

Direction DRV-RA
Laboratoire de Génétique et Pathologie

LAMOTHE Julien

Rapport de stage
Juillet-Août 2001
Licence de Biologie des Organismes
Université de La Rochelle

ifremer

Suivi pathologique du développement larvaire dans les bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie des Invertébrés marins de la station IFREMER de Ronces les Bains.

Je remercie André Gérard pour m'avoir permis de passer ces deux mois au sein de ce laboratoire.

Un grand merci à Anne Thébault, pour m'avoir encadré au cours de ce stage, ainsi que pour toute l'attention portée à la rédaction de ce rapport.

Mes plus vifs remerciements vont à Maeva, merci pour son aide, son enseignement des techniques expérimentales et sa bonne humeur.

Je tiens aussi à apporter toute ma sympathie à l'ensemble des membres du Laboratoire de la Direction Environnement Littoral : Pascale Malestroit, Jean-Côme Piquet, Olivier Courtois et Didier Roesberg (merci pour l'accostage mouvementé et quelque peu humide) qui se sont relayés, à mes côtés, durant la traque estivale des larves sauvages.

Je n'oublie pas Jean-Luc Seugnet, l'amiral du « Mélosira », pour sa simplicité et ses connaissances du bassin de Marennes-Oléron (Surtout les bons coins de pêche pour le bar...).

Je remercie également, Isabelle Auby et Danièle Maurer du Laboratoire de la Direction Environnement Littoral d'IFREMER Arcachon pour l'ensemble des données sur les pêches de larves dans le bassin girondain.

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de la station, titulaires ou stagiaires, pour leur accueil et leur sympathie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
CONTEXTE DE L'ÉTUDE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	5
I. HÔTE, MILIEU ET AGENT.....	5
1. <i>Modalités de la reproduction et du développement larvaire chez l'huître creuse, Crassostrea gigas.....</i>	<i>5</i>
a. <i>Différenciation sexuelle.....</i>	<i>5</i>
b. <i>La Gamétogenèse.....</i>	<i>5</i>
c. <i>La ponte.....</i>	<i>6</i>
d. <i>Fécondation et vie larvaire.....</i>	<i>6</i>
2. <i>Description physique des zones de captage et influence des facteurs abiotiques sur l'huître creuse.....</i>	<i>8</i>
a. <i>Description des Bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron.....</i>	<i>8</i>
Le Bassin de Marennes-Oléron.....	8
Le bassin d'Arcachon (d'après Manaud et coll., 1997).....	8
b. <i>Les Facteurs Environnementaux contrôlant le cycle de reproduction de Crassostrea gigas.....</i>	<i>8</i>
Température.....	9
Salinité.....	9
Nutrition larvaire.....	9
Les pollutions.....	10
La prédation et la compétition trophique.....	10
L'hydrodynamisme.....	10
3. <i>Caractéristiques des virus appartenant à la famille des Herpesviridae.....</i>	<i>11</i>
a. <i>Propriétés structurales.....</i>	<i>11</i>
b. <i>Réplication et cycle viral.....</i>	<i>12</i>
c. <i>Latence virale.....</i>	<i>12</i>
d. <i>Infections à virus de type Herpès observées chez les Huîtres creuses.....</i>	<i>13</i>
II. OPTIMISATION DE L'OUTIL DIAGNOSTIQUE.....	14
1. <i>Bilan du suivi depuis 1998.....</i>	<i>14</i>
2. <i>Limites de la technique d'analyse.....</i>	<i>14</i>
MATERIEL ET METHODE.....	16
I. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE.....	16
II. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	17
1. <i>Prélèvements des larves.....</i>	<i>17</i>
2. <i>Numération des larves.....</i>	<i>20</i>
3. <i>Tri des larves.....</i>	<i>20</i>
III. TECHNIQUES D'ANALYSE.....	20
1. <i>La Polymerase Chain Reaction (PCR).....</i>	<i>20</i>
2. <i>Technique de PCR appliquée à la détection de virus de type Herpès (cf Annexe 1).....</i>	<i>21</i>
IV. MODÉLISATION HYDRODYNAMIQUE DU DEVENIR DES LARVES DANS LE BASSIN DE MARENNES-OLÉRON.....	22

