

Direction DRV-RA
Laboratoire de Génétique et Pathologie

RAS Monique

Juillet-Août 2001

Rapport de stage de Licence de l'Université de La Rochelle

HSJLR 201
RAS-E
OCR 1372
ISN 6654

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

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE



ifremer

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon maître de stage, Anne Thébault, pour sa patience et son aide énorme fourni lors de la réalisation de ce rapport de stage.

Merci à Mickael, mon collègue de travail, pour tous ces broyats qu'on a pu se partager. Et Maeva, merci encore pour tes précieux conseils en bio mol...et en cuisine. Je remercie Bruno de m'avoir jetée dans le bac de décantation,..ma vengeance sera terrible.

Je souhaiterais remercier Tristan Renault pour le temps consacré à m'apprendre la technique HIS.

Isa merci pour les photos de HIS, elles sont magnifiques !

Je remercie tous les gens qui ont fait de ce séjour, au centre Ifremer de la Tremblade ,une expérience enrichissante.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I CONTEXTE DE L'ETUDE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 Mortalités estivales chez *Crassostrea.gigas*

Description des mortalités

Origine des mortalités

I. 2 L'Hôte : *Crassostrea gigas*

I. 3 Le milieu : la presqu'île de Fouras

Choix et description du site

Facteurs du milieu impliqués dans les mortalités

I. 4 Les agents pathogènes

Données pathologiques

Description de la famille *Herpesviridae*

Virus type herpès chez *C.gigas*

I.5 Diagnostic du virus Herpès chez *C.gigas*

I. 6 démarche épidémiologique d'étude des mortalités

Généralités sur l'épidémiologie

Objectifs de l'étude sur Fouras

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1 Population statistique

II. 2 Plan d'échantillonnage

II. 3 Pesée et Biométrie

II. 4 Suivi de la mortalité

II. 6 Diagnostic du virus type herpès par PCR et HIS

Caractéristiques de détection du virus type herpès

Technique de PCR appliqué à la détection de virus type herpès

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

II. 5 Mesures des paramètres

Les paramètres environnementaux sur le site de Fouras

Les paramètres biologiques

II. 6 Analyse des données

III RESULTATS

III. 1 L'évolution de la taille moyenne des naissains au cours de la période estivale 2001

III. 2 L'évolution de la mortalité des naissains au cours de la période estivale 2001

Mortalités enregistrées de 1998 à 2001

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

Mortalité 2001 sur les 12 poches

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

Mortalité sur les concession hautes et basses

III. 3 Résultats sur le virus type herpès au cours de la période estivale

Comparaison des résultats de diagnostic

Comparaison des résultats de PCR chez les baillantes et non baillantes

Détection du virus en fonction de l'apparition des mortalités

Lien entre la détection du virus et les mortalités au 3 juillet 2001

III. 4. Résultats des facteurs environnementaux

Effet de la salinité et de l'oxygène

Effet de la température

IV DISCUSSION

IV. 1. Les biais de l'échantillonnage

IV. 2. La mortalité sur le site de Fouras

L'évolution de la mortalité

Les fluctuations significatives de la mortalité

IV. 3. Explication de la mortalité sur Fouras

Lien entre mortalité et présence du virus type herpès

Lien entre les paramètres physiques du milieu et la mortalité

CONCLUSION

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 à eux seuls environ 80% de la production nationale en huîtres. Toutefois, ce secteur d'activité qui repose essentiellement sur l'élevage d'une seule espèce marine, *Crassostrea gigas* reste fragile.

Une succession de maladies d'origines diverses ont déjà causé d'importants dégâts. Au début des années 1970, l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, fut atteinte d'une infection virale (Iridovirose) qui décima tous les cheptels. Cette espèce a été rapidement remplacé par l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (*C.gigas*), importé du Japon et du Canada en 1971. Des infections parasitaires, *Martelia refringens* (Bonami et Grizel, 1971) et *Bonamia ostreae* (Comps *et al.* 1980) provoquent d'importants dégâts sur les populations d'huîtres plates, *Ostrea edulis*. Par sa résistance aux Iridovirus et sa capacité d'adaptation aux conditions du milieu, *C. gigas* s'est considérablement bien développé sur les côtes françaises.

En effet, en 1986 il a déjà pu être décrit des **mortalités estivales** (Bodoy *et al.*, 1988). Depuis 1991, des épisodes de mortalités ont été rapportés sur l'ensemble du littoral français (Renault *et al.*, 1994b). Présentées sous forme sporadique, en « taches », surtout en période estivale, ces mortalités touchent les larves et naissains produits en écloserie ou provenant du captage naturel. Des études portant sur une population 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). Mais au niveau national, la classe d'âge la plus concernée est le naissain (Thébault, 2000).

Ce phénomène de mortalité anormale ainsi décrit a donné cours à **diverses hypothèses** explicatives. Cependant, les causes réelles des mortalités anormales retrouvées chez le naissain de *C. gigas*, n'ont pas été élucidées complètement. En effet ces mortalités peuvent varier d'un site à l'autre, d'une année à l'autre, ce qui ne facilite pas son étude.

Dans le cadre des mortalités anormales de 1991 chez le naissain de *C. gigas* (agées de sept à 13 mois) issus d'écloserie ou de captage naturel, des examens histologiques suivis d'examen en microscopie électronique ont mis en évidence la présence de particules virales (Nicolas *et*

al, 1992). Ces particules présentaient toutes les caractéristiques des *Herpesviridae*. C'est en 1994 et 1995 que cette infection a également été détecté sur des lots provenant du captage naturel (Renault et al, 1994). Mais la plupart des observations ont été faites par histologie, ce qui n'était pas la meilleure technique pour évaluer un taux de prévalence de ce virus. Afin de valider l'hypothèse d'une infection virale lors des mortalités, il a fallu travailler sur un nombre d'échantillons plus grand et donc optimiser la technique de détection. Un protocole de détection du virus type herpès par la "Polymerase Chain réaction" (PCR) a alors été élaboré (Renault et al, 1996).

Depuis 1997, un suivi régulier des mortalités estivales des naissains de *C. gigas* est établi sur le site de Fouras. Ceci permet de comparer l'évolution des mortalités de manière interannuelle, d'évaluer s'il existe des différences importantes suivant le concessionnaire, la zootechnie etc... En parallèle de ce suivi, les études ont aussi porté sur l'évolution du taux de prévalence du virus type herpès au cours des mortalités estivales de naissain, et d'évaluer en parallèle l'évolution du taux de glycogène et de la maturation gamétique (Allard, 1998; Raude, 1999).

Dans la présente étude (2001), afin d'augmenter les chances de détection du virus, le pas de temps d'échantillonnage est restreint à une semaine et la technique de detection (PCR) est renforcé par l'Hybridation In Situ (HIS).

Le problème des mortalités estivales semble complexe et multifactoriel. Afin de simplifier l'étude, on s'est affranchis des problèmes de zootechnie pour essayer de comprendre les mécanismes de déclenchement de ces mortalités. Le présent travail a pour objectif de contrôler le facteur herpès et quelques facteurs environnementaux vis à vis des mortalités, mais beaucoup d'autres facteurs sont étudiés, sur le même matériel biologique, par d'autres laboratoires de l'IFREMER.

Les objectifs de ce travail sont donc :

- la mise en relation du taux de mortalité observé et de la détection du virus type herpès
- la mise en relation des mortalité observées et de l'évolution des paramètres environnementaux.
- la comparaison des résultats obtenus avec ceux des années précédentes.

C'est dans cet ordre d'idée que sera discuté d'une part la nouvelle procédure d'échantillonnage et d'analyse (comparaison avec l'ancienne procédure), et d'autre part les facteurs susceptibles d'entraîner les mortalités anormales chez le naissain de *C. gigas*.

I CONTEXTE DE L'ETUDE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.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 régulièrement observées au moins dans le bassin d'Arcachon (Maurer et al., 1986). Depuis 1991, des épisodes de mortalités ont été décrits sur l'ensemble du littoral français sur des larves d'écloseries (Comps et al, 1992), mais surtout sur le naissain d'écloserie ou de captage naturel (Renault et al, 1994a), et parfois dans certains secteurs sur des adultes comme à Perquis et Ronce (Soletchnik et al, 199).

Au cours de 1994 et 1995, des mortalités plus fortes ont été constatées un peu partout sur le littoral français (Thébault, 1998). Mais depuis 1996, les déclarations de mortalités de naissain ont beaucoup diminué (Thébault, 1999). Ce phénomène de mortalité n'est pas forcément d'allure homogène, et ceci à différentes échelles spatiales: un collecteur ou une poche au sein d'une concession peut être concernée ou non, un secteur ou une concession à l'intérieur d'un bassin peut être touché ou non, enfin un bassin peut être concerné ou non. Le phénomène semble être limité dans le temps au cours de la période estivale. Il faut ajouter que la production française d'huître creuse n'est pas altérée par ces mortalités : les mortalités de 1994-1995 n'ont pas fait chuter la courbe de production ostréicole française, ce qui montre l'importance relative de ces mortalités sur l'évolution des stocks(Goulletquer et Héral, 1997).

Un des rôles de l'IFREMER est de déterminer l'origine des mortalités anormales afin d'exclure une origine infectieuse qui pourrait limiter les exportations françaises (Thébault, 1999). 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 estivales qui dépassent ce seuil fait donc partie des missions de l'Institut.

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 cette classe d'âge sont surtout les suivants :

- un niveau trophique insuffisant (Bodoy *et al*, 1988),
- un déséquilibre physiologique (Soletchnik, 1999)
- des variations des conditions du milieu en période estivale (Gouletquer *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), dans 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 est alors émise chez le naissain de l'huître creuse.

Les sources d'informations étaient relativement hétérogènes à l'époque pour expliquer les mortalités anormales : déclarations isolées, estimations de mortalités non standardisées, études sur adultes, études sur tel ou tel facteur. De ce fait, les caractéristiques de mortalités n'étaient pas complètement définies, et aucune hypothèse sur la cause réelle des pertes sur le

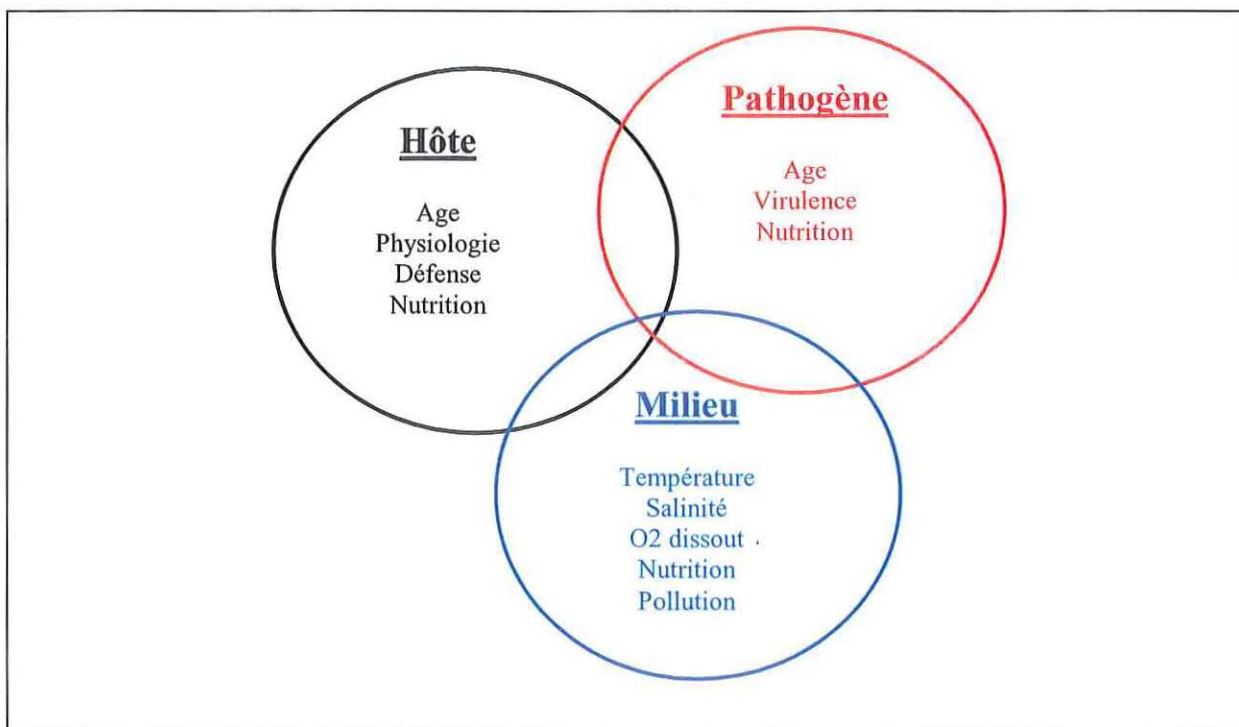


Figure n°1 : Mortalité résultant des interactions entre trois compartiments : milieu, hôte et pathogènes. (d'après

Toma *et al.* , 2001)

naissain naturel n'a jamais pu être corroborée complètement. En effet, la complexité du milieu (facteurs environnementaux), et les interactions diverses entre le milieu et l'animal expliquent les difficultés rencontrées.

I. 2 L'Hôte : *Crassostrea gigas*

Dans les différents facteurs susceptibles d'expliquer les mortalités estivales, on peut essayer de cerner les facteurs liés à l'hôte. Parmi ceux-ci il est possible de retenir tout d'abord l'effort de reproduction en période estivale.

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

La **gamétogénèse** est un phénomène rythmique, qui comprend différentes phases. Après un repos hivernal, l'huître se retrouve en maturation gamétique en général à la fin du 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 (Gouilletquer, 1989). La ponte serait 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.

D'après D. Maurer *et al.*, 1986, une étude descriptive sur les mortalités estivales des naissains de *C. gigas* (âgées de 1 an et 2 ans) par examen macroscopique dans le bassin d'Arcachon ne trouve pas de lien entre la maturation gamétique et les mortalités de juvéniles. Mais ces résultats relativement contradictoires avec ceux de Soletchnik *et al.*, obtenus par examen macroscopique sur du 2 ans (1997). Ceci montre la nécessité de mener une étude sur le sujet. En effet la classe d'âge qui nous intéresse le plus est le naissain, et l'étude de sa maturité, de façon fiable, ne peut être faite que par un examen histologique. Des études ont été menées à Fouras en 1998 et 1999 sur ce point. Des critères pour définir les stades de maturité ont été empruntés à Lubet (1959). Allard (1998) entre début juin et fin juin trouve significativement davantage d'individus en maturation fin juin. Raude (1999) entre fin mai et fin juin ne trouve pas de différence significative de maturation entre ces périodes. Cet indicateur est uniquement qualitatif ce qui peut poser un problème d'analyse. En effet ce qui compte dans l'effort énergétique de la reproduction c'est non seulement le stade de mûrié mais aussi la part relative de la gonade comparée aux autres organes.

