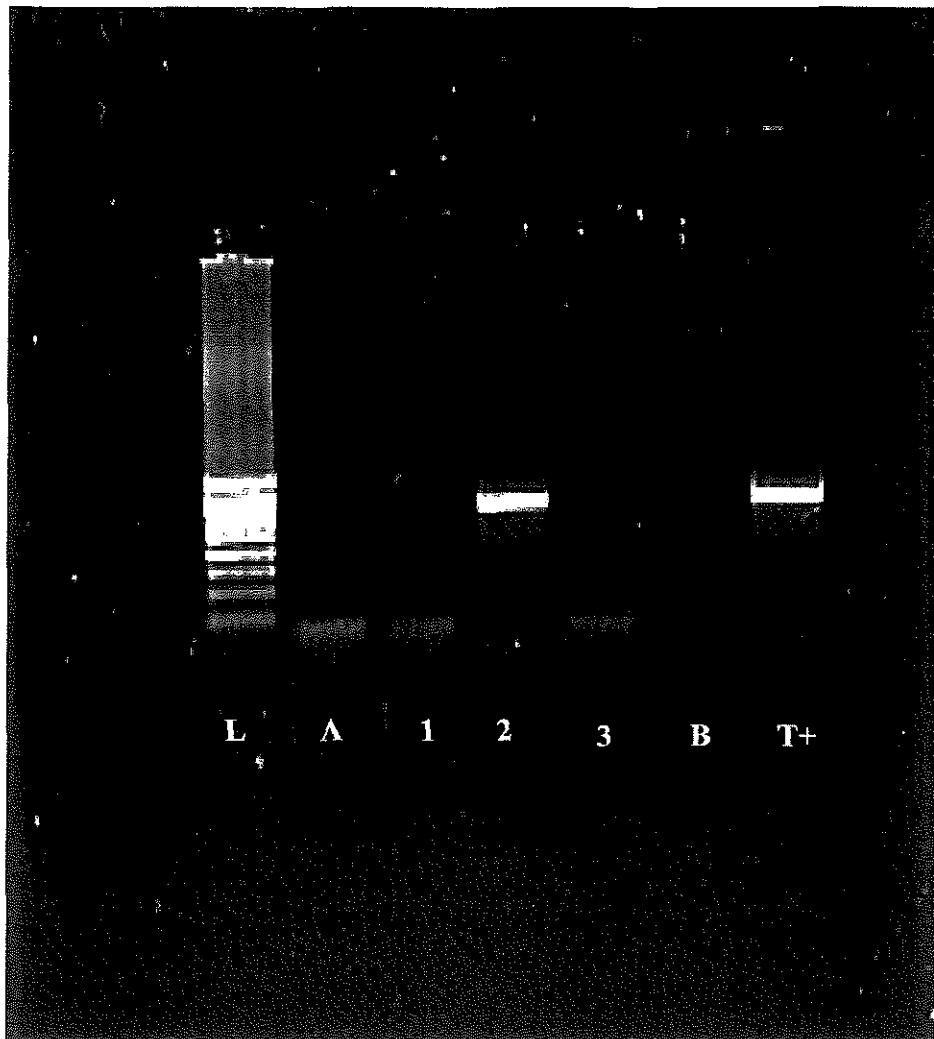
**% de pools positifs (détection PCR sur les 12 poches de captage naturel).**



**Figure n°17 :** Pourcentage de pools positifs sur les 12 poches de captage naturel. Comparaison entre les populations baillantes et non baillantes.



**Photo 6:** Electrophorèse suite à une PCR visant à détecter les inhibitions de réaction.



**L : Ladder = Marqueur de taille**

**A et B : Témoins négatifs**

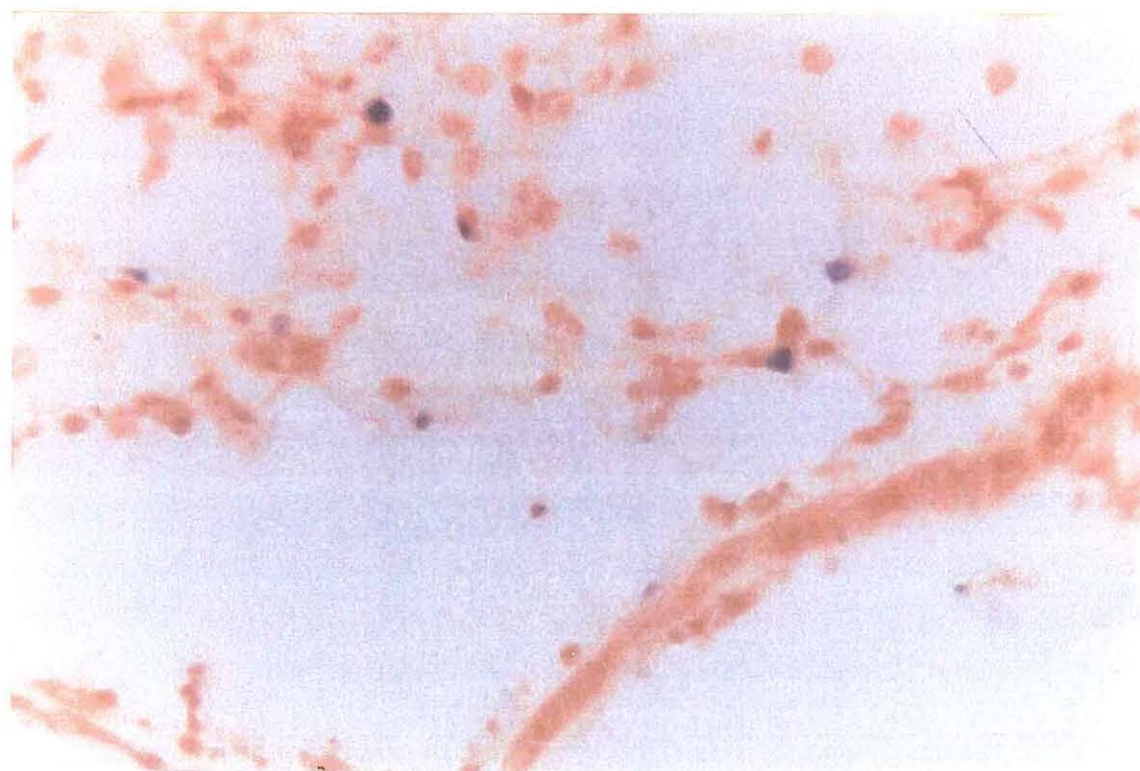
**1, 2 et 3 : Echantillons**

**Interprétation : Les témoins négatifs sont négatifs, et le témoin positif est positif. Les échantillons 1 et 3 sont négatifs, et l'échantillon 2 est positif.**

**Photo n°7:** Photo d'une électrophorèse suite à une PCR visant à détecter l'ADN de virus de type herpès.



**Photo 8:** Visualisation microscopique d'une infection virale de type Herpès.  
(Grossissement: x100)



**Photo 8:** Visualisation microscopique d'une infection virale de type Herpès.  
(Grossissement: x1000)

profondes, elles ont été analysées en moyenne deux fois moins. Il n'y a donc pas d'effet visible du niveau d'exondation sur la détection du virus Herpès.

### Comparaison des résultats de PCR et d'HIS

Les photographies 8 et 9 indiquent un exemple de résultat positif obtenu par HIS.

La comparaison des résultats obtenus par la technique de PCR et de l'Hybridation In Situ sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau n°7). Globalement les résultats semblent concorder : les lots positifs par PCR sont positifs par HIS. Le taux de prévalence calculé pour chacune des deux techniques présente des pourcentages proches. On estime que la différence entre les résultats obtenus par ces deux techniques est faible, sur les échantillons analysés.

Dates	Poche	PCR+	HIS +	Pourcentage théorique PCR	Pourcentage théorique HIS
5 Juin	P2	0/2	3/20	0 %	15 %
19 Juin	P5	1/7	1/20	14 %	5 %
	P9	2/6	4/20	33 %	20 %
26 Juin	P2	0/10	1/20	0 %	5 %
	P3	0/2	0/20	0 %	0 %

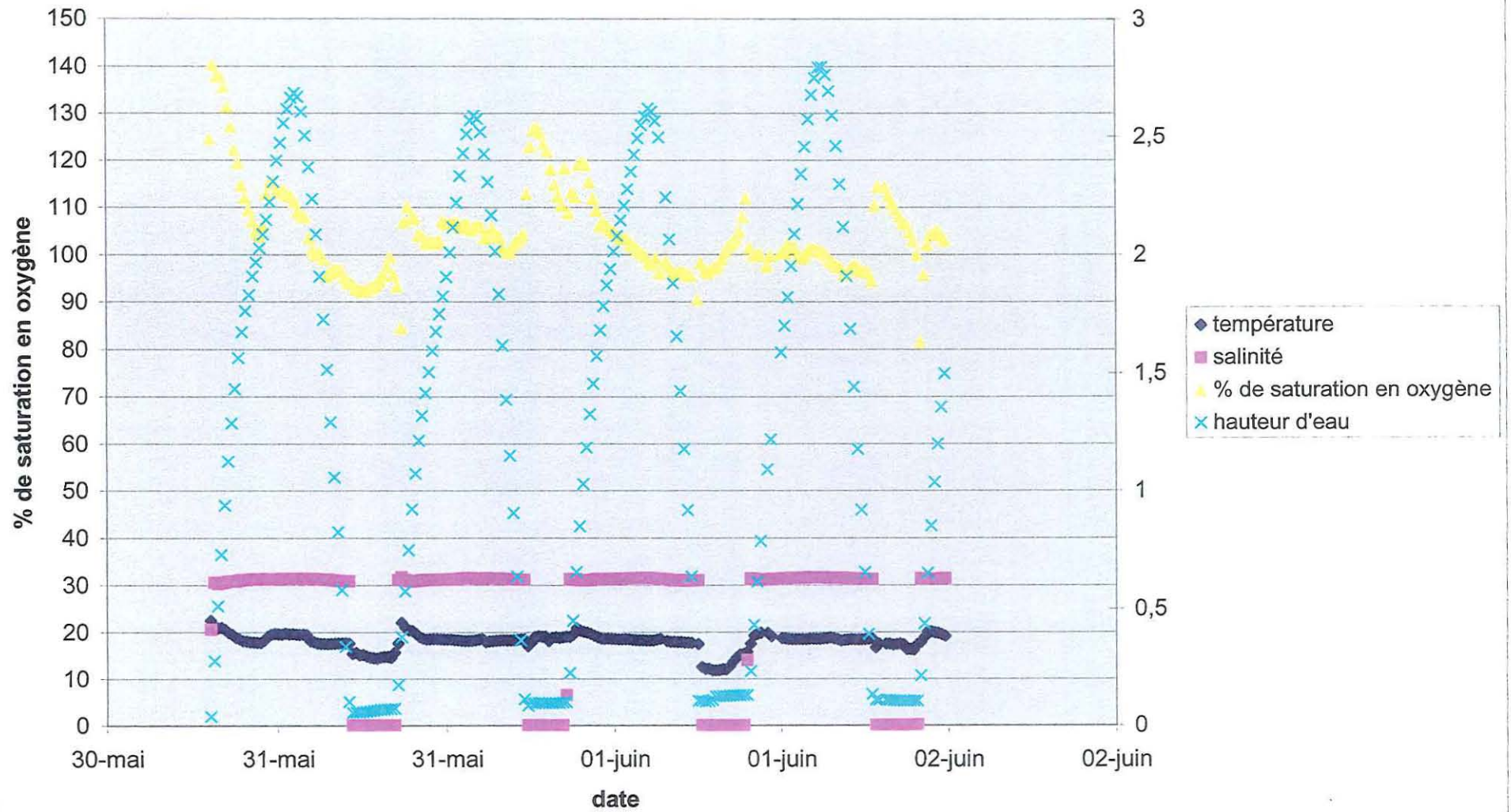
**Tableau n°7 :** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par PCR et HIS dans le cadre de la détection du virus type herpès sur des animaux non baillants.

### 3.4. Résultats des facteurs environnementaux

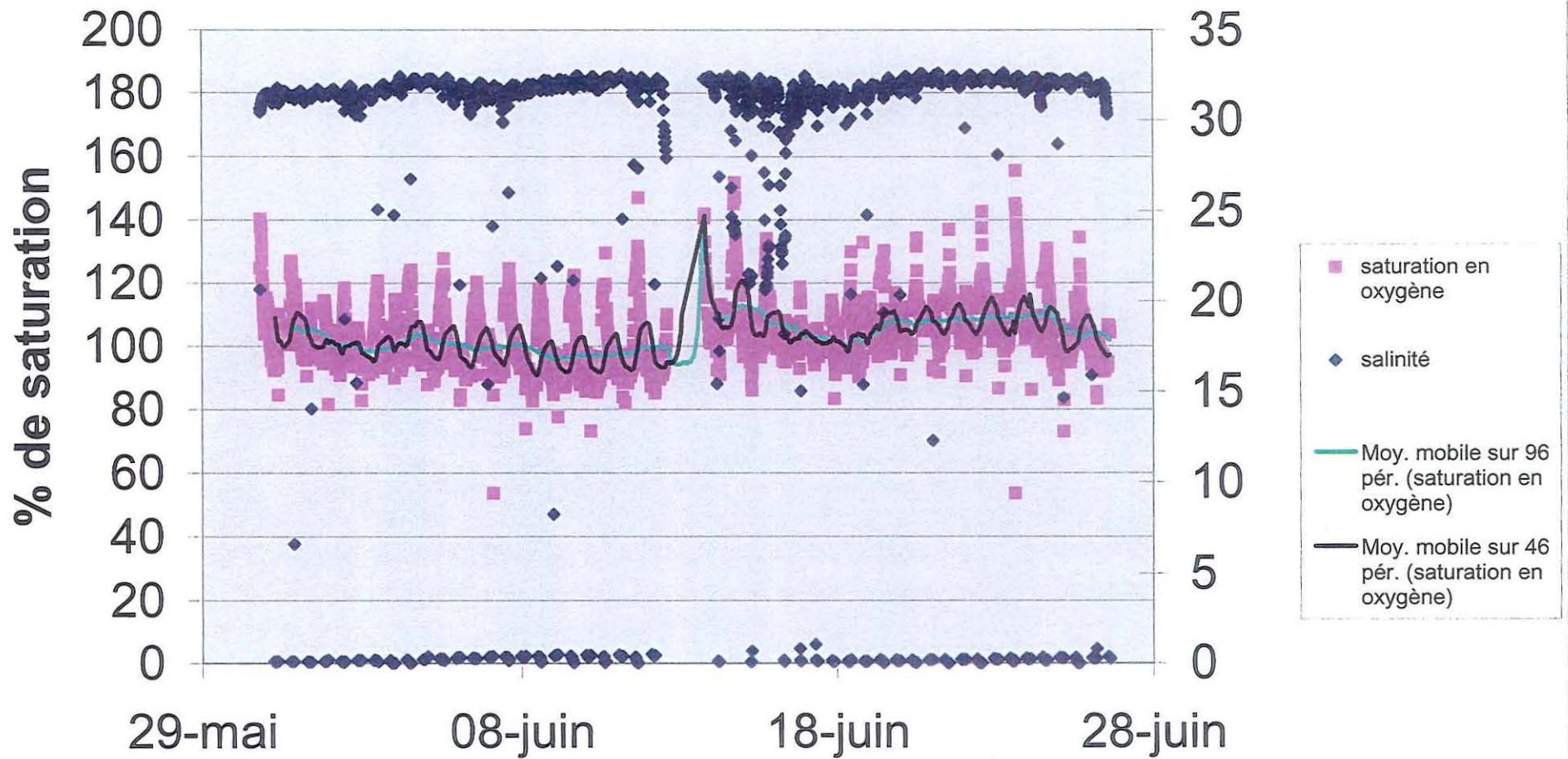
#### Effet de la salinité et de l'oxygène

La figure n°18 indique les variations de ces deux paramètres, de la température et de la hauteur d'eau au cours de quelques cycles de marée. Les plus grandes fluctuations du taux de saturation en oxygène et les grandes diminutions de salinité se produisent au moment où la sonde est exondée. Au cours du mois de juin, durant lequel se produisent les mortalités, on n'observe pas globalement de grandes variations du taux de saturation en oxygène, qui en

**Figure 18** : Evolution des paramètres environnementaux sur quelques cycles de marée à Fouras en 2001



**Figure 19** : Evolution de la salinité et de la saturation en oxygène en juin 2001 à fouras





immersion est presque tout le temps maximal, ni de variations de la salinité pouvant expliquer les mortalités observées (figure n°19).

### **Effet de la température**

La comparaison des moyennes mobiles des deux séries de température de 2000 et 2001 montrent quelques tendances (figure n°20). Ainsi les températures de 2001 semblent plus élevées qu'en 2000. La moyenne mobile de la sonde mise sur une concession qui découvre à un coefficient de 100 se superpose particulièrement bien à celle de la sonde YSI mise à 40 (carte 1). Du 19 juin à fin juin, période qui correspond aux mortalités observées en 2001, la moyenne mobile et les températures de l'eau dépassent globalement les 20°C pour la première fois de l'année. En 2000, les plus fortes mortalités du naissain à Fouras se sont produites durant une augmentation similaire des températures début août.

## **4. DISCUSSION**

### **4.1. Les biais de l'échantillonnage**

Bien que les biais aient été réduits au maximum, il subsiste toujours des fluctuations dues à l'échantillonnage au sein de la poche, comme l'ont montré les résultats de mortalité du 7 août. Une des difficultés réside dans le mélange des huîtres de façon homogène et répétable dans le conteneur, d'autre part que le prélèvement devient de moins en moins négligeable.