Du point de vue physiologique, les **réserves énergétiques** de l'huître adulte (> 1 an) sous forme de glycogène baissent au profit des lipides des gamètes (Gabbot, 1976). De plus il a été démontré une relation entre les constituants énergétiques et la gamétogénèse (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.

L'influence d'autres facteurs internes sont mal connus ou n'ont pas été utilisés jusqu'à présent pour étudier les mortalités estivales. Il s'agit notamment des caractéristiques du système immunitaire, et des marqueurs de stress physiologiques, en relation avec des facteurs environnementaux.

On ignore s'il y a un effet de l'origine du naissain (par exemple d'Arcachon ou de Charente) ou de cohorte (par exemple entre des animaux captés au début ou à la fin de l'été), en effet il est difficile d'obtenir un échantillon représentatif d'un bassin de captage. Sur des animaux produits en écloserie il a été trouvé des différences entre les descendants d'un même pool de géniteurs, c'est à dire un effet familial (Pajot *et al.*, 1998 et Ernande *et al.*, 2000). Il a aussi été trouvé une corrélation entre la croissance et la survie, mais en milieu contrôlé (Ernande *et al.*, 2000).

La majorité des études biologiques et physiologiques chez *C. gigas* ont été effectuée sur des adultes. Mais il est important de différencier les adultes des naissains. En effet, au cours de la période estivale les naissains (âgés de moins d'un an) de *C. gigas* présentent une plus forte mortalité par rapport aux adultes. Ceci laisse à supposer une différence dans la biologie de l'organisme. Il sera donc nécessaire d'étudier de plus près, dans le cadre des mortalités, les caractéristiques biologiques de ces juvéniles.

I. 3 Le milieu : la presqu'île de Fouras

Choix et description du site

Le site de Fouras et en particulier le site de la pointe de la fumée a connu en 1994 et 1995 des **mortalités estivales** importantes chez les naissains de *C. gigas*. Depuis, ce phénomène se reproduit, mais avec des taux de mortalités qui varient chaque année. En 1995 le virus de type herpès a été détecté par histologie sur du naissain moribond.

Située à l'embouchure du Bassin de Marennes d'Oléron, la presqu'île de Fouras (Charente Maritime) représente un site ostréicole de captage de l'huître creuse traditionnel et important de la région (photo 1 et figure 2). Ce site effectue des ventes de naissain sur tout le littoral français. 30 % des ventes de naissain sur l'ensemble des sites d'élevages français sont effectuées en Charente maritime contre 70% pour Arcachon. Le nombre de concessions de la pointe de la fumée est de l'ordre de 156 qui appartiennent à 117 concessionnaires (source info DDAM de la Rochelle) (figure n°3).

Le **captage du naissain** se fait sur des collecteurs adaptés (coupelles, tubes ou cadres pléneaux). Ce naissain est détrouqué en général au printemps suivant et mis en poches sur des tables (élevage en surélevées).

A chaque marée, la Pointe de la Fumée est découverte et donc **accessible à pied**.

Par l'importance de ces quatre critères (accessibilité, mortalité, naissain, présences du virus type herpès), la presqu'île de Fouras sera choisie comme site d'étude dans le cadre de ce travail.

Facteurs du milieu impliqués dans les mortalités

Sur l'estran l'huître est soumise à diverses agressions. Les facteurs du milieu pouvant expliquer des mortalités sont de différents ordres, biotiques, abiotiques ou d'origine anthropique.

Les facteurs environnementaux sont à analyser à différentes échelles spatiales. Il existe des différences entre le sud et nord de la France, mais il peut en exister aussi à l'intérieur d'un bassin (Gouletquer, 1998), entre concessions (allard, 1998 et Raude 1999), au sein d'une concession (Soletchnick, 1999), voir entre poches (Allard, 1998 et Raude, 1999), du fait de l'hydrologie, du niveau d'exondation, et d'autres facteurs. Il faudra donc éventuellement en tenir compte pour la mesure des paramètres environnementaux.

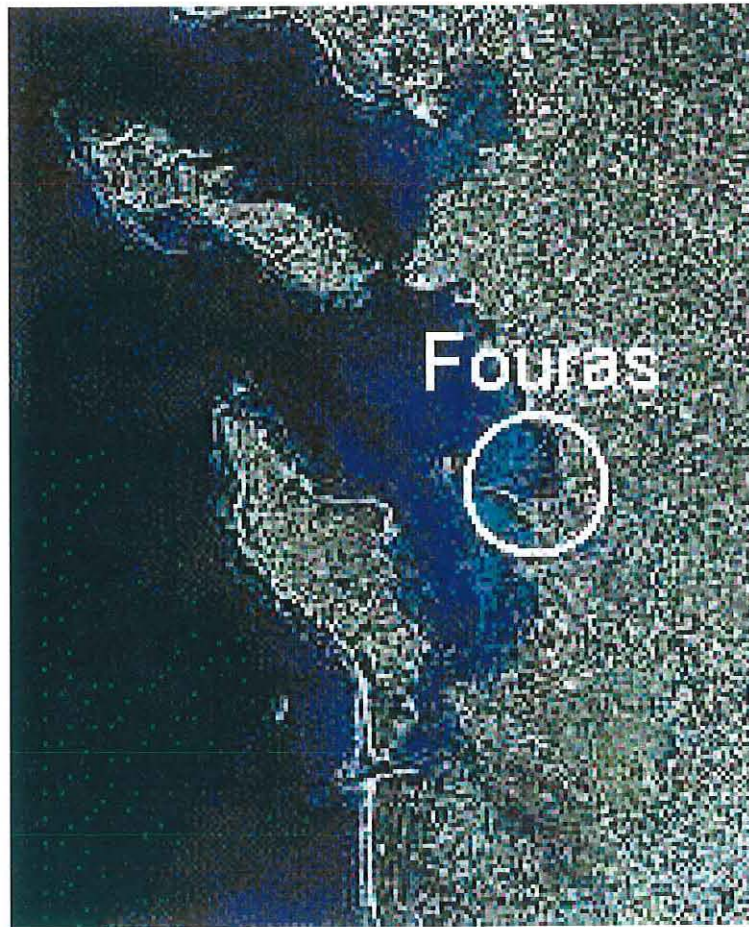
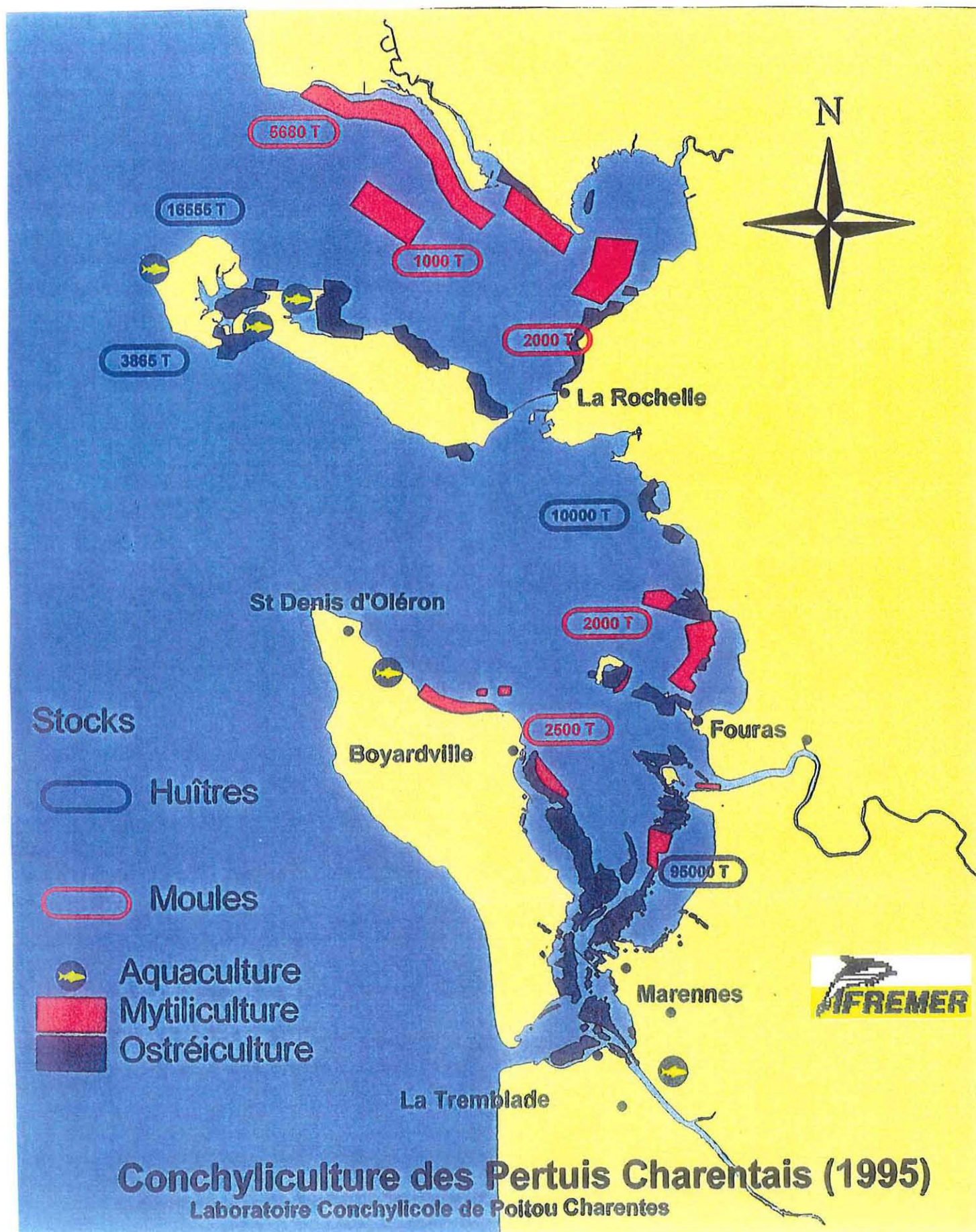


Photo n° 1 : Prise de vue satellite de la presqu'île de Fouras.

Figure n° 2



suivi des concessions à Fouras en 2001

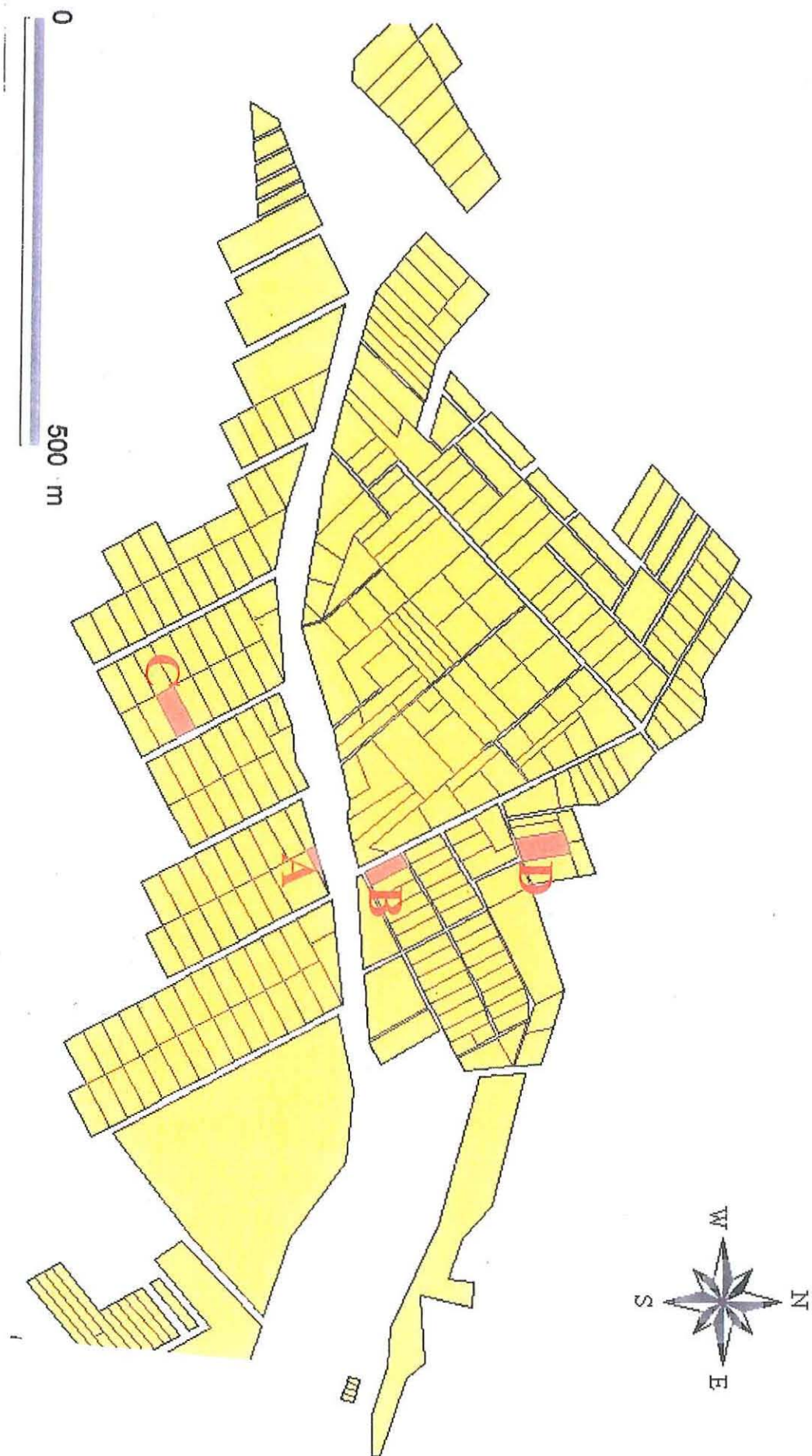


Figure 3 : Localisation des concessions suivies en 2001 sur le site de la point de la Fumée (Fouras).

Les conditions environnementales varient au cours du temps. Il faudra étudier le phénomène de nouveau à différentes échelles : l'échelle interannuelle, l'échelle des saisons, en effet c'est par exemple au printemps qu'on enregistre les plus fortes blooms phytoplanctonique, l'échelle hebdomadaire, par exemple le cycle de vives eaux et de mortes eaux, l'échelle du cycle de marée, avec des variations de paramètres comme la température et la salinité qui peuvent évoluer sur une demi-heure, sur des zones estuariennes et d'estran (Gouletquer, 1998).

Parmi les paramètres importants et mesurables il faut retenir la température et la salinité qui caractérisent la masse d'eau, l'oxygène dissout dont auront besoin les huîtres, la turbidité qui peut affecter l'efficacité de la filtration, le phytoplancton présent dans la colonne d'eau.

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), mais ces paramètres permettent de décrire les conditions d'apparition de ces mortalités.

Le temps d'exondation, et le niveau sur l'estran sont des paramètres environnementaux qui semblent utiles à prendre en compte, car ils influent, par exemple, à priori, sur l'apport trophique. Et en été, l'amplitude entre les températures d'immersion et d'émersion augmente, ce qui peut provoquer un stress thermique (Soletchnik, 1999). La température de l'air est donc aussi relativement importante à étudier.

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

D'autres causes peuvent intervenir sur la mortalité du naissain. En effet, certains polluants (urbains, industriels ou agricoles) issus des activités humaines peuvent y contribuer. Les **pratiques professionnelles** peuvent également avoir un impact sur les population d'huîtres de manière directe (zootechnie) ou indirecte (modification du milieu, dragage entraînant une remise en suspension des sédiments, surdensité...). Les pratiques zootechniques à risque sont notamment le transfert du naissain en période estivale, la date et les modalités du détroquage, le criblage, et les manipulations sur les poches (dédoublage, changement de maille, retournement des poches, densité des poches etc...). Cette différence d'historique explique des différences de mortalité entre concessions et concessionnaires (Allard, 1998, Raude, 1999, Faury *et al*, 2001). Sur les adultes, il a été trouvé une différence significative de mortalités entre l'élevage sur le sol et en surélevé (Gouletquer, 1998). Le naissain de moins d'un an n'est habituellement pas élevé au sol.

Les différences de mortalités entre poches (Allard, 1998 et Raude, 1999) peuvent venir de différences de zootechnie au sein d'une même concession (pas la même date de détroquage ou autre), de différences si elles sont situées dans des allées différentes au sein d'une concession, ou bien d'un microenvironnement spécifique à la poche. Les protocoles mis en place à l'époque ne permettaient pas de voir la différence.

Facteurs d'origine non infectieuse	Exemples
Facteurs environnementaux	Manque de nourriture (mort phytoplanctonique en été) Bloom de plancton toxique (dinoflagellés) Déficit en oxygène (malaïgue) 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.

L'effet direct de l'anoxie, dans le cas des malaïgues, sur la mortalité, a été démontré sur l'étang de Thau en 1997. Et la mortalité dû aux dinoflagellés (*Gymnodinium*) a été mise en évidence au cours de l'été 1995 en Baie de Bourgneuff. Ces deux facteurs sont considérés comme directement responsables des mortalités observées.

I. 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 surtout parasitaires. Un certain nombre d'agents

parasitaires ou non ont cependant été décrits dans le cadre 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 <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Bower <i>et al.</i> , 1994 Sallenave, 1999
Bactériennes	Rickettsies <i>Nocardia</i> <i>Vibrio splendidus</i>	Comps, 1980 Bower <i>et al.</i> , 1994 Waechter, 2001 et Lacoste in press
Virales	<i>Iridoviridae</i> (déclaration OIE) <i>Herpesviridae</i>	Bower <i>et al.</i> , 1994 Nicolas <i>et al.</i> , 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 (à déclaration OIE) 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 affaiblissants lorsque l'atteinte devient trop sévère sur des organismes fragilisés (Bower *et al.* , 1994).

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 en milieu confiné, en écloserie (Friedman *et al.*, 1991). Des mortalités de *C. gigas*, de 2 ans et plus, ont pu être attribuées à une bactérie *Nocardia*. En France, un *Vibrio splendidus* a été récemment associé à

certaines mortalités de naissain en éclosérie. Il a aussi été retrouvé en milieu ouvert dans des juvéniles moribonds. La reproduction expérimentale de la maladie, par balnéation 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. Pour mémoire, des mortalités massives d'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, ont été rapportées à la fin des années 1960 en France et ont été 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 (figure n°4). La capsidie à symétrie icosaédrique (162 capsomères) renferme le matériel génétique, soit un double brin d'ADN linéaire (120 a 200 kpb). Cette structure baigne dans un tégument fibreux, et l'ensemble est limité par une enveloppe sphérique, indispensable à l'infection de l'hôte. Le génome est organisé en séquences uniques et répétées qui selon leur arrangement permettent 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. Le virus peut être retrouvé chez l'hôte soit sous forme **virulente**, soit sous forme **latente**. 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 se maintient ainsi dans les organismes infectés. Sous des conditions stressantes, le virus peut être réactivé. Il entre alors dans un cycle viral productif ou virulent si les conditions sont favorables au virus ou dans un cycle viral abortif si les conditions sont défavorables au virus (cf. : figure n°5).

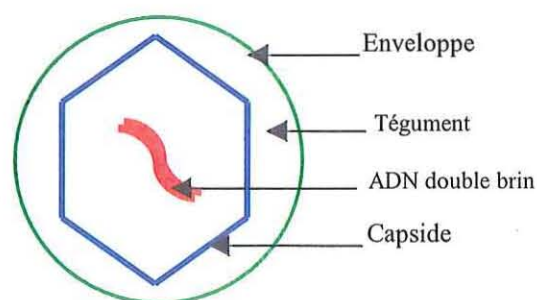


Figure n°4 : Structure générale d'un Herpesviridae

Le virus peut aussi persister sous une forme de multiplication peu ou pas productive chez les individus asymptomatiques. La virulence est exprimée par la transcription et la réplication de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte ainsi que par la synthèse des protéines virales dans le cytoplasme. Les particules obtenues par assemblage dans le noyau sont libérées sous forme de vésicules dans le noyau et ensuite sous forme de virions enveloppés dans le milieu extracellulaire, après éclatement de la cellule.

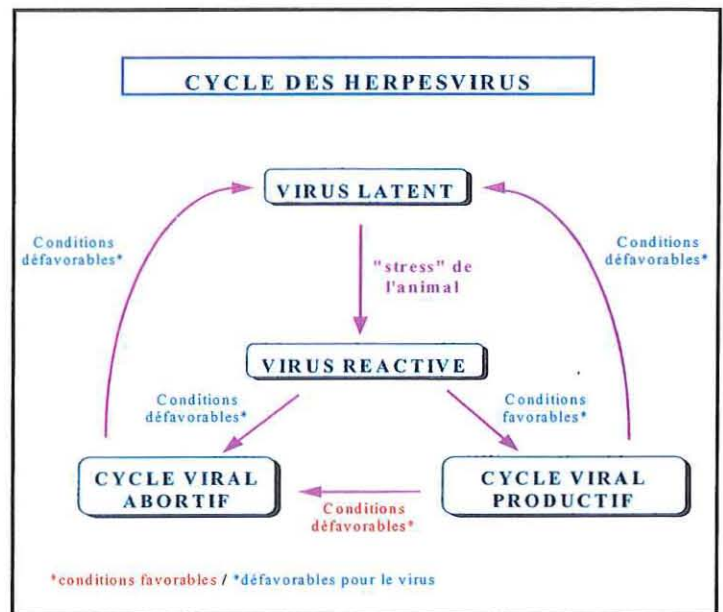


Figure n°5 : Cycle des Herpesviridae

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 la pathogénicité 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 sur les larves d'écloserie (Le Deuff *et al.* 1996). En effet, la température pourrait également avoir une influence sur 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). Cette observation peut rendre plus difficile la compréhension du développement des infections à virus de type herpès dans la mesure où il peut exister différentes espèces infectées dans le milieu. 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, du virus de type Herpès a aussi été observé, d'abord suspecté en histologie puis confirmé en microscopie électronique, en association avec des mortalités importantes sur des lots de naissain de *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994).

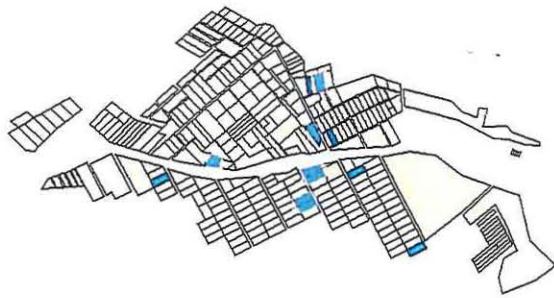
Les conditions de transmission du virus dans le milieu extérieur ainsi que sur le naissain sont encore inconnues, mais la transmission verticale entre géniteurs et descendants est fortement suspectée (Le Deuff *et al.*, 1994). La purification des particules virales (Le Deuff, 1995), a permis d'étudier d'autres caractéristiques (surtout génomique) du virus. Grâce à ces études, de nouvelles techniques de détection, basées sur la connaissance de séquences d'ADN viral, ont été développées, comme la Polymérase Chain Reaction PCR (1996) et l'Hybridation In Situ (1999).

I.5 Diagnostic du virus Herpès chez *C.gigas*

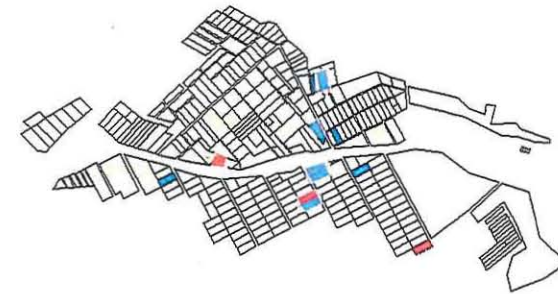
Le diagnostic microscopique effectué sur des coupes histologiques de matériel infecté à été la principale technique de détection utilisée lors des fortes mortalités des naissains *C. gigas* en 1994 et 1995. Des anomalies nucléaires surtout localisées au niveau des tissus conjonctifs de différents organes sont observées. Ces anomalies se caractérisent principalement par la présence de larges noyaux dont la chromatine est condensée en périphérie. Par ailleurs, des inclusions ont été décrites dans le noyau et dans le cytoplasme de certaines cellules infectées (Renault *et al.*, 1994a et 1994b). Aussi, une désorganisation généralisée des tissus affectés peut être observée, tandis que les réactions inflammatoires autour des cellules infectées restent réduites. Enfin, il est possible d'observer des images de 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).

Par cette technique peu d'échantillons peuvent être analysés avec certitude. Afin de traiter un nombre d'échantillons plus important, la technique de diagnostic par la **Polymérase Chain Reaction** (PCR) a été adoptée. En 1996, un protocole appliqué à la détection des virus type herpès a été mis 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, Thébault, 1999).

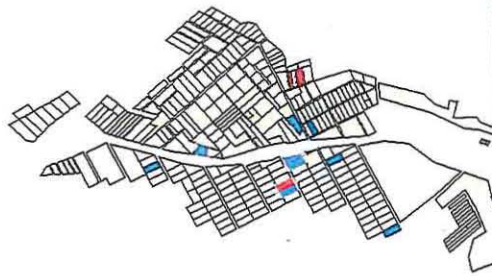
Résultats PCR Fouras en 1998



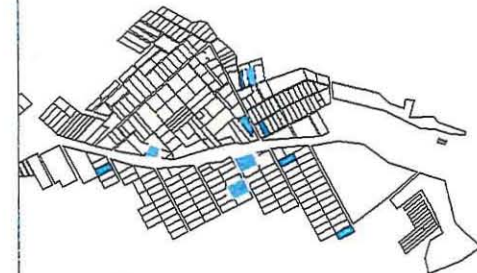
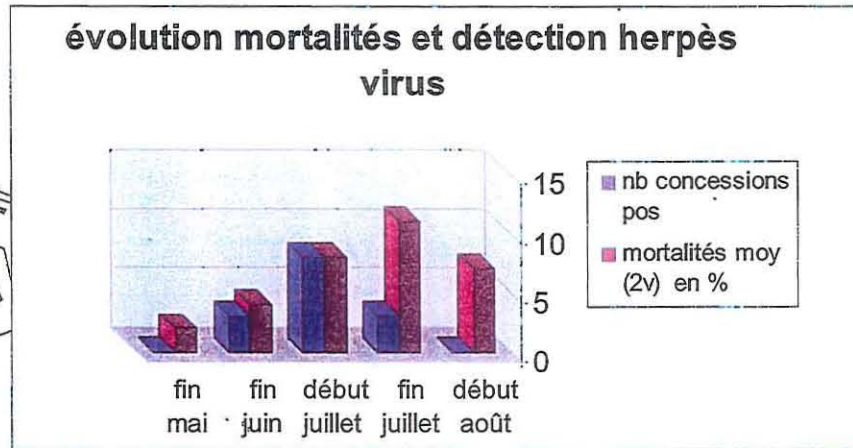
Fin mai 98



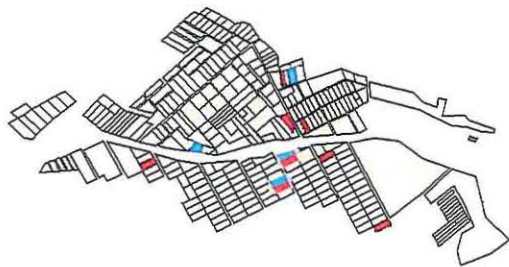
Fin juillet 98



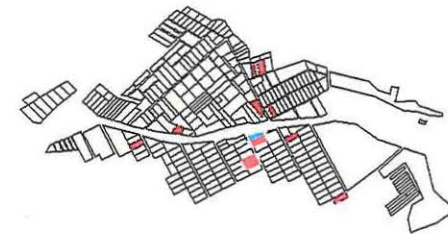
Fin juin 98



Début août 98



Début juillet 98



Sites positifs en 98

Figure 6 : Détection du virus de type herpès par PCR en 1998 sur le site de Fouras.

Toujours au cours des études sur le programme herpès virus (Renault et al., 1996 et 1997), il a été montré que la présence du virus par PCR pouvait être détecté préférentiellement sur certaines familles (Pajot *et al.*, 1998).

Les résultats de l'utilisation de la technique de 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). On ne trouve pas systématiquement du virus Herpès et pas forcément à un fort taux de prévalence (nb d'individus infectés/ nb d'individus testés). Les résultats des suivis sur Fouras sont du même ordre : en 1998 la détection du virus herpès coïncide avec le démarrage des mortalités (figure n°6) (Allard, 1998 et Thébault com. Pers.). Mais en 1999 Raude ne trouve quasiment pas de virus au cours de son suivi à Fouras. Il faut préciser que ces deux années là, les mortalités de naissain sur Fouras étaient plutôt faibles (figure n°10).

Il peut se poser différents problèmes : soit la PCR n'est pas assez sensible, soit l'échantillon est pris trop tardivement après les mortalités, soit les mortalités ont différentes origines ou d'autres origines.

Afin de répondre à la première question une deuxième technique moléculaire, l'Hybridation In Situ (HIS) peut donc être adoptée pour la détection du virus type herpès chez le naissain (Renault et al., 2001). Cette technique a été développée afin de détecter la présence du virus type herpès sur des coupes histologique d'huîtres adultes mais aussi de naissain. Il est ainsi possible de localiser l'ADN viral dans les tissus de naissain de *C. gigas*.

Afin d'éviter de prélever trop tardivement il paraît utile de restreindre le pas de temps de suivi à Fouras de bimensuel à hebdomadaire.

Enfin la dernière question sera abordée par l'étude générale des différentes causes possibles de mortalité.