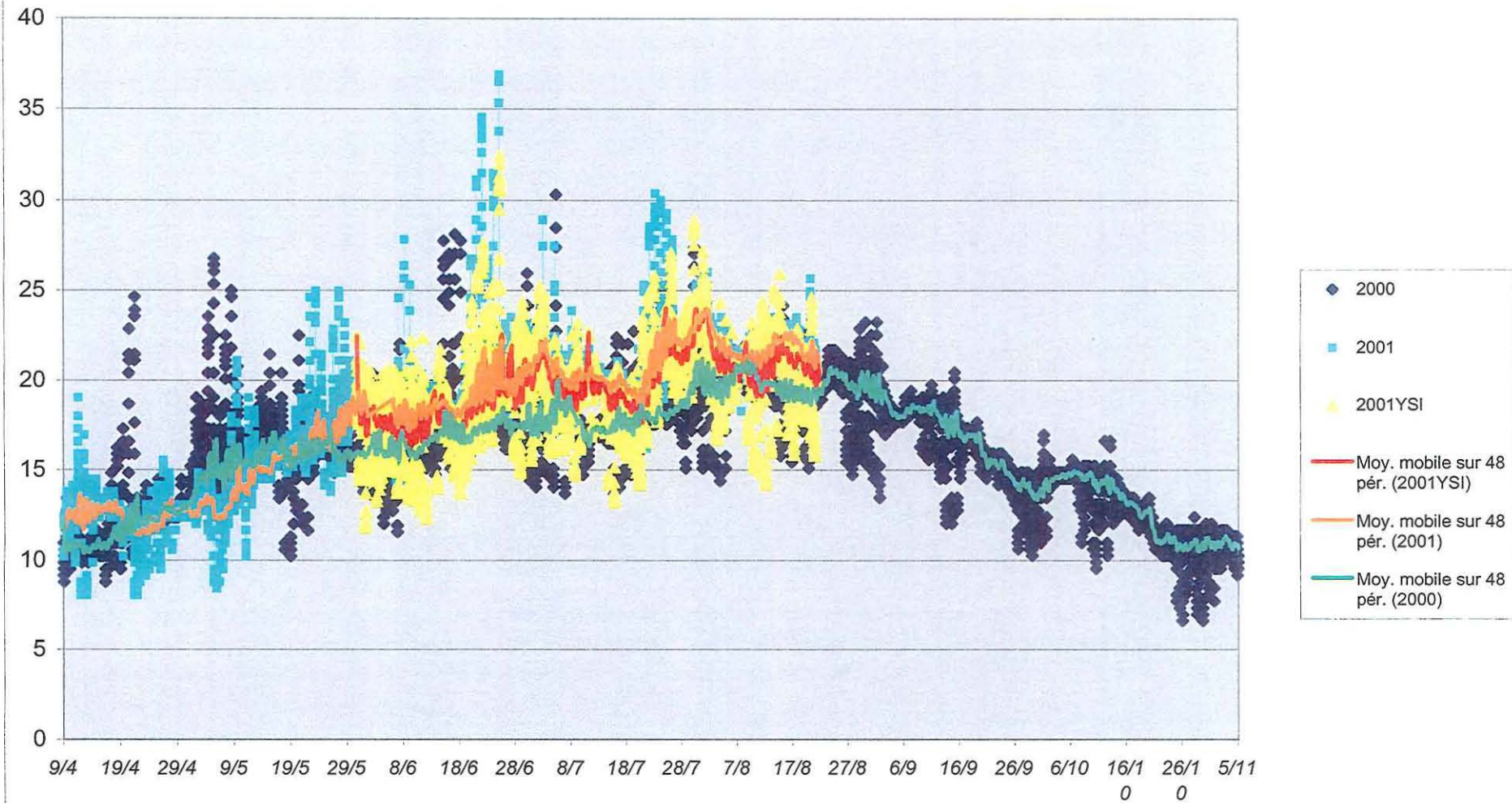
### **4.2. La mortalité sur le site de Fouras**

#### **L'évolution de la mortalité**

La mortalité décrite au cours des mois d'été 2001 apparaît plutôt que les années antérieures (Allard, 1998 et Raude, 1999) et avec un taux relativement plus fort.

En effet, dès le 19 juin on peut enregistrer les premières mortalités. Ce phénomène s'intensifie jusqu'au 3 juillet. L'augmentation d'environ 30% en 15 jours de la mortalités du naissain, montre l'existence de mortalités anormales sur Fouras. En outre, le phénomène a été confirmé auprès des professionnels qui ont constaté des mortalités durant la même période.

**Figure 20** : Données de température à Fouras en degrés celsius (données LCPC et LGP de La Tremblade)



## Les fluctuations significatives de la mortalité

Il existe lors du comptage de mortalité au laboratoire certains biais. Des erreurs d'estimation dues au nombre élevé d'huîtres à compter peuvent survenir. De plus la différenciation des critères de mortalités peut entraîner des confusions. En effet un individu peut être évalué comme vivant alors qu'il est rempli de sédiment.

Malgré ces biais, il a été montré une différence de taux de mortalité entre les poches. Cet « effet poche » confirme les résultats des études antérieures (1998 et 1999). Cet « effet poche » n'est plus imputable à la zootechnie ni à la situation géographique de la poche sur la concession. L'hypothèse d'un micro environnement, d'origine non définie (microbisme, charge différente de la poche) serait donc à étudier.

« L'effet concession » paraît moins évident au cours de cette étude, à l'inverse des études antérieures (Allard, 1998 & Raude, 1999). Cet « effet concession » semble donc plus imputable à la zootechnie, à l'historique des lots, qu'à leur position géographique sur le site.

L'effet d'exondation sur la mortalité n'a pas été détecté. A noter que les poches situées dans les zones les plus profondes ont été, en moyenne, deux fois moins manipulées que celles situées aux coefficients faibles.

Les prélèvements toutes les semaines ont permis d'étudier les fluctuations dans le temps. La mortalité apparaît, globalement, simultanément sur toutes les poches. Ce déclenchement peut laisser penser à un déterminisme environnemental.

### 4.3. Explication de la mortalité sur Fouras

#### Lien entre mortalité et présence du virus type herpès

Il existe des biais d'analyse : en effet la PCR ne détecte qu'un fragment d'ADN viral. Ceci ne permet pas de savoir s'il s'agit d'ADN viral ou d'une contamination par un ADN proche contenu dans de l'eau de mer. D'autre part, s'il s'agit bien de l'ADN du virus Herpès au sein d'un virus infectieux. Comme l'analyse est faite sur un pool, on sait pas l'influence du mélange ou de la dilution, et il n'est pas évident de connaître le taux/animal. On ne peut connaître la vraie limite de détection sur ce mélange. Enfin ce n'est pas une technique quantitative et on ne peut connaître le nombre de particules virales présentes. Il n'est pas possible de savoir si on est en phase latente ou exprimée. La PCR ne permet pas de savoir si le virus est dans les tissus . Malgré cela, la concordance avec les résultats de l'HIS, qui permet de visualiser le virus dans les tissus et notamment le noyau est assez encourageante.

L'absence d'inhibition détectée de la PCR est elle aussi, assez encourageante, car elle permet de dire que la présence virale n'a pas été trop sous estimée.

Quel que soit l'outil de diagnostic utilisé (PCR ou HIS), le taux de détection du virus de type herpès reste de manière globale relativement faible. En effet, le maximum de détection, sur des huîtres vivantes, prélevées entre le 19 juin et 3 juillet (date des mortalités), est de l'ordre de 5 % (cf. figure n° ), alors que sur la même période le taux de mortalité dépasse les 35 %.

La comparaison entre les échantillons baillants et non baillants montre davantage de positifs sur les huîtres baillantes : en effet, entre le 19 juin et le 3 juillet, le % moyen de positifs sur des échantillons baillants est de 31% contre 5% sur les échantillons non baillants. En considérant uniquement les analyses effectuées sur des animaux baillants, sur la période du 19 juin au 3 juillet, on peut corréliser la présence du virus herpès avec les pics de mortalité observés durant cette période de forte mortalités. Cependant il était difficile de qualifier la qualité d'un échantillon de chair d'huître plus ou moins en décomposition pour l'analyse. On a mis en évidence la présence du virus (par PCR) dès l'apparition des mortalités (soit à partir du 19 juin 2001), et durant toute la période d'augmentation de celles-ci (du 19 juin au 3 juillet) (cf. figure mort instantanée : ). Le virus précède parfois et accompagne les mortalités (critère 3) (cf. graph. % baillant).

La technique d'Hybridation in situ semble permettre une détection comparable à celle effectuée par PCR. De plus, elle permet de décrire l'état de l'infestation des tissus de l'individu. En effet, ce développement du virus peut être envisager comme un critère de causalité à considérer (Thébault, 2001). Malheureusement, les résultats obtenus par HIS sont encore partiels et peu nombreux car la technique est en effet longue et encore délicate à mettre en place.

Dans le cadre de cette étude des mortalités estivales à Fouras, on peut donc conclure que, soit ce virus n'explique qu'une partie des mortalités, soit qu'il n'est qu'un révélateur de l'état de faiblesse des animaux en période estivale, soit que le virus herpès évolue à une échelle inférieure à la semaine empêchant ainsi sa détection systématique durant les mortalités observées avec un pas de temps d'une semaine.