I. 6 démarche épidémiologique d'étude des mortalités

L'épidémiologie apporte une démarche pour aborder une maladie ou un trouble de la santé d'origine complexe. Notamment 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).

Il existe deux types d'études : les études descriptives et analytiques.

Une étude descriptive a pour objectif d'identifier la ou les causes de la maladie, ou au moins d'émettre des hypothèses sur celles-ci. L'épidémiologie analytique confirme le rôle de tel ou tel facteur retenu grâce à un protocole adapté.

Les facteurs hôtes –agents-pathogènes peuvent chacun avoir un lien direct avec les mortalités.

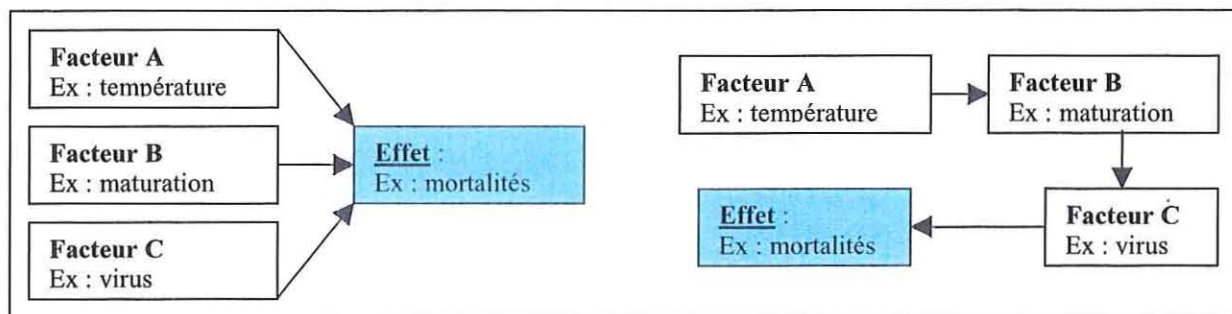


Figure n° 7 : Dans le cadre d'un effet plurifactoriel, les différents facteurs en présence peuvent être indépendants (figure de gauche), ou en interactions (figure de droite).

Ils peuvent aussi avoir un lien entre eux (figure n°7 à droite), ou bien ne pas présenter de lien entre eux et concourir à de la mortalité (figure n°7 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 7 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 7 à droite), seule une étude répétée dans le temps permettra de mieux connaître la cascade d'évènements. C'est ce qu'on appelle une étude descriptive transversale répétée (Toma et al, 2001).

D'un autre côté il faut retenir qu'une cause (A) peut être nécessaire ou non et suffisante ou non pour entraîner un effet B (tableau n°3).

Enfin il existe des degrés d'association entre un facteur et une maladie. Ce gradient sépare un indicateur de risque, un facteur de risque, et un facteur causal (Toma et al, 2001).

Un facteur causal est en général nécessaire et suffisant, tandis qu'un indicateur de risque n'est pas forcément suivi de l'effet recherché.

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.

Facteur A nécessaire	Facteur A suffisant	Conclusion
+	+	Le facteur est nécessaire et suffisant pour provoquer B. $A \rightarrow B$. A est une cause.
+	-	Le facteur est nécessaire mais pas suffisant pour provoquer B. $A + X \rightarrow B$.
-	+	Le facteur est suffisant mais pas nécessaire pour provoquer B. $A \rightarrow B$, mais aussi $X \rightarrow B$.
-	-	Le facteur n'est ni suffisant ni nécessaire pour provoquer B. $A + X \rightarrow B$ mais aussi $C + X \rightarrow B$.

Tableau n°3 : Diversité des relations possibles entre une cause A et un effet B (Toma, et al, 2001)

Il existe d'autres critères de causalité pouvant être utilisés en milieu marin, dans le cadre d'études descriptives (Thébault, 2001) ou analytiques. Plus on aura de critères satisfaits, et si les résultats des études analytiques concordent, plus il sera possible d'affirmer que l'on a affaire à un facteur causal.

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

- Formuler l'hypothèse de départ
- Comparer les résultats obtenus avec l'hypothèse
- Vérifier la règle des "3A"
- Eliminer les biais et répondre à l'hypothèse du départ

Objectifs de l'étude sur Fouras

L'objectif de ce travail sera donc d'étudier les différents phénomènes qui se déroulent lors des mortalités estivales des naissains de *C. gigas*, en dehors des facteurs zootechniques, dans le but d'identifier différents facteurs de risque pouvant être impliqués. Plus particulièrement nous nous intéresserons au rôle du virus herpès dans les mortalités estivales de naissain.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1 Population statistique

Les naissains d'huîtres *Crassostrea gigas* qui vont être utilisés au cours de l'étude ont une origine commune. Ces animaux sont issus de collecteurs, des coupelles (photo 2) 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 terre dans l'exploitation, puis ont été criblés et mis en poches le 7 mai (photos 3, 4 et 5). 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, après une estimation effectuée par comptage et pesée de 200 g, de 7000 individus. Douze poches de mailles de 8 mm ont été placées le jour même, c'est à dire le 7 mai, sur des concessions différentes de la presque île de Fouras, à la pointe de la Fumée, dans la zone de balancement des marées. Six poches ont été disposées de telle sorte à y avoir accès lors de marées de faibles coefficients de 40. Ces poches sont donc accessibles toutes les semaines. Trois poches ont été disposées sur la concession A et trois poches sur la concession B (tableau 4 et figure 3). Six autres poches ont été placées à des niveaux qui ne sont découverts que lors de fortes marées à des coefficients de 85 et de 100, c'est à dire qui ne seront accessibles au maximum que toutes les deux semaines. Trois poches ont été disposées sur la concession C et trois poches sur la concession D (tableau 1 et figure 3).

Concessions	A	B	C	D
Poches à coefficient 40	P1, P2, P3	P4, P5, P6		-
Poches à coefficient >80		-	P7, P8, P9	P10, P11, P12

Tableau n°4 : Répartition des poches sur les différents sites de la pointe de la Fumée



Photo 2 : Vue sur les coupelles collecteurs utilisées pour le captage naturel de *C. gigas* sur le site de Fouras.

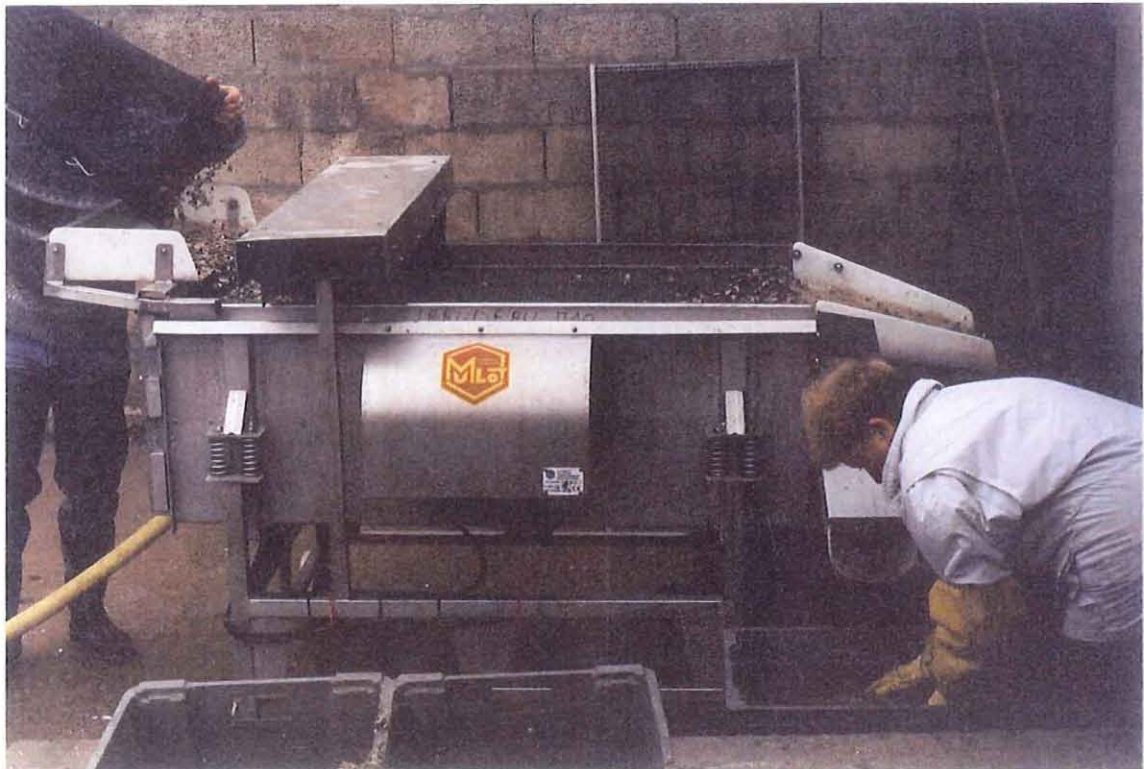


Photo 3 : Criblage des populations de naissains d'huîtres creuses avant a mise en poche.



Photo 4 et 5 : Mise en poche des naissains d'huîtres creuses sur les tables surélevées du site de Fouras.

II. 2 Plan d'échantillonnage

Le tirage des échantillons est qualifié d'aléatoire et sans remise.

Chaque poche est vidée dans un conteneur et homogénéisée. Environ 300 individus sont prélevés au hasard à l'aide d'un récipient. Le volume estimé sur une première mesure est marqué sur le récipient et sert ensuite aux autres prélèvements. La poche est ensuite fermée et rattachée 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.

L'effectif échantillonné est considéré comme négligeable par rapport à l'effectif restant (< 10%) bien que cela évolue au cours du temps. Suivant les coefficients de marée les prélèvements auront lieu toutes les semaines ou toutes les deux semaines.

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

II. 3 Pesée et Biométrie

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

II. 4 Suivi de la mortalité

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).

Finalement la mortalité est évaluée sur trois critères de mortalités cumulées, mais qui n'ont de signification que pendant un temps limité. L'un prend en compte uniquement le nombre de deux valves (2vt), et l'autre prend en compte en plus le nombre de valves inférieures et supérieures isolées (vinf et vsup) (tableau 5). Le premier traduira des mortalités récentes, et le second des mortalités plus anciennes. Les frottements finiront par abîmer les charnières, et feront disparaître les traces d'un individu mort. Un troisième critère ne prend en compte que des mortalités très récentes, et ne considère que le % d'huîtres baillantes.

Un individu qui meurt passe donc par les différentes phases suivantes :

vi → bai → 2v → vinf + vsup → débris.

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

Tableau n°5 : critères pour le calcul de mortalité.

II. 6 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 (Leitch *et al.*, 1994)

Caractéristiques de détection du virus type herpès

La structure du génome 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. Les amorces OHV3/OHV4 et les amorces OHV3/OHV114 permettent d'amplifier une séquence à priori non codante du génome. Chacun de ces couples d'amorce encadrent une zone, un fragment de taille définie (figure n°8).

La Polymérase Chain Reaction (PCR) utilise les amorces OHV3 / OHV114 (figure n°8). Les amorces OHV3 / OHV4 seront utilisées pour la détection par Hybridation In Situ.

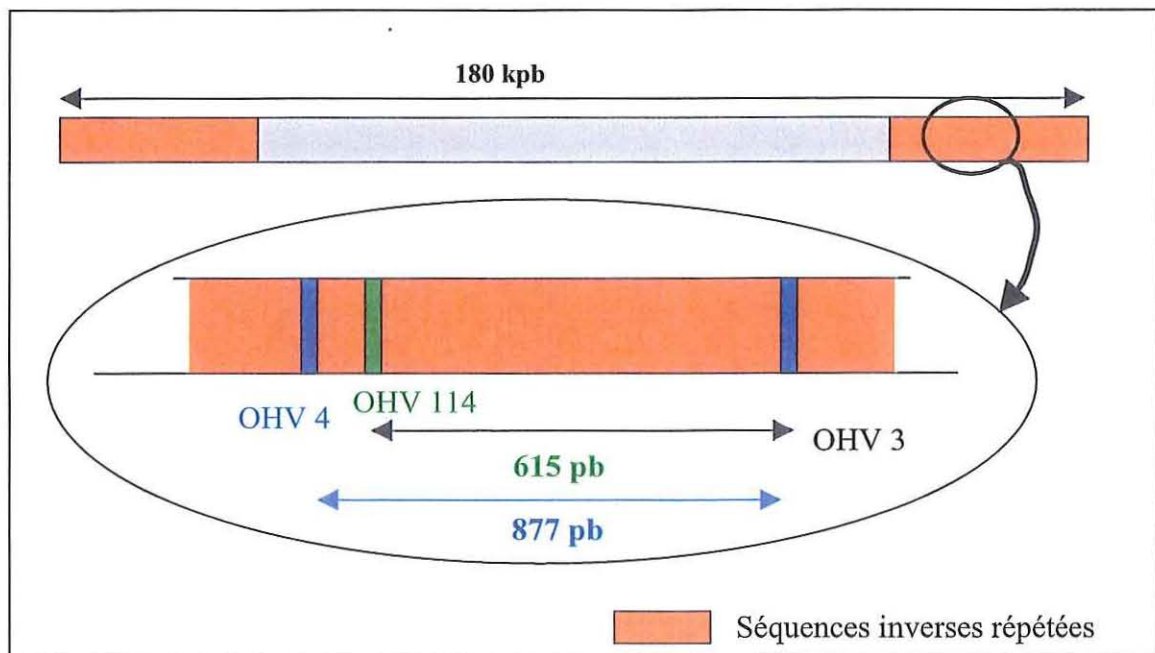


Figure n°8 : Structure du génome du virus type herpès de l'huître. Localisation des amorces utilisées en PCR (OHV114 / OHV3) et HIS (OHV3 / OHV4).

Technique de PCR appliqué à la détection de virus type herpès

- 10 individus par poches et par unité de temps sont analysés par PCR. Ces 10 individus se répartissent en 2 pools de 5 individus. Deux résultats par échantillon seront donc obtenus par PCR, par poche et par unité de temps. Lorsqu'un échantillon comprend des animaux baillants, ceux-ci sont tous analysés en plus et à part. Enfin sur certains lots positifs il a été

analysé 20 animaux supplémentaires, notamment afin de comparer les résultats avec ceux de l'hybridation in situ.

- La préparation des échantillons ne comprend pas d'extraction d'ADN. Les animaux vivants ont été congelés à -20°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 de 5 mn à 10000 tours par minutes sont récupérés (**annexe2**).
- La suite du protocole est une PCR classique (Renault *et al*, 2000). Le mélange réactionnel (MIX) est composé de réactifs à des concentrations spécifiques (**annexe n°2**). Les amorces OHV3 / OHV114 encadrent une séquence d'ADN viral cible d'environ 615 pb. La polymérase utilisée (Taq polymérase) a l'avantage d'avoir une activité constante malgré les variations de température au cours des cycles de PCR. Des témoins sont prévus pour contrôler chaque réaction : le témoin positif est préparé avec une solution de 2500 copies d'ADN viral. Le témoin négatif préparé avec de l'eau bidistillée permet de contrôler d'éventuelles contaminations.
- Le thermocycleur est l'appareil utilisé pour la programmation des cycles d'amplification, qui ont été optimisés pour la détection d'ADN de type herpès (Renault et al, 2000). Un cycle est défini comme la période au cours de laquelle la quantité d'ADN cible est multipliée par deux. Chaque cycle consiste en une dénaturation (ADN simple brin) à 95°C , d'une hybridation (hybridation des amorces) à -5°C et d'une élongation (formation du brin néosynthétisé) à 72°C . Le détail des cycles est donné en **Annexe n°3**.
- La mise en évidence de l'ADN amplifié se fait par marquage au Bromure d'Ethidium (BET). Les bandes obtenues après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% (20 minutes à 110Volts) sont visualisées sous lampe Ultra-Violet. La taille des fragments obtenue est comparée à celle attendue.

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.

- 20 animaux ont été fixé pour chaque poche et à chaque unité de temps, dans un fixateur couramment utilisé en histologie, à savoir le Davidson.
- Après fixation, le matériel biologique est inclus dans la paraffine. Des coupes histologiques sont effectuées et récupérées sur des lames silanisés pour l'Hybridation In Situ.

La sonde est une séquence d'ADN viral marqué (environ 877 pb) amplifié en PCR, à l'aide des amorces OHV3 / OHV4 et à partir d'ADN viral purifié (Annexe n°4). Le marquage (uniquement sur l'Uridile) est effectué à la digoxygénine (DIG). La mise en évidence des fragments marqués est effectuée sur gel d'agarose à 2% et comparé au témoin préparé avec des nucléotides non marqués (Annexe n°4).

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 H₂O₂) un signal de couleur jaune/marron peut être visualisé (Annexe n°4).

II. 5 Mesures des paramètres

Les paramètres environnementaux sur le site de Fouras

Les paramètres du milieu sont enregistrés toutes 15 minutes au moyen d'une sonde de mesure : la sonde ISY (photo 6). Cet instrument peut mesurer in situ des paramètres en condition d'immersion et d'émersion. L'ensemble des données est stocké automatiquement. Cette sonde mesure la température de l'eau et de l'air, la salinité, l'oxygène et la hauteur d'eau. Elle a été installée le 30 mai 2001 sur la concession A, au niveau des tables ostréicoles, à moins d'un mètre des poches étudiées (photo 4). La sonde est ramenée tous les quinze jours au laboratoire, les données sont récupérés sur ordinateur, la sonde est recalibrée et ramenée sur le site le jour d'après. Une autre sonde, qui ne mesure que la température est en place depuis plus d'un an sur la concession D (coeff 100), mais n'est relevée que tous les 3 mois.



Photo 6 : Sonde YSI permettant la mesure des paramètres environnementaux du site de Fouras.

Les paramètres biologiques

Les différents facteurs biologiques susceptibles d'être impliqués dans les mortalités de naissain *C. gigas* au cours de la période estivale sont étudiés dans différents laboratoires de l'IFREMER dans le cadre du programme MOREST (tableau n° 6). Ces facteurs sont tous étudiés pour les huîtres des poches P1, P2 et P3 de la concession A. Pour cela des échantillons issus de ces poches leur ont été envoyés chaque semaine au cours de l'été 2001.

Paramètre étudié	Laboratoire 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° 46: 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 les mortalités estivales de naissain de 2001. Selon le schéma décrit précédemment (figure n°7), de nombreuses combinaisons de facteurs sont possibles, et il est possible qu'on obtienne plusieurs scénarios envisageables.

II. 6 Analyse des données

Les données seront analysées graphiquement en comparant les intervalles de confiance. Sinon les tests utilisés seront ceux du X². 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 utilisées sous EXCEL. L'intervalle utilisé était soit un cycle de marée (48 périodes) soit 24 heures (96 périodes).

III RESULTATS

III. 1 L'évolution de la taille moyenne des naissains au cours de la période estivale 2001

La taille moyenne des naissains *C. gigas* au cours de la période d'étude a été suivie uniquement sur les poches 1, 2 et 3 (concession A). L'allure générale des courbes montre une croissance relativement linéaire des huîtres (Figure n° 9). Sur les deux mois d'été (Juin et Juillet), la taille des naissains est passé d'environ 20 à 30 mm.

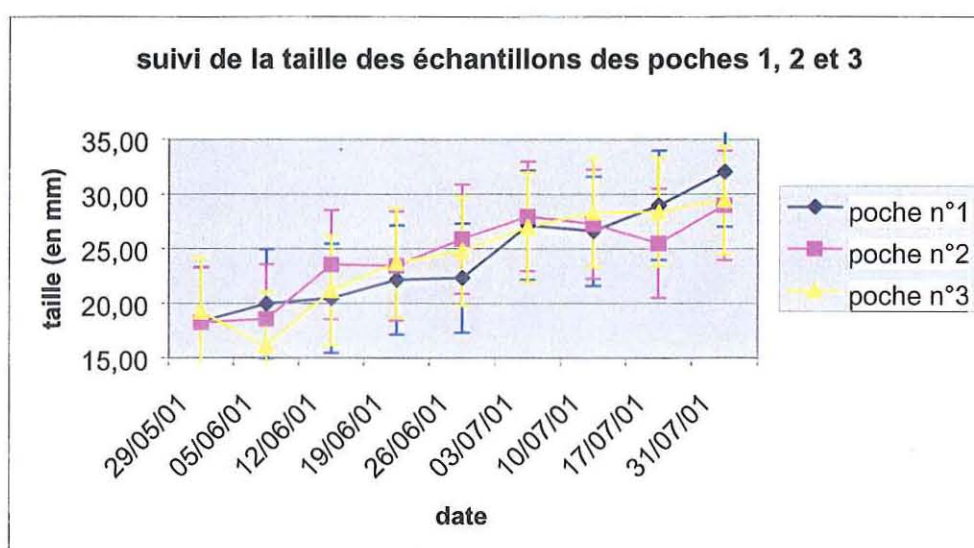


Figure n°9 : Evolution de la taille moyenne des naissains *C. gigas* au cours de la période estivale (poches 1, 2, 3 de la concession A)

III. 2 L'évolution de la mortalité des naissains au cours de la période estivale 2001

Mortalités enregistrées de 1998 à 2001

Depuis 1998 les mortalités estivales sur Fouras ont augmentées (figure n°10). En effet, elles sont passés 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 que ces années là. En 2000 il a été observé une recrudescence des mortalités début août, ce qui n'a pas été constaté cette année.

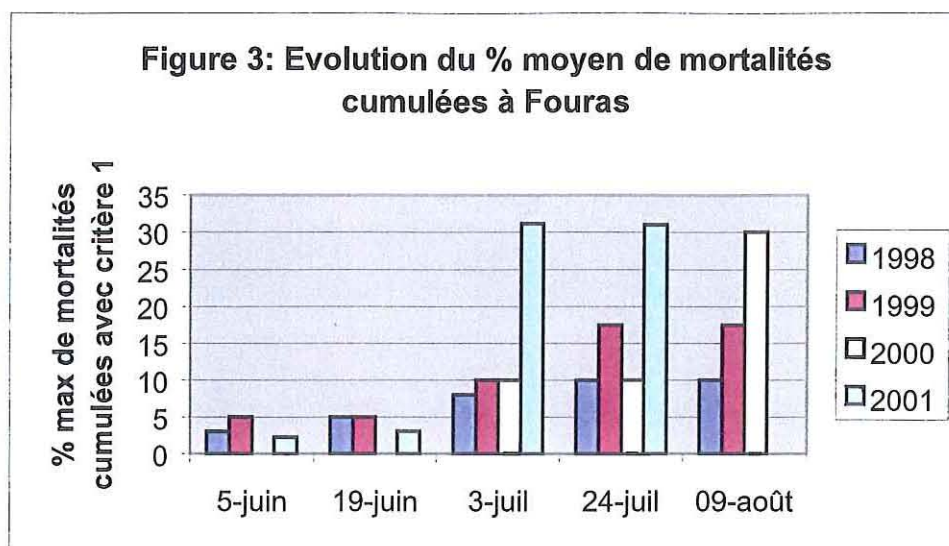


Figure n°10: Présentation des mortalités estivales enregistrées de 1998 à 2001.

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

Le critère 1, comme le critère 2 décrivent des mortalités cumulées. Le phénomène de mortalité sur les poches 1, 2, et 3 apparaît après le 19 Juin 2001. Le maximum de mortalité des poches 1 et 3 est atteint en même temps, soit le 3 Juillet. Par contre on note globalement une différence entre les poches à la fois dans la cinétique et dans les taux de mortalité atteints. 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. La mortalité sur la poche 3 apparaît de manière précoce par rapport aux deux autres poches.

Le critère de mortalité 2 (figure n°12) montre une certaine rémanence des mortalités par rapport au critère 1 (figure n°11) mais ne change pas globalement les résultats obtenus par le critère 1. Le critère de mortalité 3 confirme les résultats précédents et indique qu'il n'y a quasiment plus de nouvelles mortalités après le 10 juillet. Sur les poches 1, 2 et 3, le pourcentage de baillants augmente à partir du 19 Juin pour les poches 1 et 2, et plus tôt (le 12 Juin) pour la poche 3.

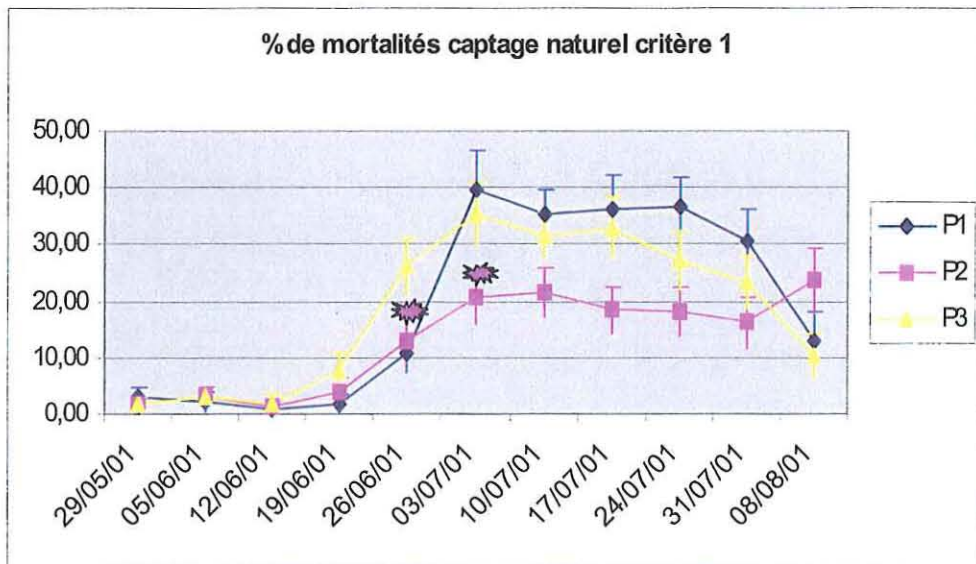


Figure n°11 : Evolution des mortalités estivales sur les poches 1, 2 et 3, sous le critère 1.

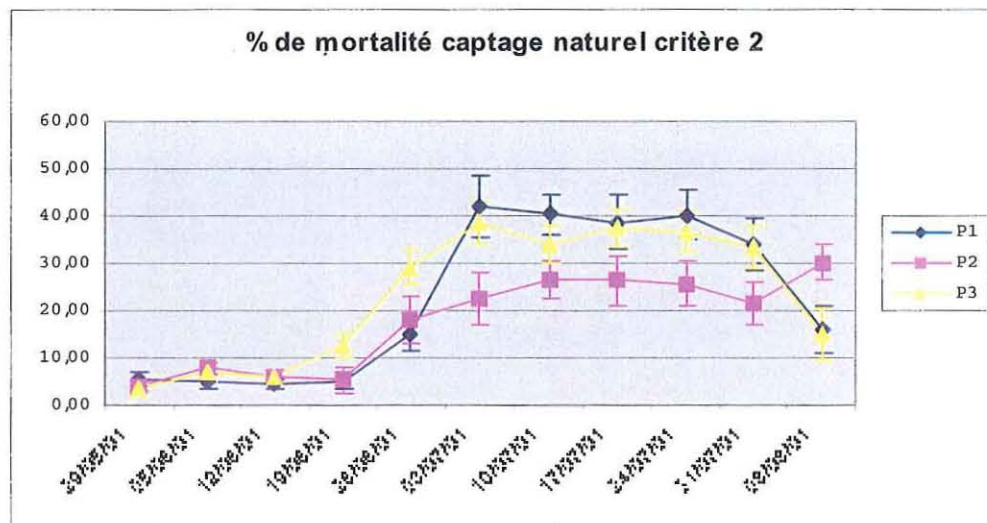


Figure n°12 : Evolution des mortalités estivales sur les poches 1, 2 et 3, sous le critère 2.

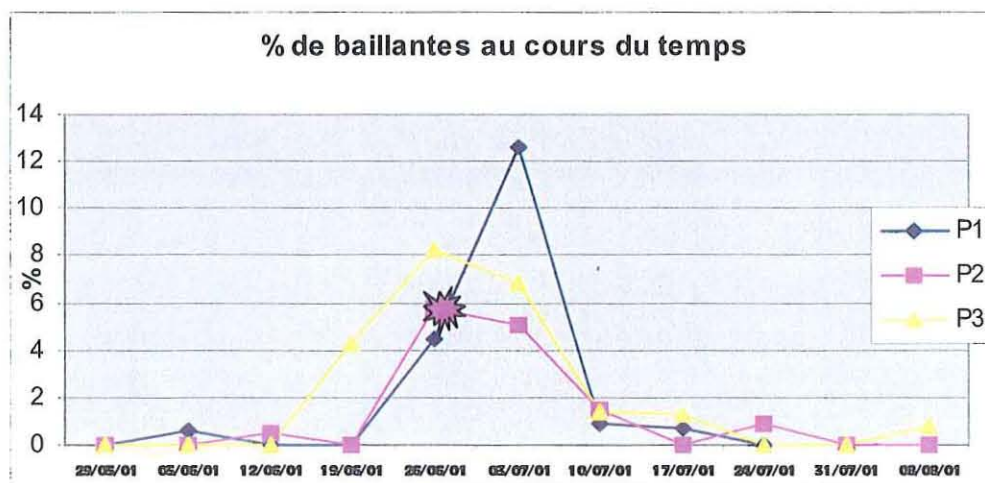


Figure n°13 : Pourcentage d'individus baillants au sein de chaque poche sur la concession A40 au cours de la période estivale. Visualisation des PCR positifs sur ces lots au cours du temps.