### **Lien entre les paramètres physiques du milieu et la mortalité**

L'oxygène et la salinité ne semblent pas, à première vue, à retenir comme des facteurs dont les variations expliqueraient les mortalités estivales de naissain à Fouras. Les fluctuations de

la température de l'eau et de l'air semblent plus informatives. Ainsi, le temps d'exondation ne paraissant pas être à l'origine des mortalités, la température de l'eau pourrait donc être le paramètre déterminant de celles-ci. En effet, la hausse des mortalités se fait parallèlement à l'augmentation des températures (les mortalités démarrent quand la température de l'eau excède les 21°C). Ces résultats corroborent des observations antérieures sur le site d'Arcachon (Maurer *et al.*, 1986). Afin de valider cette hypothèse, il faudrait comparer davantage de séries de températures et les comparer aux mortalités estivales (sur différents sites).

D'autres facteurs importants comme la maturation gamétique, l'état des réserves sont essentielles dans la compréhension de ces phénomènes de mortalité. Malheureusement nous n'avons pas encore les résultats des études menées sur ces autres facteurs.

## CONCLUSION

Le problème des mortalités estivales de naissain de *Crassostrea gigas* est relativement ancien, mais varie en importance d'une année sur l'autre ainsi que d'un site à un autre.

Cette année, les études sur Fouras des mortalités estivales de naissain ont pu être plus complètes. Le dispositif ne permettait pas de rendre compte de l'importance des facteurs zootechniques mais a permis d'étudier beaucoup d'autres facteurs. Le pas de l'étude, réduit à une semaine, a permis de mieux cerner la période des mortalités, et de disposer d'animaux moribonds. Ainsi, on a pu montrer que les mortalités étaient relativement simultanées, plus élevées que les années précédentes et qu'elles avaient eu lieu entre le 19 et le 3 juillet.

Le diagnostic du virus Herpes a été fait par deux techniques différentes, mais qui en première approximation donnent des résultats assez proches. Si la détection du virus correspond à la mortalité, les taux observés n'expliquent qu'une partie des mortalités rencontrées.

Parmi les facteurs environnementaux, on retiendra que le temps d'exondation, les variations de la saturation en oxygène et les variations de salinité n'ont pas expliqué les mortalités sur la période étudiée à Fouras. Par contre l'évolution des températures semble être un facteur essentiel à retenir, et devra donc être confirmé par de nouvelles études.

La connaissance des résultats des études menées dans le cadre du programme MOREST apportera sans doute de nouveaux éléments essentiels dans la compréhension des mortalités estivales de naissain. Egalement, une approche de l'impact de la zootechnie sur les mortalités pourrait compléter les différentes études menées.

Enfin, il faudra être prudent quant à l'extrapolation des conclusions obtenues à d'autres bassins ainsi qu'à d'autres années.

## BIBLIOGRAPHIE

**ALLARD G.**, 1998. Etude des mortalités estivales du naissain en poche à Fouras. Rapport de licence de la Rochelle 20 p.

**ARZUL I.**, Renalt T., Lipart C., and Andrew J. Davidson. (2001). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of general virology* . 82, 000-000. Sous press.

**BODOY A.**, Garnier J., Razet & Geairon 1988. Mass mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) during spring 1988 in the bay of Marennes d'Oléron, related to environmental conditions. *Cons. Inter. Exp. Mer*, Ref E+F. 26 p.

**BOWER SM**, **MCGLADDERY SE**, **PRICE IM**. (1994) Synopsis of diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 199p.

**COMPS M.**, Bonami JR, Vago C. & Campillo A., 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 282 :1991-1993

**ERNANDE B.**, Boudry P., Heurtebise S., Haure J., Martin JL (in press). Genetic basis of growth, survival and their plasticity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Actes du colloque « AQUA2000 », Nice 2-6 Mai 2000.

**GABBOTT P.A.**, 1975. Storage cycle in marine molluscs : an hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Marine Biology*.

**GERARD A.**, **NACIRI-GRAVEN Y.**, **BOUDRY P.**, **LAUNAY S.**, **HEURTEBISE C.**, **LEDU C.** et **PHELIPOT P.**, 1995. Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relation entre reproduction et génétique. La reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France, Nantes, 14-15 Nov 1995. Rapport IFREMER.

**GLUDE J.B.**, 1975. A summary report of the Pacific Coast oyster mortality investigations 1965-1972. Proc. Third U.S-Japan Meeting Aquaculture at Tokyo, Japan, October 15- 16, 1974 : 1-2

**GOULLETQUER P.**, 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thèse , Université de Bretagne Occidentale.

**GOULLETQUER** Pet Héral M, 1997. Marine molluscan production trends in France : from fisheries to aquaculture. US Dep Commer, NMFS, 129, 137-164.

**GOULLETQUER P.**, Soletchnik P. Le Moine O., Razet D., 1998. Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes d'Oléron.

**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 juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix. Dis. Aquat. Org., sous presse.

**LE DEUFF R.M.**, Nicolas J.L., Renault T. & Cochenec N., 1994. Experimental transmission of herpes like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull Eur Ass Fish Pathol 14. 64-66.

**LE DEUFF, R.M.**, (1995). Contribution à l'étude de virus de mollusque marins apparentés aux Iridoviridae et aux Herpèsviridae. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux II, 389,1-234.

**LE DEUFF, R.M.**, Renault T., Gerard A., (1996) Effects of temperature on herpes like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Disease of Aquatic organisms 24(2), 149-157

**LE DEUFF R.M.**, Renault T., (1999). Purification and partial genome characterisation of a herpes like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of general Virology, (80), 1317-1322



**LEITCH AR, SHWARZACHER T, JACKSON D, LEITCH IJ**, 1994. In situ Hybridization . Bios scientific publishers, Oxford, UK, 117p.

**LUBET P.**, 1959. Recherche sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. Rev. Trav. Inst. Pêches maritimes, 23(4), 412-434.

**MANN**, 1979. Some biochemical and physiological aspect of growth and gametogenesis on *C. gigas* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Ass. UK, 59,95110.

**MAURER. D, COMPS.M, HIS E** (1986), Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon, Haliotis, 15, 309317.

**NICOLAS J. L., COMPS M. et COCHENNEC N.**, 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., n° 12, p. 11 à 13.

**Office National des Epizooties** (1997). Manuel de diagnostic des maladies des animaux aquatiques. OIE. 1-251

**PAJOT R.**, Hennequart F, Trintignac P., (1998). Etude de familles de naissains pour la compréhension de mortalités anormales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapporty SMIDAP, 36p.

**PERDUE J.**, Beattie J. H. & Chow K., 1981. Some relationship between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washignton state. J. Shell. Res., I : 9-16.

**RAUDE M.**, 1999. Etude des mortalités estivales du naissain en poche à Fouras. IFREMER. Rapport de licence de la Rochelle, 29 p.

**REMOUE S.**, 2000. Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin de Marennes d'Oléron (Banc de Ronce-Perquis), IFREMER, mémoire de DESS d'écologie d'Angers, 41 p

**RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.-M. et CHOLLET B., 1994a.** Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.*, n° 14, p. 64 à 66.

**RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.-M. et MAFFART P., 1994b.** Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue Méd. Vét.*, n° 145, p. 735 à 742.

**RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C., CHOLLET B. et HAFFNER P., 1997.** Programme herpèsvirus : Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade – Mars 1996/février 1997. Note IFREMER.

**RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C., DELSERT C., 2000.** Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oyster in France. *Journal of Virological Methods*, n° 88, p. 41 à 50.

**RENAULT., LIPART C. 2001.** Herpes like detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes.

**SALLENAVE C, 1999.** Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Thèse de doctorat de l'université de Pharmacie de Nantes, 194 p.

**SOLETCHNICK P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P, Gouletquer P, 1999.** Mortalité de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes Oléron : étude de la variabilité spatiales de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat. Liv. Res*, 12, 2, 131-143.

**SOLLEIC G. (2001)** Recherche dans des échantillons d'eau de claires ostréicoles d'ADN de virus type herpès infectant les bivalves marins.

**THEBAULT A.(1999)**, Rapport annuel du réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques marins. 1998 60p.

**THEBAULT A.(2000)**, Rapport annuel du réseau de surveillance zoonitaire des mollusques marins. 1999.70p.

**THEBAULT A. (2001)** Epidémiologie dans le cas de mortalités anormales de coquillages : exemple des coques du Croisic. Thèse vétérinaire. 142 p.

**THEBAULT A (2001)** Bulletin des mortalités estivales de juillet 2001. IFREMER. 10 p.

**TOMA B, Dufour B, Sanaa M Benet JJ, Shaw A Moutou F., Louza A.** 200 Epidémiologie appliquée. 2<sup>nd</sup> ed. AEEMA, Maison Alfort, 696 p.

**WAECHTER M.(2001).** Recherche et identification de bactéries pathogènes au sein d'une éclosion nurserie d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'Université de La Rochelle. 211p.