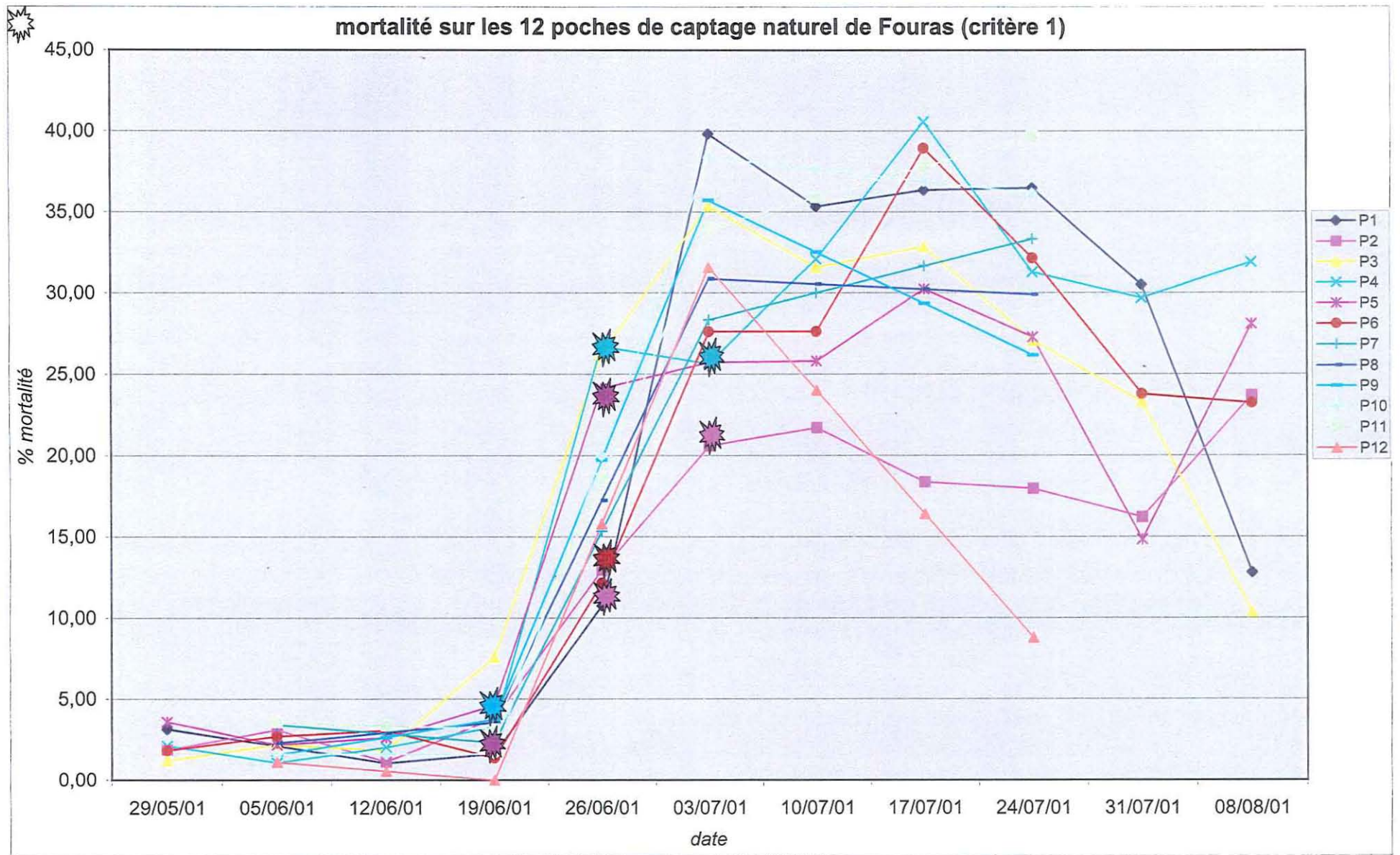


Figure 14 : Evolution de la mortalité des 12 poches au cours de la période estivale 2001 (critère 1)

Mortalité 2001 sur les 12 poches

L'aspect général des 12 courbes de mortalité issus des critères 1 (figure n°14) est d'allure semblable avec ceux obtenu a partir des poches 1, 2 et 3. On observe des différences entre poches dès l'augmentation des mortalités.

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 dans la figure n° 15 On note effectivement que la mortalité démarre au même moment chez les quatre concessions A, B, C et D (19 Juin). On remarque que les courbes représentatives des quatre concessions A, B, C et D évoluent avec peu de différences entre elles. On estime qu'il n'y a pas de différences nettes entre les concessions.

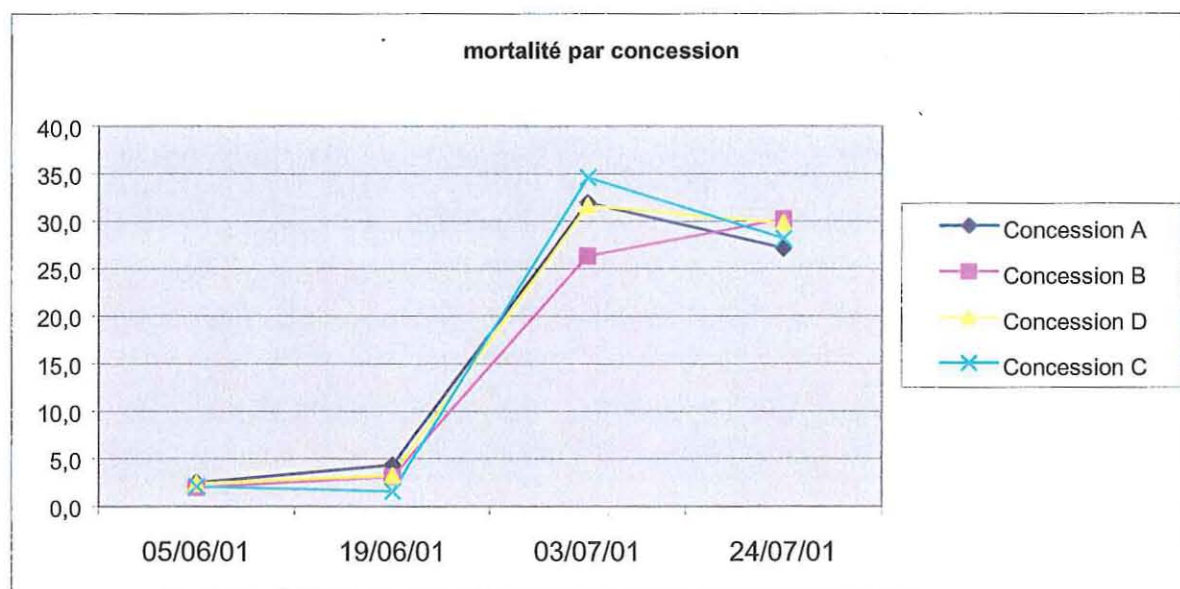


Figure n°15 : Moyennes des mortalités par concession (A, B, C et D). Evolution au cours de la période estivale

Mortalité sur les concession hautes et basses

Les concessions hautes (A et B) et basses (C et D) présentent des taux de mortalités comparables. Une différence non significative à 5% a été trouvée 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.

III. 3 Résultats sur le virus type herpès au cours de la période estivale

Comparaison des résultats de diagnostic

La mise en commun des résultats obtenus par la technique de PCR et de l'Hybridation In Situ sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau n° 7) et montrés sur les photos 7 et 8. . Globalement les résultats semblent concorder : les lots positifs par PCR sont positifs par HIS. On note que le 5 juin l'HIS a détecté une présence virale, alors que la PCR s'est révélée négative. 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	1/6	1/20	3,33 -16 %	5 %
	P9	2/6	4/20	6,66-32 %	20 %
26 Juin	P2	0/6	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.

Comparaison des résultats de PCR chez les baillantes et non baillantes

La différence de % de pools positifs entre des pools non baillants et baillants, pris à la même date, du 26 Juin au 10 Juillet montre une différence entre ces deux critères. Le taux d'individus positifs est modéré dans les deux cas mais on note davantage d'individus positifs dans les lots baillants que dans les lots non baillants.

Pourcentage de PCR + sur les non baillantes	2 % +/-4
Pourcentage de PCR + sur les baillantes	17 % +/- 12

Tableau n°8: Détection virale par PCR sur les individus baillants et non baillants.

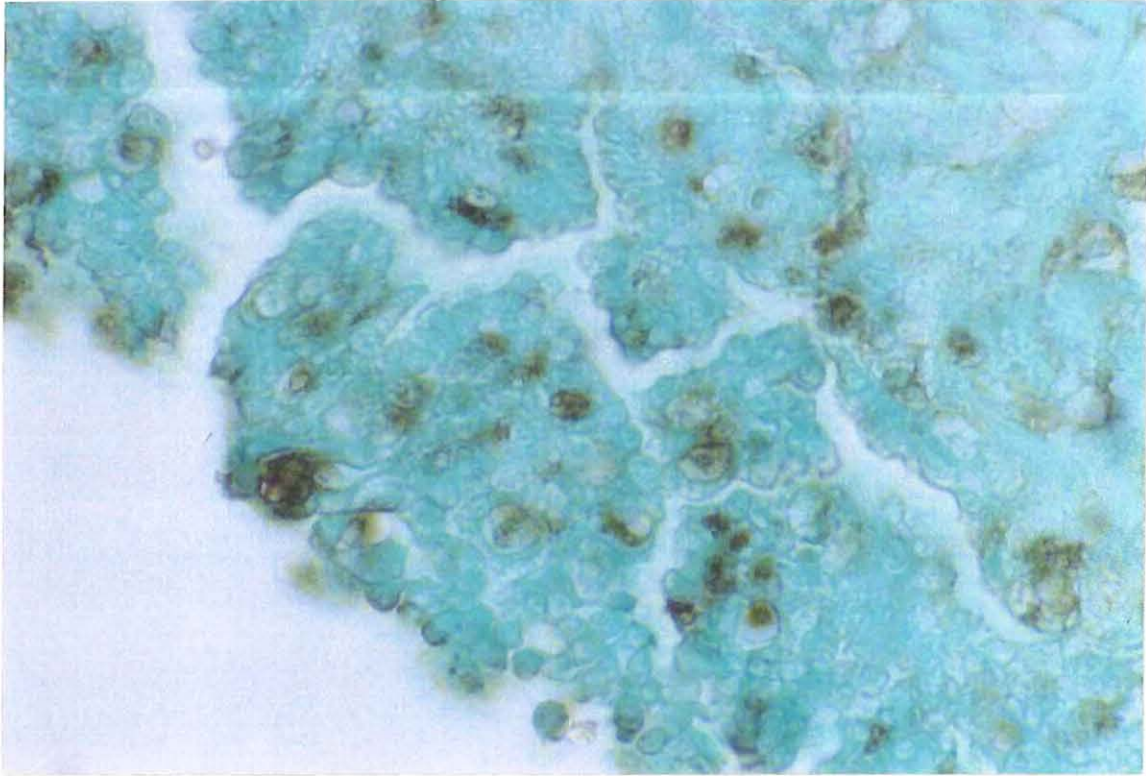


Photo 7 : Visualisation microscopique d'une infection virale de type Herpès localisée dans le manteau. (*par Hybridation in situ*)

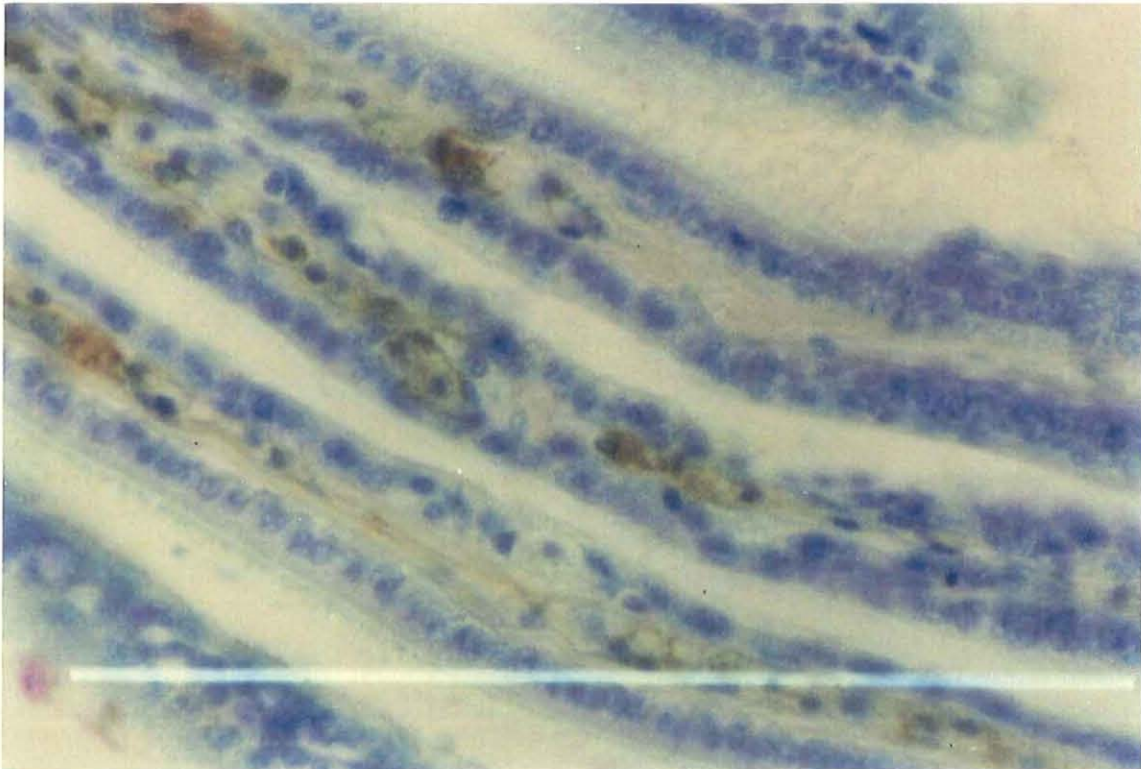


Photo 8 : Visualisation microscopique d'une infection virale de type Herpès localisée dans les branchies. (*par Hybridation in situ*)

Détection du virus en fonction de l'apparition des mortalités

Il n'a pas été possible de détecter de virus herpès par PCR avant le 19 juin. Les premières détections par PCR du virus herpès coïncide avec le démarrage des mortalités et les accompagnent, comme l'indique la figure n°13.

Lien entre la détection du virus et les mortalités au 3 juillet 2001

Les % de mortalités des lots positifs par PCR sont inférieurs aux % de mortalité des lots négatifs par PCR, au 3 Juillet (tableau n°9). Il n'existe donc pas à priori à cette date une association entre la détection du virus par PCR et la mortalité.

<u>N ° de poche</u>	<u>% de mortalité au 3 juillet</u>	<u>Statut herpès</u>
1	39,8	Neg
10	38,3	Neg
9	35,7	Neg
3	35,3	Neg
11	34	Neg
12	31,58	Neg
8	30,88	Neg
7	28,73	Neg
6	27,62	Pos
5	25,72	Pos
4	25,64	Pos
2	20,59	Pos

Tableau n°9 : Présence relative du virus herpès sur l'ensemble des poches à une date précise

III. 4. Résultats des facteurs environnementaux

Effet de la salinité et de l'oxygène

La figure n°15 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 qui précède et au cours duquel se produisent les mortalités on n'observe pas globalement de grandes variations du taux de saturation en oxygène, qui en immersion est presque tout le temps maximal, et de la salinité qui voisine les 32-33 ‰ (figure n°15).

Effet de la température

La comparaison des moyennes mobiles des deux séries de température de 2000 et 2001 montrent quelques tendances (figure n°16). Ainsi les températures de 2001 semblent plus élevées qu'en 2000, mais la sonde n'était pas placée au même endroit, en effet la sonde de 2000 était placée à un coefficient de 100 et celle de 2001 à un coefficient de 40. Du 19 juin à fin juin, période qui correspond aux mortalités observées en 2001 la moyenne mobile et les températures dépassent globalement les 20°C pour la première fois de l'année. On peut aussi remarquer qu'en 2000 il fallait attendre début août pour avoir une tendance comparable et que cela correspondait aux plus fortes mortalités de l'été 2000.

Un recapitulatif des variations des paramètres du milieu lors des exondations et immersions successives est présenté figure n°17.

Evolution de la salinité et de la saturation en oxygène en juin 2001 à fouras

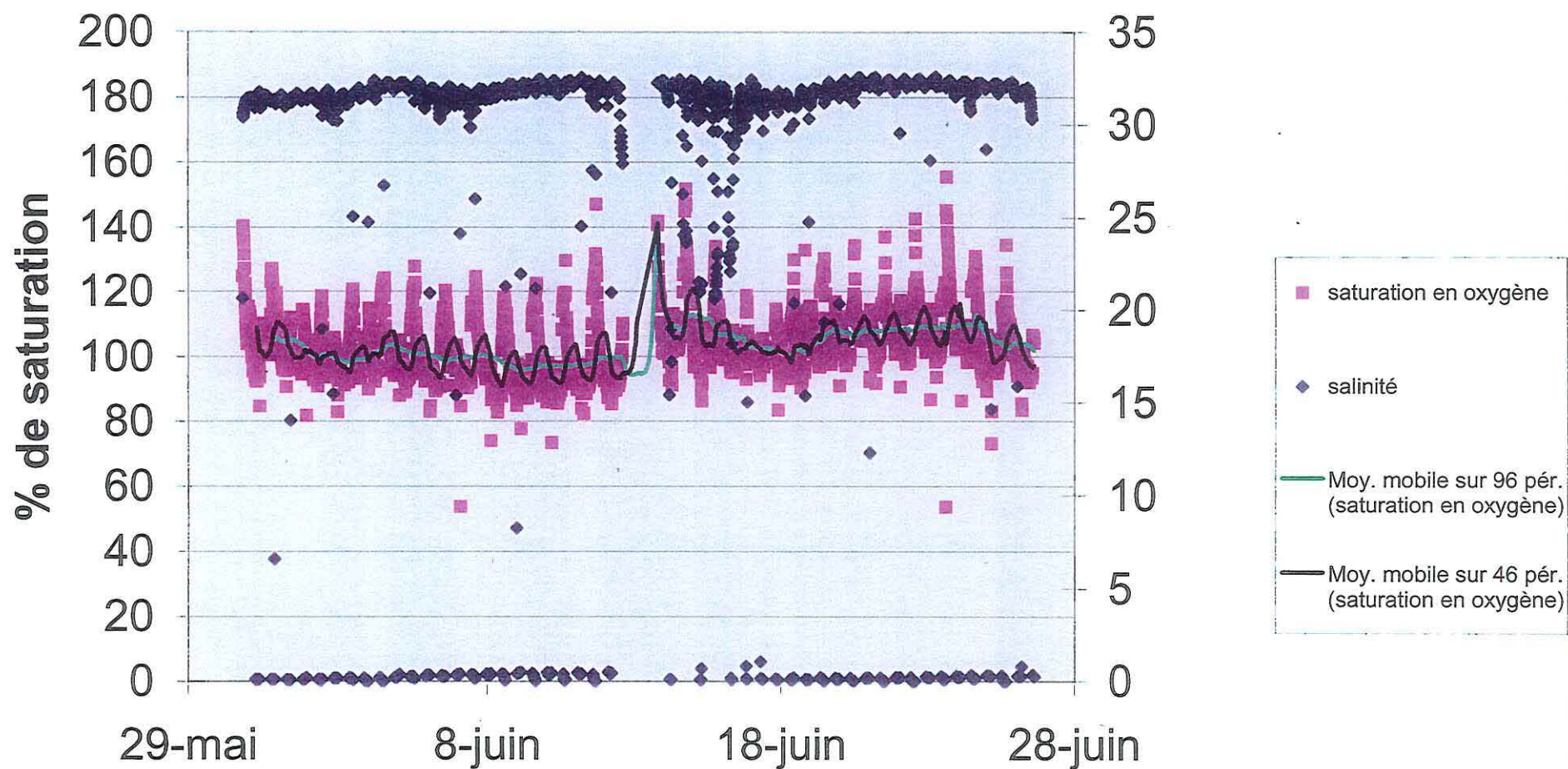


Figure 15 : Evolution de la salinité et de la saturation en oxygène en juin 2001 à Fouras.

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

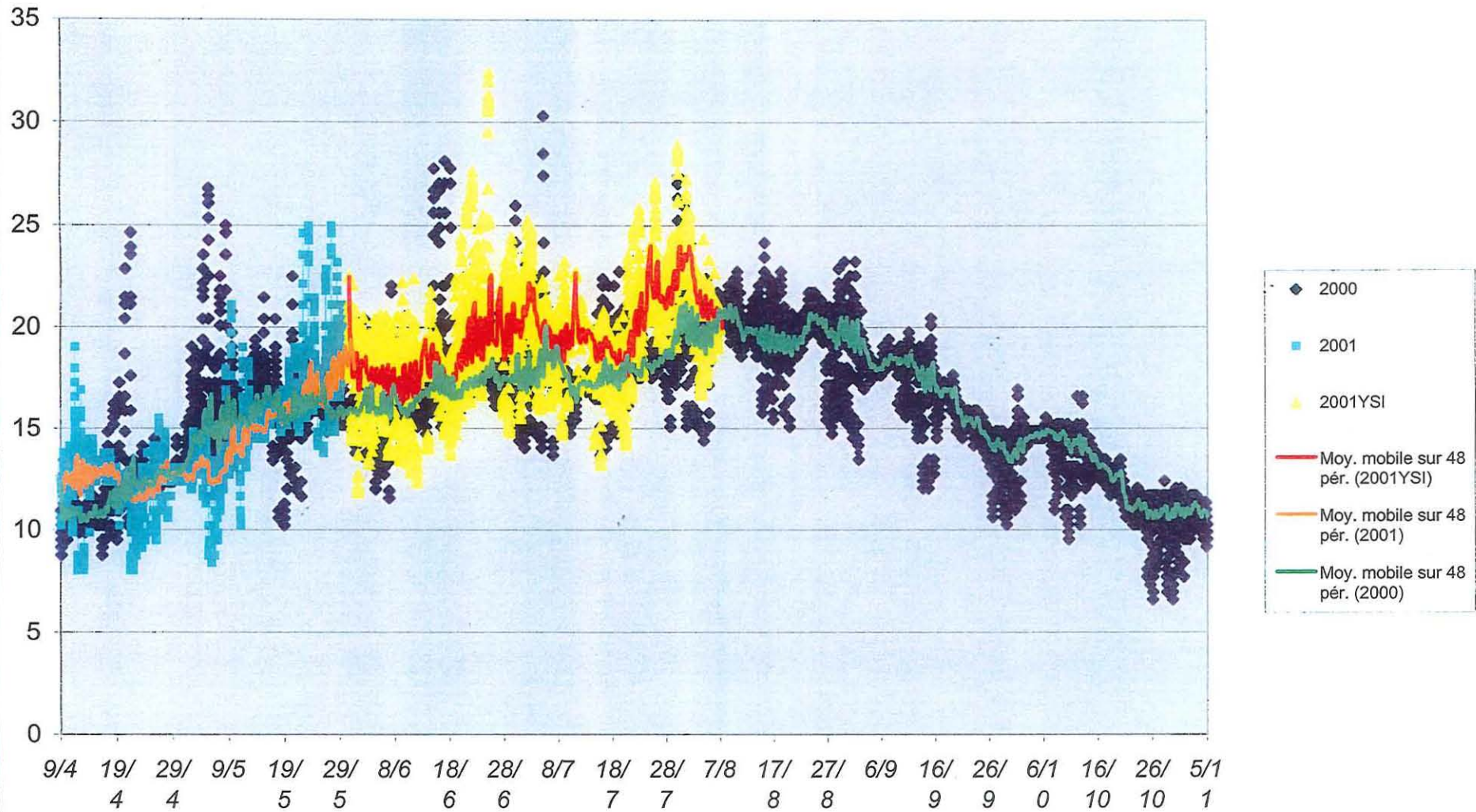


Figure 16 : Données de Température à Fouras (en °C).

Evolution des paramètres environnementaux sur quelques cycles de marée à Fouras en 2001

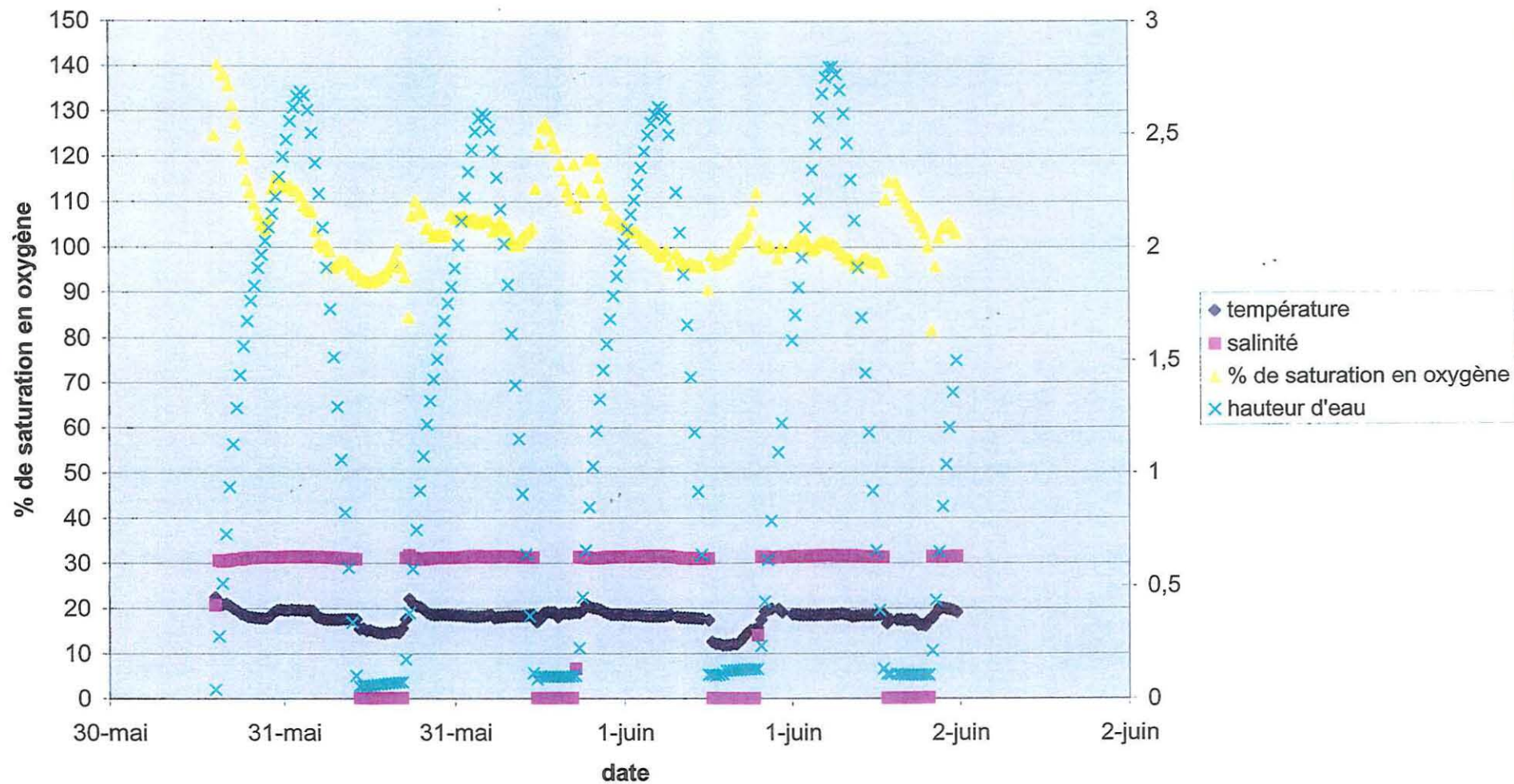


Figure 17 : Evolution des paramètres environnementaux sur quelques cycles de marée à Fouras en 2001.

IV DISCUSSION

IV 1. Les biais de l'échantillonnage

Certains biais occasionnés par le plan d'échantillonnage appliqué lors des suivis de mortalité les années précédentes ont été ici réduits.

En effet, les pratiques zootechniques n'ont plus d'influence puisque les animaux ont une origine commune. Les prélèvements ont été effectués avec un pas de temps restreint à une semaine afin d'augmenter la prévalence. L'échantillonnage «au hasard», a été réalisé au moyen d'un récipient afin d'éliminer l'effet sélectif de la main.

Bien que les biais aient été réduits au maximum, il restera toujours des fluctuations dues à l'échantillonnage au sein de la poche.

IV 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 des mortalités de 30 % en 15 jours, montre l'existence de mortalités anormales sur Fouras. De plus le phénomène a été confirmé auprès des professionnels qui ont constaté des mortalités au même moment.

Le fait de disposer de différents critères de mortalités permet de comparer et de confirmer certains résultats, même s'ils ne sont pas indépendants entre eux. Le critère 3 met en avant l'état moribond de la population. En effet les baillantes, dont leur présence est maximal dès l'augmentation des mortalités, caractérisent la mortalité la plus récente. Ce dernier critère sera donc utile pour décrire le début des mortalités. Le critère 1 est un plus tardif, puisqu'il comptabilise les deux valves, même lorsque la chair a disparu.