# ANNEXES

## Annexe 1

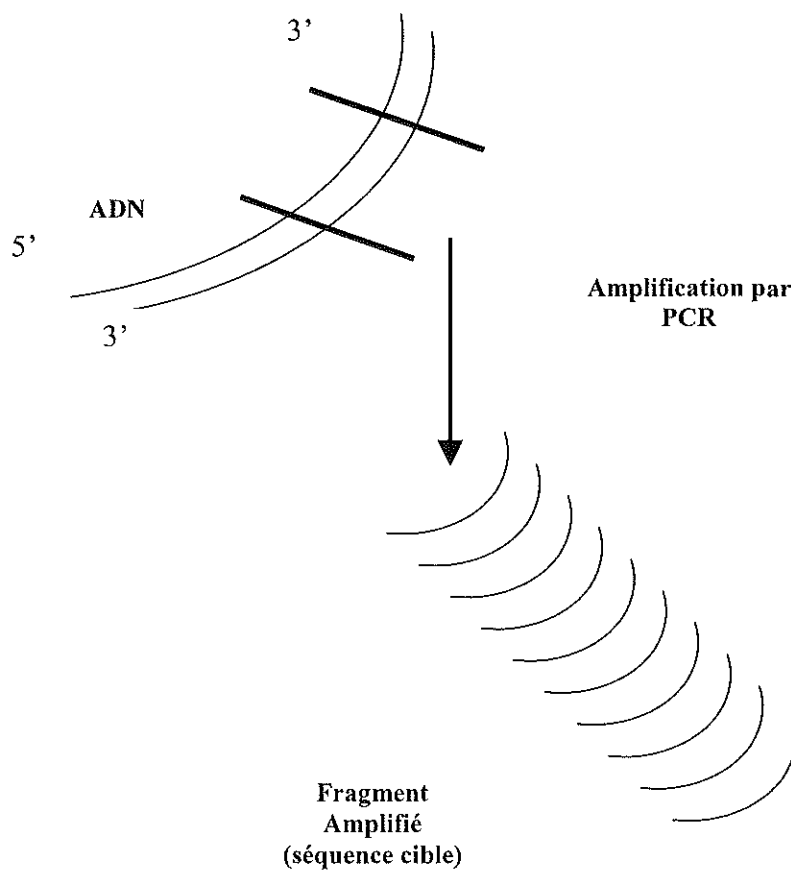
# Principe de la PCR POLYMERASE CHAIN REACTION

### RAPPELS SUR LA STRUCTURE DE L'ADN :

**ADN :** Acide Désoxyribo Nucléique, composé de deux chaînes complémentaires antiparallèles de nucléotides (A, T, G, C), formant une double hélice. Les brins d'ADN sont orientés.

### DEFINITION :

La PCR est une réaction enzymatique de polymérisation de l'ADN. La réaction d'amplification est obtenue par plusieurs cycles de polymérisation.



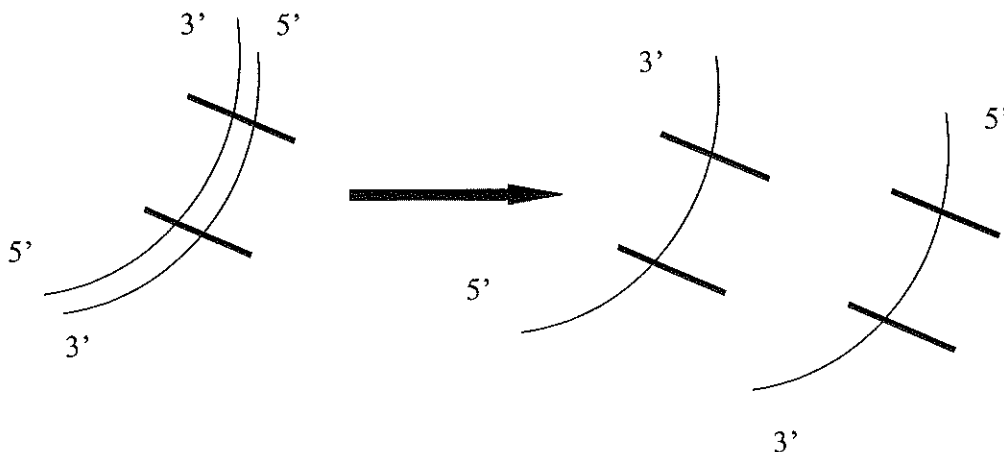
## CYCLES DE PCR :

La PCR est une succession de nombreux cycles (environ une trentaine), composés de trois étapes :

- Une étape de dénaturation
- Une étape d'hybridation
- Une étape d'allongement

## ETAPE DE DENATURATION

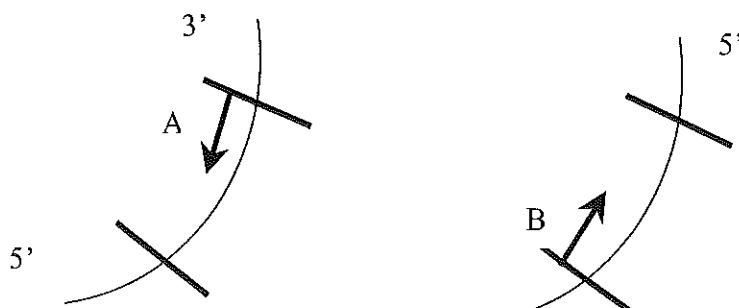
Dénaturation à 94°C pendant 1 minute. A cette température, les deux brins de l'ADN bicaténaire se séparent donnant naissance à de l'Adn monocaténaire. Ce dernier servira alors de séquence cible aux amorces spécifiques et de matrice pour l'amplification..



## ETAPE D'HYBRIDATION

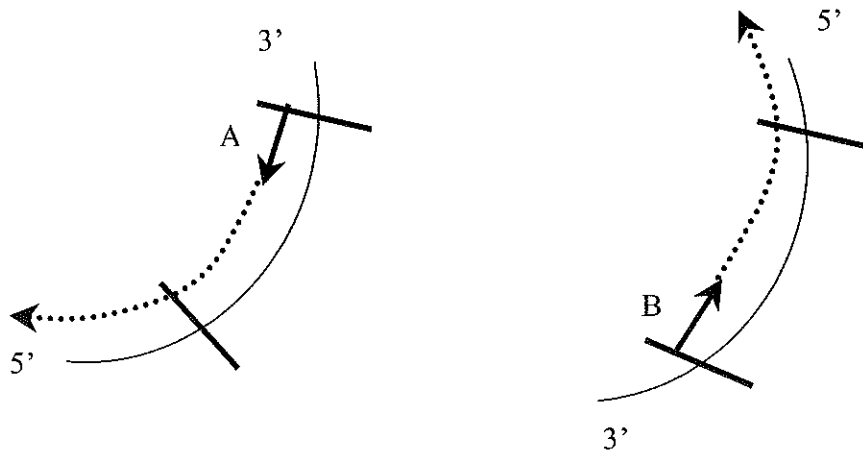
Une minute à 50°C. La température est déterminée d'après la formule empirique «  $T_m$  (°C)-5°C », le  $T_m$  étant calculé à partir du pourcentage de GC. L'hybridation des amorces se fait de façon spécifique sur l'ADN matrice simple brin, de part et d'autre de la séquence cible à amplifier.

Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie, qui servent de point de départ à l'amplification. Les amorces sont ajoutées en excès au milieu réactionnel, permettant une saturation des sites cibles spécifiques. De petite taille, elles s'hybrident sur la séquence d'Adn cible beaucoup plus vite que les brins d'ADN cible entre eux.



## ETAPE D'ELONGATION

L'élongation se déroule à 72°C pendant 1 minute. Il s'agit d'un allongement des amorces hybridées par polymérisation, grâce à l'action d'une enzyme, la Taq polymérase, qui est une ADN polymérase thermorésistante. Cette enzyme polymérise à partir de l'extrémité 3' des amorces. Elle prend pour matrice le brin d'ADN sur lequel est hybridée l'amorce et polymérise un brin d'ADN de séquence complémentaire.



Ce cycle peut être répété une trentaine de fois sans modifier le mélange réactionnel. Au-delà, la Taq polymérase perd de son activité à cause des étapes répétées de dénaturation de l'Adn. Une diminution du rendement de produit de PCR est observée au fur et à mesure des cycles. Cependant, le rendement est approché en théorie par la valeur de  $2^n$  (n éprenant pour valeur le nombre de cycles).

L'ADN amplifié est ensuite visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose additionné de BET (Bromure d'Ethidium). Le BET est un agent intercalant, c'est à dire qu'il peut s'intégrer entre les bases de l'ADN. Il prend une coloration violet fluorescent sous UV, ce qui permet alors de visualiser l'ADN amplifié. Si les produits d'amplification sont en quantité suffisante, ils apparaissent sous la forme d'une bande violet fluorescent. Afin de déterminer la taille de ces produits, un marqueur de poids moléculaire est également déposé.

## Annexe 2

# PROCOLE DE PCR POUR LA RECHERCHE D'ADN DE VIRUS DE TYPE HERPES CHEZ LE NAISSAIN D'HUITRES.

### I. Préparation des échantillons (salle de préparation des échantillons).

- 1-Echantillons égouttés, congelés dans leur coquille à  $-20^{\circ}\text{C}$  (en sac plastiques ou piluliers identifiés), le plus rapidement possible après prélèvement.
- 2-Conservation de 3 mois maximum au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant analyse en PCR.
- 3-Mettre des gants.
- 4-Ouverture des animaux encore congelés : 30 individus par lot en utilisant une lame de scalpel neuve pour chaque lot.
- 5-Décongelation des animaux dans leur coquille après ouverture.
- 6-Séchage sur papier absorbant jusqu'à ce qu'aucune trace d'humidité ne soit visible.
- 7-Confection des pools de 5 individus en sachet Minigrippe quelque soit leur taille.
- 8-Recongélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  des pools d'animaux.