Le critère de mortalité 2 met en avant la présence des valves isolées qui traduisent le dernier stade où les mortalités sont encore comptabilisées. Car ensuite les valves finissent par se détruire, et finissent par passer au travers des poches. C'est la raison pour laquelle ce dernier critère sera utile pour décrire la fin de la période estivale.

La décroissance des courbes avec les différents critères de mortalité cumulée est un événement attendu.

Les fluctuations significatives de la mortalité

Il existe lors du comptage de mortalité au laboratoire certains biais. Des erreurs d'estimation due au nombre élevée 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 trouvés les années antérieures (1998 et 1999). Cet effet poche n'est plus imputable à la zootechnie ni à un problème de situation sur la concession. L'hypothèse d'un microenvironnement, d'origine non clairement identifiée (microbisme, charge un tout petit peu différente ?) est donc à étudier de plus près.

L'effet concession est moins évident au cours de cette étude, contrairement aux études de Raude (1999) et d'Allard en 1998. Cet effet concession semble donc plus imputable à un effet de la zootechnie, d'historique des lots, qu'à leur position géographique sur le site.

L'effet d'exondation sur la mortalité n'a pas été détecté. On peut émettre différentes hypothèses : ou bien le déterminisme des mortalités se produit avant le 7 mai, au moment où les huîtres ont été installées, ou bien l'exondation n'est pas un facteur évident impliqué dans les mortalités. En effet, si le temps d'émersion est synonyme de diminution des ressources trophiques on peut aussi imaginer que l'émersion peut avoir des effets favorables sur la survie. Par exemple, le phénomène d'exondation peut être un facteur de mortalité pour des pathogènes (bactéries par exemple) et ainsi jouer en faveur de la survie de l'huître. On peut également supposer que le fait de subir une fermeture hermétique de manière rythmique accentue la tonicité de l'organisme et ainsi pourrait aider l'animal dans sa lutte contre d'autres agressions. Il faut aussi retenir que si le nombre de poches étudié sur les concessions hautes et basses avait été plus élevé, on aurait peut être trouvé une différence significative. Il faut aussi se rappeler que les poches situées dans les zones les plus profondes ont été, en moyenne, deux fois moins manipulées que celles situées aux coefficients faibles d'exondation.

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.

IV 3. Explication de la mortalité sur Fouras

Lien entre mortalité et présence du virus type herpès

Quel que soit l'outil diagnostique 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, situé entre le 19 juin et 3 juillet, est de l'ordre de 16 % (cf. figure n°7), alors que sur la même période le taux de mortalité dépasse les 35 %. La comparaison entre les lots baillants et les lots non baillants montre davantage de positifs sur les huîtres baillantes, mais seulement à un taux de 17%. Bien évidemment il était difficile de qualifier la qualité d'un échantillon de chair d'huître plus ou moins en décomposition pour l'analyse. Enfin les mortalités les plus faibles ont été trouvées sur les lots positifs, ce qui ne rend pas l'association herpès/ mortalités évidente. Il a malgré tout été trouvé davantage de lots positifs qu'en 1999, année où la mortalité était aussi plus faible.

On a mis en évidence la présence du virus (par PCR) dès l'apparition des mortalités, soit à partir du 19 juin 2001 (cf. figure : 13). Le virus précède parfois et accompagne les mortalités. Ceci est vrai pour la détection par PCR et pour les résultats succincts obtenus par HIS. Cette technique est intéressante à exploiter de manière plus approfondie sur l'ensemble des échantillons aux périodes entourant les mortalités, d'une part car les résultats sont cohérents avec ceux de la PCR et d'autre part parce qu'ils permettent de décrire l'infestation à l'échelle de l'individu, et ce développement peut aussi être considéré comme un critère de causalité à considérer (Thébault, 2001). Si le virus envahit tous les tissus juste avant les mortalités, par exemple. Malheureusement, les résultats sont encore partiels. La technique est en effet longue et encore délicate à mettre en place.

On peut donc conclure dans le cadre de cette étude des mortalités estivales à Fouras, que soit le virus herpès évolue à une échelle inférieure à la semaine, alors que les mortalités évoluent sur deux semaines, soit que 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.

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 expliquent les mortalités estivales de naissain à Fouras. Les fluctuations de la température de l'eau et de l'air semblent plus informatives. Comme le temps d'exondation ne semble pas jouer un rôle important, la température de l'eau semble être la paramètre à

surveiller le plus. On trouve des évolutions de températures qui correspondent à des mortalités, quand la température de l'eau excède les 21°C. Ceci est en accord avec des observations qui ont été faites dans le passé à Arcachon (Maurer et al, 1986) et cette année, au cours de mortalités estivales de naissain relativement importantes qui sont intervenues à Arcachon début juillet (Thébault, com pers). Mais il se peut aussi que cette association soit fortuite, car l'élévation de température et un autre phénomène, qui aurait ou n'aurait pas de lien avec cette montée de température, et qui pourraient se produire en même temps. Il faudrait comparer davantage de séries de températures, les comparer aux mortalités estivales sur différents sites, faire des comparaisons valides statistiquement et ne pas oublier d'autres facteurs importants comme la maturation gamétique, l'état des réserves...

Malheureusement nous n'avons pas encore les résultats des études menées sur les autres facteurs. Des études sur l'impact de la zootechnie seraient sûrement aussi à considérer.

CONCLUSION

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

Cette année les études sur Fouras des mortalités estivales de naissain ont pu être plus complètes. Le dispositif ne permettait pas d'étudier l'importance des facteurs zootechniques mais a permis d'étudier beaucoup d'autres facteurs. Le pas de temps de l'étude, réduit à une semaine, a permis de cerner au mieux la période de 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 26 juin.

Le diagnostic du virus Herpès a été fait par deux techniques différentes, mais, qui en première approximation donnent des résultats assez proches. Si la cinétique de détection du virus correspond aux mortalités, les taux observés n'expliquent qu'une partie des mortalités rencontrées. Parmi les facteurs environnementaux, il faut retenir que le temps d'exondation, les variations de la saturation en oxygène et les variations de salinité n'expliquent pas les mortalités sur la période étudiée à Fouras. Par contre l'évolution des températures semble apporter des éléments dont il faut tenir compte, mais qu'il faudra confirmer par d'autres études.

La connaissance des résultats des études menées dans les autres laboratoires dans le cadre du programme MOREST nous apportera sans doute d'autres éléments pour comprendre les mortalités estivales de naissain. Il faudra aussi compléter ce travail par une approche de l'impact de la zootechnie sur les mortalités.

Enfin même si ces résultats pourront peut être expliquer les mortalités sur le site de Fouras, il faudra être prudent avant d'extrapoler ceux-ci sur n'importe quelle autre région et sur n'importe quelle année.

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*, ' , 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 Irdoviridae 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 herpesvirus : 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) Recherches dans des échantillons d'eau de cultures ostréicoles d'ADN de virus type herpes infectant les bivalves marins.

THEBAULT A. (1999), Rapport annuel du réseau national de surveillance zoonositaire 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. 2nd 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

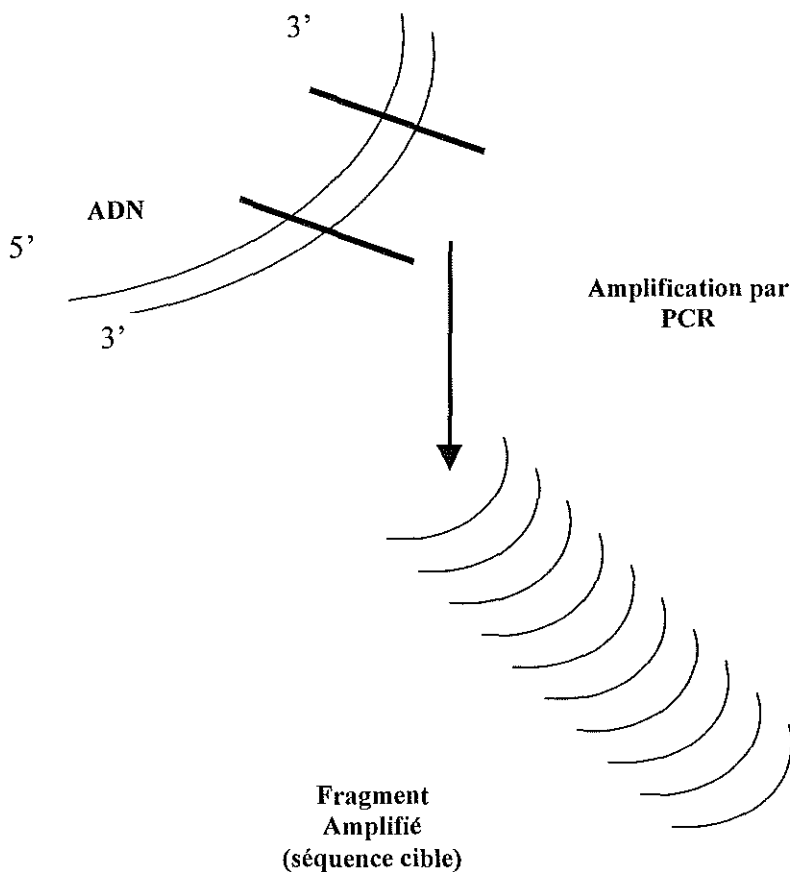
Principe de la PCR POLYMERASE CHAIN REACTION

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.



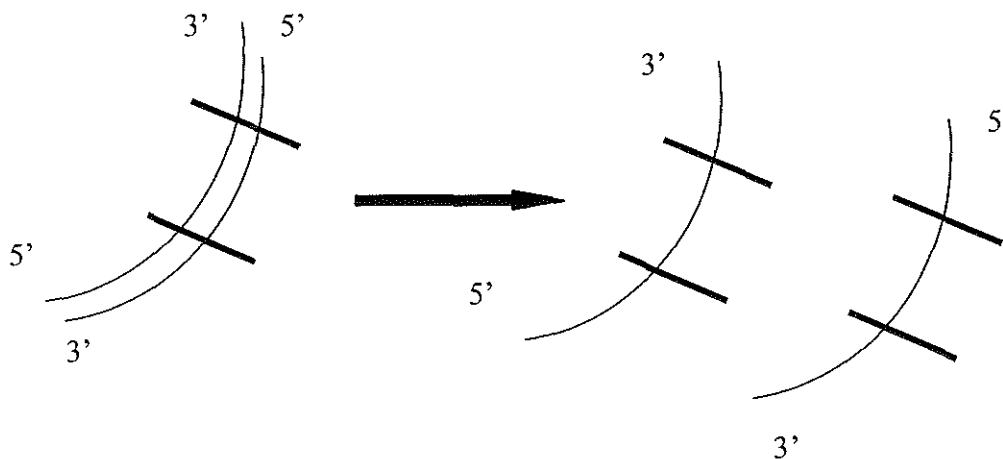
CYCLES DE PCR :

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

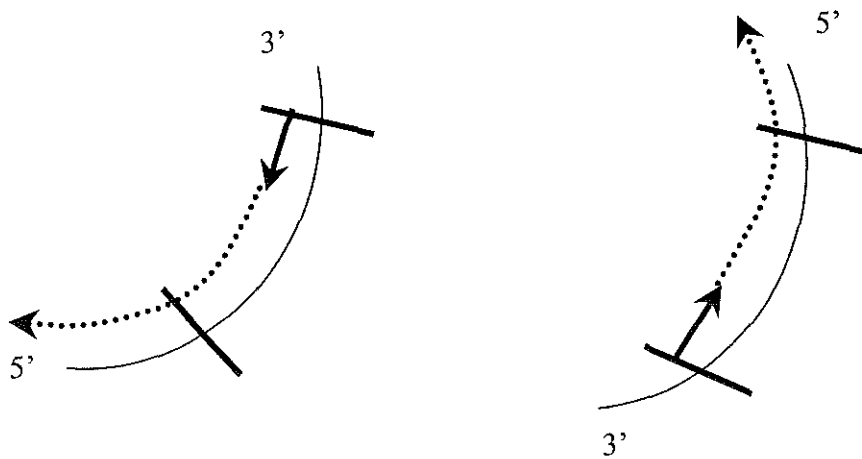
Une minute à 50°C. La température est déterminée d'après la formule empirique « T_m (°C)-5°C », le T_m étant calculé à partir du pourcentage de GC. L'hybridation des amorces se fait de façon spécifique sur l'ADN matrice simple brin, de part et d'autre de la séquence cible à amplifier.

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

PROTCOLE 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°C (en sac plastiques ou piluliers identifiés), le plus rapidement possible après prélèvement.
- 2-Conservation de 3 mois maximum au congélateur à -20°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-Décongélation 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°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 :

X 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.

X 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.

X 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.

X Animaux ≤ T12 déjà réalisée.

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

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

X 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 :

X 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).

X 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, MgCl₂, 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) :

✓ H₂O ⇒ 31.5µl.

✓ Tampon 10X ⇒ 5µl.

✓ DNTPs ⇒ 5µl.

✓ MgCl₂ ⇒ 5µl.

✓ Amorces (OHV3) ⇒ 1µl.

✓ Amorces (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 5.10⁷ 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 μ l de BET.

3-Deposer des gouttes (2 μ l avec une P20) de tampon de dépôts (bleu de charge) sur un parafilm.

4-Ajouter 10 μ 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 μ 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 5.10⁷ 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

HYBRIDATION IN SITU

2 bains de Xylène 5 minutes chacun

2 Bains d'alcool 100° 5 minutes chacun

Séchage à l'air 15 minutes

200 L par lame de Protéinase K à 100 µg/mL. 30minutes à 37°C en chambre humide.

Bain de tris Na Cl (0.1/0.1)

1 bain d'alcool 95°

1 bain d'alcool 100

200µ L par lame de tampon d'hybridation. 30 minutes à 42°C.

Dénaturation 5 minutes à 95°C

Hybridation : 50µ L de sonde et 50µ L de tampon d'hybridation par lame. 42°C en chambre humide sur une nuit

Lavage en SSC 1X rajouté à 0.2 % de Bovin Sérum Albumine. 10 minutes à 42°C

Saturation en Régilait 6% en PBS 1X

Incubation de l'Anticorps Ir AntiDIG dilué au 300^{ième} dans du PBS 1X. 1heure à température ambiante

6 lavages de 5 minutes en PBS 1X

Incubation de l'anticorps Ir Peroxydase dilué au 400^{ième} en PBS 1X. 1 heure à température ambiante

Révélation au Di Amino Biphényl (DAB). 10mg de DAB, 15 ml de PBS 1X et 30 µL de H2O2.

2 lavages de 5 minutes en PBS 1X

Contre coloration au bleu de Unno

Montage au xylène

o

Annexe 5

Composition du fixateur Davidson

-Pour 5 Litres :

- Eau de mer filtrée1760 ml
- Glycérol.....588 ml
- Formol.....440 ml
- Alcool à 95°1760 ml
- Acide acétique cristallisable.....455 ml
(=10% du volume eau+alcool+formol+glycérol)

Annexe 6

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.