#### Recommandations :

- Réalisation des broyats dans les 15 jours après congélation.
- Après 3 mois de recongélation, les lots ne doivent plus faire l'objet d'une analyse.

### II. Préparation des broyats (salle de préparation des échantillons).

- 1-Mettre des gants.
- 2-Sortir les sachets Minigrippe du congélateur et les placer sur la glace.
- 3-La technique utilisée est fonction de la catégorie des poids des animaux :

#### ✗ Animaux $\leq$ T12 :

- ⇒ Broyage en tube Eppendorf de 1.5ml.
- tarer les Eppendorf au fur et à mesure de leur utilisation.
- Ouvrir le sac et récupérer les animaux à la pipette Pasteur.
- Peser les animaux.
- Additionner 2X ml d'eau bidistillée pour un poids de Xg.
- Broyer au piston Pellet jusqu'à obtention d'un broyat homogène.

#### ✗ Animaux $>$ T12 :

- ⇒ Broyage au maillet en caoutchouc directement dans les sacs congélations sans ajout d'eau bidistillée.
- Changer de papier absorbant, mis sous les sacs, pour chaque pool (sec).
- Lavage du maillet après chaque pool.
- Peser le sac.
- Récupérer l'ensemble des tissus broyés avec le dos d'une lame de scalpel ;
- Couper un coin du sac avec une lame de scalpel.



- Récupérer 0.5g de broyat dans un tube Eppendorf de 1.5ml.( si autre poids, le mesurer et l'indiquer).
- Changer de lame de scalpel après chaque sac.

✗ Larves :

- ⇒Broyage en tube Eppendorf de 1.5ml.
- Peser les animaux.
- Additionner 1X ml d'eau bidistillée pour un poids de Xg.
- Broyer au piston Pellet jusqu'à obtention d'un broyat homogène.

**Remarque :**

Les tubes Eppendorf sont à conserver sur glace durant cette étape de préparation des broyats.

**III. Préparation des surnageants de broyats ( salle de préparation des échantillons).**

1-Addition d'eau bidistillée.

✗ Animaux ≤ T12 déjà réalisée.

✗ Animaux > T12, **ajouter 2X ml d'eau pour Xg de tissus pesés.**

, après addition d'eau, vortexer les tubes et les conserver sur place.

✗ Larves, déjà réalisée.

2-Traitement au bain-Marie bouillant pendant 10 min.

3-Mise sur glace.

4-Vortexer.

5-Centrifugation 10 000 trs/min pendant 5 min à 4°C.

6-Récupération du surnageant de broyat ; le volume est fonction de la catégorie de taille des animaux :

✗ Animaux ≤ T12, récupération d'un volume de surnageant égale à  $1/10^{\text{ème}}$  du volume d'eau bidistillée ajoutée pour réaliser le broyat et dilution immédiate au  $1/10^{\text{ème}}$ . (exemple : 100µl d'eau ajoutée pour réaliser le broyat ↔ récupérer 10µl de surnageant et le reprendre dans 90µl d'eau bidistillée).

✗ Animaux > T12, récupération de 100µl de surnageant de broyats dilués immédiatement dans 900µl d'eau bidistillée.

7-Vortexer les dilutions de surnageant.

8-Congélation immédiate.

**Recommandations :**

-Congélation à -80°C, si possible plutôt qu'à -20°C.

-Réaliser les analyses en PCR dans les 8 jours qui suivent la congélation des dilutions des surnageants.

#### IV. Mise en œuvre de la réaction de PCR (salle de préparation des réactifs et salle des thermocycleurs).

- 1-Mettre des gants.
- 2-Décongélation des échantillons sur la paillasse, puis les conserver sur un portoir dans la glace, dans la pièce où se trouve l'appareil de PCR.
- 3-Retirer les gants.
- 4-Passer dans la pièce de préparation du milieu réactionnel.
- 5-Remettre des gants neufs.
  
- 6-Préparer les tubes pour la PCR, les fermer et les identifier. Les mettre sur le portoir dans la glace.
- 7-Décongeler les réactifs (tampon 10X, MgCl<sub>2</sub>, nucléotides...) dans les mains.
- 8-Préparer le mélange réactionnel pour la PCR dans un Eppendorf ;

⇒ préparation pour un tube (à multiplier n fois pour n tubes) :

- ✓ H<sub>2</sub>O ⇒ 31.5µl.
- ✓ Tampon 10X ⇒ 5µl.
- ✓ DNTPs ⇒ 5µl.
- ✓ MgCl<sub>2</sub> ⇒ 5µl.
- ✓ Amorces (OHV3) ⇒ 1µl.
- ✓ Amorce (OHV114) ⇒ 1µl.
- ✓ Taq ⇒ 0.5µl.

- 9-Distribuer le mélange réactionnel préparé (49µl/tube) avec le même cône à filtre dans les Eppendorf. Laisser les tubes ouverts sur glace.
- 10-Passer les tubes contenant le même mélange réactionnel dans la pièce où se trouve le thermocycleur et les échantillons.
- 11-Mettre en route le thermocycleur afin de préchauffer le couvercle.
- 12-Distribuer 1µl d'échantillon et des différents témoins dans les tubes contenant les 49µl de mélange réactionnel, fermer les tubes au fur et à mesure de l'addition des échantillons. Les tubes contenant les échantillons sont vortexés avant de prélever 1µl.
- 13-Centrifuger (10s sur centrifugeuse de paillasse) les tubes de PCR.
- 14-Placer les tubes dans le thermocycleur.
- 15-Mettre en route le programme de PCR choisi.

#### Recommandations :

- Les quantités des produits entrant dans la composition du mix sont valables uniquement avec les produits livrés avec la Taq « Goldstar ».
- laisser ouvert, durant toute l'étape de distribution des échantillons, les tubes d'eau bidistillée utilisés pour les témoins négatifs (contrôle de la contamination ambiante sur la paillasse).
- Incorporer lors de la PCR :
  - des témoins négatifs (eau bidistillée) dans le premier tube et entre chaque lot.
  - des témoins positifs (2500 et 5.10<sup>7</sup> copies), dans les deux derniers tubes.
- utiliser un Pipetman P20 pour distribuer les échantillons (1µl) en PCR.

## V. Analyse des produits de PCR en gel d'agarose (salle des thermocycleurs).

1-Récupération des tubes de PCR le lendemain matin et les placer au réfrigérateur.

2-Couler un gel d'agarose 1% contenant du BET.

-peser 2g d'agarose.

-mélanger à 200ml de TEAE 1X.

-Fondre 2min au micro-onde.

-Rajouter 10 $\mu$ l de BET.

3-Déposer des gouttes (2 $\mu$ l avec une P20) de tampon de dépôts (bleu de charge) sur un parafilm.

4-Ajouter 10 $\mu$ l d'échantillon (produit de PCR) par goutte de tampon de dépôt.

5-Mélanger l'échantillon et reprendre la totalité de la goutte.

6-Déposer le volume total (environ 12 $\mu$ l) par puits.

-Incorporer dans le premier puits de chaque ligne, un marqueur de poids moléculaire.

7-Migration 150 volts, 600 mA (attendre que les deux bandes de bleu soient distantes d'au moins 2cm).

8-Lecture à la table UV :

-Témoin négatif : négatif.

-Témoins positifs (2500 et 5.10<sup>7</sup> copies) : positifs.



Si ces témoins ne donnent pas le résultat attendu, l'interprétation n'est pas possible.

## Annexe 3

### Programme HERPES 4

- 2 minutes à 94°C
- 35 cycles de :
  - 1 minute à 94°C (ouverture des 2 brins)
  - 1 minute à 50°C (hybridation)
  - 1 minute à 72°C (élongation)
- 5 minutes à 72°C
- Conservation des échantillons à 4°C

## Annexe 4

### MIX PCR POUR UN ECHANTILLON

#### GOLDSTAR

mix PCR pour 1 tube

H <sub>2</sub> O	31,5	μL
MgCl <sub>2</sub>	5	μL
Tp 10X	5	μL
d NTPs	5	μL
Amorce OHV3	1	μL
Amorce OHV114	1	μL
Taq	0,5	μL

#### SILVERSTAR

mix PCR pour 1 tube

H <sub>2</sub> O	35,9	μL
MgCl <sub>2</sub>	1	μL
Tp 10X	5	μL
d NTPs	5	μL
Amorce OHV3	1	μL
Amorce OHV114	1	μL
Taq	0,1	μL

## Annexe 5

### ENZYMES UTILISEES POUR LES REACTIONS DE PCR

# GoldStar™

## DNA Polymerase\*

Licensed for PCR

**Lot Nb.:** L027/G01-8      **Exp. Date:** 06/2002  
**Quantity:** 500 U      **Conc.:** 5 U/μl  
**Reference :** ME-0064-05

**Source** Purified from an *E. coli* strain which carries a *Thermus* species (new strain) DNA polymerase overproducing plasmid

**Analysis conditions** 25 mM TAPS, pH 9.3 (at 25°C); 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM β-mercaptoethanol; 250 μM each dCTP, dGTP, dTTP : 250 μM (<sup>3</sup>H) dATP (0.05 Ci/mmol); activated salmon sperm DNA (1.25 μg/μl); total volume of 50 μl.

**Storage & Dilution buffer** 50 % glycerol, 20mM Tris HCl (pH8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40

**Reaction Buffer (10x)** Vial 1 (1.25 ml): 750 mM Tris-HCl pH 8.8 (at 25°C), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20. Without MgCl<sub>2</sub>  
Vial 2 (1.25 ml): 25 mM MgCl<sub>2</sub>

**Associated activities** The enzyme has 5' → 3' polymerisation-dependent exonuclease replacement activity but lacks a 3' → 5' exonuclease activity. The enzyme has the "extendase activity", allowing TA cloning.

\* The marked (\*) products are manufactured and sold under licensing arrangements with F. Hoffmann-La Roche Ltd, Roche Molecular Systems, Inc. and The Perkin-Elmer Corp. Purchase of these products is accompanied by a limited license to use them in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, i.e. an authorised thermal cycler.



E U R O G E N T E C

ECT GROUP

Parc Scientifique du Sart Tilman  
4102 SERAING - BELGIUM  
Tel. +32 4 366 01 50 - Fax. +32 4 365 51 03

## Annexe 5

### ENZYMES UTILISEES POUR LES REACTIONS DE PCR

# SilverStar™

## DNA Polymerase\*

Licensed for PCR

**Lot Nb:.** BT-101A                      **Exp. Date:** 10/2002  
**Quantity:** 500 U                      **Conc.:** 5 U/μl  
**Reference :** ME-0074-05

**Source** SilverStar™ is a high-performance thermostable DNA polymerase, isolated from *Thermus aquaticus* YT-1 as described by Kaledin (1).

**Product description** It has outstanding activity, making it one of the best-value polymerases available. This robust enzyme produces excellent yields in primer extension and other molecular-biological applications. It is specially purified to remove traces of DNA that can interfere with some reactions. SilverStar™ is supplied with 10x NH<sub>4</sub>-based reaction buffer, giving superior results with minimal background, and a separate solution of 50mM MgCl<sub>2</sub>, which permits tailor-made reaction conditions.

**Unit definition** One unit is defined as the amount of enzyme that incorporates 10 nmoles of dNTPs into acid-insoluble form in 30 minutes at 72 °C under the following assay conditions: 25 mM TAPS (tris-[hydroxymethyl]methyl-amino-propanesulphonic acid, sodium salt), pH 9.3 at 25 °C, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM β-mercaptoethanol, 200 μM of each dATP, dGTP, dTTP, 100 μM dCTP (a mix of unlabelled and g-[32P]-labelled) and 12.5 μg activated salmon sperm DNA in a final volume of 50 μl.

**Reaction Buffer (10x)** 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 670 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 0.1% Tween-20. Separate Magnesium Solutions 50 mM MgCl<sub>2</sub>.

**Storage buffer** 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50 % glycerol, 0.1 % Tween-20.

**Quality control tests** Activity, non-specific endonucleases/nickase, exonucleases

**Storage Conditions** SilverStar™ will remain stable at -20 °C in a constant temperature freezer (1) Kaledin, A.S., et al (1980) Biokhimiya 45, 494.

## Annexe 6

## LES AMORCES UTILISEES POUR LES REACTIONS DE PCR

## FICHE TECHNIQUE

OliGold

717542

Client

Lieu F-17390 LA TREMBLADE

Réf client	Echantillon N°	Echelle de synthèse	Chimie	Bases		
OHV3	278132K1	40 nmol	ADN	20		
Séquence	5'-GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'					
Composition	A 3	C 5	G 4	T 8	Autres 0	Mixte 0
N. modification					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	45.00 %	Coefficient d'extinction	180000 l/(mol cm)
MM	6074 g/mol	Quantité µg	514 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	58.0 °C	nmoles	85 nmol
Tm (% GC)	44.6 °C	unités DO	15 OD
Date de purification	29/05/1997		

Mise en solution	Centrifuger peu de temps pour s'assurer que l'ensemble du produit lyophilisé est au fond du tube. Reconstituer dans un tampon TE ou de l'eau distillée à concentration appropriée pour l'usage attendu.
Commentaires généraux	Tm % GC calculé avec 50 mM NaCl et 0 % formamide (conditions PCR)
Condition de stockage	à 4° C sous forme lyophilisé, à -20° C dans un tampon TE, pH = 8 dans l'eau.
Commentaires spécifiques	



## Annexe 6

## LES AMORCES UTILISEES POUR LES REACTIONS DE PCR

EUROGENTEC Bel S.A.

Tél +32 4 366 01 50 Fax +32 4 365 51 03

OliGold

## FICHE TECHNIQUE

908923

Client

Lieu F- 17390 LA Tremblade

Réf client	Echantillon N°	Echelle de synthèse	Chimie	Bases		
OHV114	497727J1	40 nmol	ADN	24		
Séquence	5'-CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3'					
Composition	A 7	C 9	G 2	T 6	Autres 0	Mixte 0
Modification					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	45.83 %	Coefficient d'extinction	224000 l/(mol cm)
MM	7217 g/mol	Quantité µg	332 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	70.0 °C	nmoles	46 nmol
Tm (% GC)	50.6 °C	unités DO	10 OD
Date de purification	19/03/1999		

Mise en solution	Centrifuger peu de temps pour s'assurer que l'ensemble du produit lyophilisé est au fond du tube. Reconstituer dans un tampon TE ou de l'eau distillée à concentration appropriée pour l'usage attendu.
Commentaires généraux	Tm % GC calculé avec 50 mM NaCl et 0 % formamide (conditions PCR)
Condition de stockage	à 4° C sous forme lyophilisé, à -20° C dans un tampon TE, pH = 8 dans l'eau.
Commentaires spécifiques	

## Annexe 7

### LES dNTP UTILISES POUR LES REACTIONS DE PCR

diluer 100 dans 900



## dNTP Master Mix

Mix of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5mM Solutions

<b>PRODUCT:</b>	dNTP Master Mix, ready to use			
<b>CATALOGUE #:</b>	NU-0010-10 NU-0010-50 NU-0010-100			
<b>DESCRIPTION:</b>	A mix of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP, (pH 7.0). Each vial contains 20µmol (1 x 1000µl) dNTP Mix ie 5µmol of each. Ready for immediate use.			
<b>TYPICAL ANALYSIS:</b>	Lithium salts, >95% deoxynucleoside triphosphates (HPLC, area %), <2% deoxynucleoside monophosphates and deoxynucleoside diphosphates.			
<b>dNTP CHARACTERISTICS:</b>	<b>Deoxynucleoside</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>Molar Extinction</b>	
	dATP	535.2 1µmol = 15,3	A <sub>260</sub> units	
	dGTP	533.2 1µmol = 13,7	A <sub>252</sub> units	
	dCTP	511.1 1µmol = 9,6	A <sub>272</sub> units	
	dTTP	505.9 1µmol = 8,4	A <sub>260</sub> units	
<b>STORAGE &amp; STABILITY:</b>	Store the Master Mix at -20°C or -70°C, in a constant temperature freezer. Avoid multiple freezing. For long-term usage, aliquoting is recommended.			
<b>BATCH DETAILS:</b>	Cat No:	Pack Size: Conc.	Presentation:	Batch No:
	NU-0010-10	20µmol dNTPs	5mM each dNTP, 1 x 1000µl	see vial
	NU-0010-50	5 x 20µmol dNTPs	5mM each dNTP, 5 x 1000µl	see vial
	NU-0010-100	10 x 20µmol dNTPs	5mM each dNTP, 10 x 1000µl	see vial
<b>APPLICATION:</b>	For direct use in DNA synthesis <i>in vitro</i> . Add the Master Mix directly into the reaction mixture as follows. For primer extension technology, add 4µl of dNTP Mix in a total 100µl reaction volume to give a final concentration of 200µM of each dNTP.			

## Annexe 8

### Le Marqueur de taille (Ladder)



## SmartLadder SF

DATA SHEET

The SmartLadder SF is a ready-to-use molecular weight marker, specially designed for easy quantification as well as size determination of short fragments (PCR-fragments). The SmartLadder SF contains 200 lanes.

**Reference:** 200 lanes (MW-1800-02)  
1000 lanes (MW-1800-10)

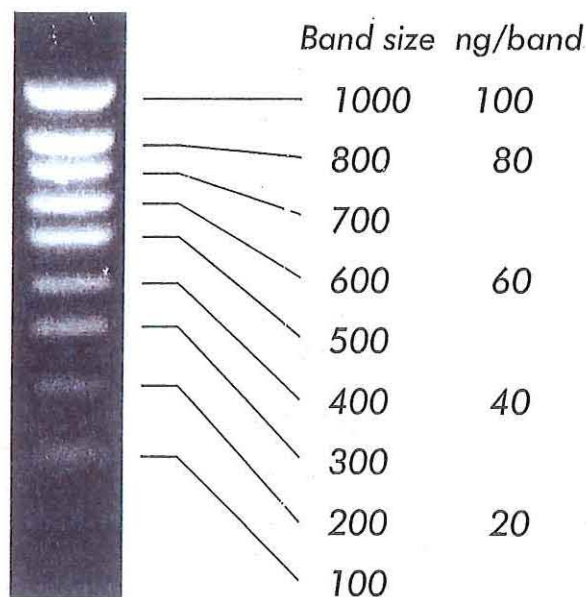
**Sizing:** The SmartLadder SF produces a pattern of 9 regularly spaced bands, ranging from 100 to 1000 bp. All bands have a different intensity this allows a quick and easy identification. To make sizing as smart as possible, the size of each band is an exact multiple of 100 bp.

**Quantification:** Using a standard loading of 5  $\mu$ l, each band correspond to an exact quantity of DNA (see table on reverse side)

**Storage:** The SmartLadder SF can be stored at 4 °C for 6 months. Long term storage should be at -20 °C. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

If you have questions about this or any other Eurogentec product, please contact us at:  
**EUROGENTEC Bel s.a.** - Parc scientifique du Sart Tilman - 4102 Seraing - Belgium.  
Tel. +32 4 366 01 50 - Fax +32 4 365 51 03 - E-mail: [info@eurogentec.be](mailto:info@eurogentec.be)  
Visit our web page <http://www.eurogentec.be>

**Tips:** The loading buffer is a special buffer to insure the stability of the ladder at 4 °C. The blue dye is Bromophenol Blue. If you want to dilute the Smart Ladder for easier gel loading simply add TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA). We propose you to use an equivalent volume of Smart Ladder and 1x TE buffer. With this dilution, you can maintain the quantification by loading 10 instead of 5  $\mu$ l on your gel. The DNA is not dephosphorylated and has first to be dephosphorylated if you want to label it with  $^{32}$ P.



## Annexe 9

### **PROTOCOLE D'HYBRIDATION IN SITU (HIS) POUR LA RECHERCHE D'ADN DE VIRUS DE TYPE HERPES CHEZ LE NAISSAIN D'HUITRES**

Sur lames silanisées.

Les coupes mesurent 7 $\mu$ m, et sont séchées à 37°C.

Xylène: 2 bains de 5 min.

Ethanol 100°: 2 bains de 5 min.

Séchage sous la hotte.

#### **Protéolyse**

200  $\mu$ l de Protéinase K (solution mère à 100 mg/ml à diluer au centième en TBE).

15 min à 37°C.

Ethanol 95°: 1 bain de 1 min.

Ethanol 100°: 1 bain de 1 min.

Séchage sous la hotte.

#### **Pré hybridation**

500  $\mu$ l de Tampon d'hybridation par lame.

1 heure à 42°C.

#### **Hybridation**

Chambres autocollantes sur lames séchées.

Déposer 100 $\mu$ l du mélange Sonde+Mix.

Recouvrir d'une lamelle plastique.

Dénaturer à 95°C pendant 5 min.

Une nuit à 42°C.

Préparer SSC et le conserver à 42°C.

#### **Lavages**

SSC 2X: 2 bains de 5 min (Température ambiante).

SSC 0.4X: 1 bain de 10 min (à 42°C).

#### **Révélation**

Tp Dig1 : 1 bain de 5 min.

Couvrir chaque lame avec 200 $\mu$ l de Tp Dig2 1X.

30 min en chambre humide à température ambiante.

Rincer les lames en Tp Dig1.

Diluer l'Anticorps(Anti Dig-AP) au 1/500 dans du tampon Dig2 1X. 200 $\mu$ l par lame.

1 heure à température ambiante.

Laver par 2 bains en Tp Dig1.

Tp Dig3: 1 bain de 5 min.

Diluer 20 µl de NBT/BCIP dans 1 ml TP Dig3.  
Déposer 100µl par lame.  
Laisser 30 min à l'obscurité.  
Bloquer la réaction avec 1 bain de 5 min de Tp Dig4.

### **Coloration**

Jaune de Bismark: 1 min.  
Ethanol 95°: 1 min.  
Ethanol 100°: 1 min.  
Ethanol 100°: 1 min.  
Xylène: 1 min.

### **Montage de la lamelle**

Utiliser l'Eukitt.

### **Préparation des réactifs pour l'HIS.**

**SSC 20X:** NaCl: 175.3g  
Citrate de Sodium  $C_6H_5O_7Na_3$ : 88.2g  
QSP 800 ml  $H_2O$ , ajuster pH 7 et compléter à 1000ml avec  $H_2O$   
Stocker à T° ambiante

**Tp DIG 1:** Acide maléique: 11.61g  
NaCl 5M: 30ml  
QSP 800ml, ajuster pH 7.5 (NaOH) et compléter à 1000ml avec  $H_2O$   
Auto claver et stocker à T° ambiante

**Tp DIG 2:** Blocking reagent: 1g  
QSP 100ml Tp DIG 1, à chaud (50°C)  
Auto claver et stocker à -20°C

**Tp DIG 3:** Tris 1M pH 8: 50ml  
NaCl 5M: 10ml  
 $MgCl_2$  1M: 2.5ml  
QSP 500ml  $H_2O$ , ajuster pH 9.5  
Auto claver et stocker à T° ambiante

**Tp DIG 4:** Tris 1M pH 8: 5ml  
EDTA 0.5M pH8: 1ml  
QSP 500ml  
Auto claver et stocker à T° ambiante

**Tris 1M:** TrisBase: 121.1g  
QSP 800ml  $H_2O$ , ajuster pH8 et compléter à 1000ml  $H_2O$

**NaCl 5M:** 29.22g  
QSP 100ml  $H_2O$   
Auto claver

**MgCl<sub>2</sub> 1M:** MgCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O: 20.33g  
QSP 100mlH<sub>2</sub>O  
Auto claver

**Denhart 50X:** Ficoll: 5g  
Polyvinyl pyrrolidone: 5g  
BSA: 5g  
QSP 500 ml H<sub>2</sub>O  
Stocker à -20°C

**EDTA 0.5M:** EDTA,2H<sub>2</sub>O: 93.05g  
QSP 400ml H<sub>2</sub>O, ajuster pH8 (NaOH) et compléter à 500ml avec H<sub>2</sub>O  
Auto claver  
Tamponner avec NaOH pendant la dissolution d'EDTA, pour une meilleure dissolution

**Anti-Digoxigenin-AP:** 150U (200µl)

## Annexe 10

### La réalisation des coupes histologiques (pour Hybridation in situ)

Les échantillons subissent trois étapes :

- ↘ Fixation des tissus
- ↘ Inclusion
- ↘ Confection des coupes

#### ① Fixation

Son but est d'immobiliser les structures en conservant une morphologie la plus proche possible de celle à l'état *in vivo*, et d'empêcher la dégradation des tissus. Pour assurer son rôle, le fixateur chimique devra pénétrer rapidement et de façon homogène en respectant le volume de l'échantillon.

Au laboratoire, deux types de fixateur sont utilisés en routine, le Carson et le Davidson (cf. annexe), qui sont respectivement une solution tamponnée et une solution salée de formol. De part sa composition à base d'eau de mer, le Davidson permet une bonne fixation des animaux marins. Le Carson, bien que moins bon fixateur pour les huîtres, permet la récupération des échantillons pour la MET.

La fixation s'effectue sur des pièces de taille inférieure à 1cm, pendant un minimum de 24 heures. Le lavage n'est pas nécessaire car le formaldéhyde est éliminé par l'alcool.

#### ② Inclusion à la paraffine

Elle nécessite 4 opérations successives, dont les 3 premières sont effectuées par un automate à inclusion (sous vide).

⇒ Déshydratation des pièces :

Elle se fait par un traitement à l'éthanol de concentration croissante ; Cette étape est obligatoire car la paraffine n'est pas miscible à l'eau.

⇒ Imprégnation par le solvant :

Le xylène, solvant de la paraffine, va éliminer les traces d'éthanol et faciliter l'imprégnation de la paraffine.

⇒ Imprégnation par la paraffine :

La paraffine à 60°C va pénétrer dans l'échantillon, le transformant en une masse homogène face à la coupe.

⇒ Coulage du bloc :

Il s'effectue dans un moule métallique où la pièce est disposée puis recouverte de paraffine en fusion. Le tout est déposé sur une plaque réfrigérante (cryo-console Miles scientific), facilitant la solidification et le détachement du bloc.

#### ③ Confection des coupes

Les coupes, d'une épaisseur de 7µm, sont effectuées à l'aide du microtome. Le ruban obtenu est disposé à la surface d'un bain-marie à 36°C puis sur une lame histologique.

Enfin, elles sont séchées durant une nuit à l'étuve à 37°C, pour permettre une bonne adhésion de la coupe sur la lame.

## Annexe 11

### Composition du fixateur Davidson

-Pour 5 Litres :

- Eau de mer filtrée .....1760 ml
- Glycérol.....588 ml
- Formol.....440 ml
- Alcool à 95° .....1760 ml
- Acide acétique cristallisable.....455 ml  
(=10% du volume eau+alcool+formol+glycérol)