RÉSULTATS	23
I. GÉNÉRALITÉS SUR LE DÉVELOPPEMENT LARVAIRE DANS LES BASSINS DE MARENNES-OLÉRON ET D'ARCACHON	23
1. <i>Le bassin de Marennes-Oléron</i>	23
2. <i>Le bassin d'Arcachon</i>	26
II. EVOLUTION DES LARVES À ARCACHON ET EN CHARENTE AU COURS DE L'ANNÉE 2001	29
1. <i>Variation temporelle des populations larvaires dans le bassin de Marennes-Oléron (cf figure 11)</i>	29
2. <i>Conditions Physico-chimiques du milieu dans le bassin de Marennes-Oléron</i>	30
3. <i>Variation temporelle des populations larvaires dans le bassin d'Arcachon (cf figure 14)</i>	31
III. RÉSULTATS DE L'EXAMEN MACROSCOPIQUE DES LARVES VIVANTES	31
IV. RECHERCHE DE VIRUS DE TYPE HERPÈS PAR PCR SUR DU MATÉRIEL CONGELÉ	32
DISCUSSION	33
I. INTERPRÉTATION DES COURBES DE DÉNOMBREMENT LARVAIRE DANS LES BASSINS D'ARCACHON ET DE MARENNES-OLÉRON	33
II. DIFFICULTÉS DE LA DÉTECTION DU VIRUS DE TYPE HERPÈS SUR LES LARVES DU MILIEU NATUREL	34
III. DIFFICULTÉ D'ÉTABLIR UN LIEN ENTRE LA DÉTECTION DU VIRUS HERPÈS ET UNE MORTALITÉ LARVAIRE.....	35
CONCLUSION.....	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les transferts de coquillages sont fréquents dans les pratiques ostréicoles. L'histoire de l'exploitation conchylicole est jalonnée d'importantes épizooties principalement dues à des introductions d'huîtres infectées (Grizel, 1996). L'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, a ainsi totalement disparu à la fin des années 70 en conséquence de la maladie des branchies provoquée par un virus et a dû être remplacée par l'espèce *Crassostrea gigas* (Grizel, 1996). Antérieurement, l'huître plate, *Ostrea edulis*, a subi coup sur coup, deux maladies dues à des protozoaires parasites : la Martéiliose et la Bonamiose (Grizel, 1996).

L'ostréiculture repose, aujourd'hui, presque exclusivement sur une seule et même espèce : l'huître creuse ou japonaise, *Crassostrea gigas*. Cette situation de l'élevage nécessite un suivi strict du bivalve sur lequel s'appuie localement tout un secteur économique.

Après son introduction en 1970, seuls deux secteurs se révèlent permettre un cycle de reproduction complet aboutissant à un recrutement annuel régulier sur lequel est basé 90 % de la population française. Ainsi, des populations naturelles ont pu s'établir en Charente-Maritime (Bassin de Marennes-Oléron) et en Gironde dans le Bassin d'Arcachon. Ces zones sont, par conséquent, d'importances majeures pour le captage des larves d'huîtres creuses car le naissain qui en est issu est ensuite déplacé ou vendu sur toutes les côtes françaises.

Depuis 1991, de fortes mortalités sporadiques de larves d'huître creuse, ont été observées au cours de l'été dans différentes écloséries françaises. Ces mortalités ont été associées à la détection d'un virus en microscopie électronique à transmission. Ce dernier du fait de ces caractéristiques morphologiques et de son cycle de développement semble apparenté à la famille des *Herpesviridae*. Le pouvoir pathogène de cet agent viral a été démontré par reproduction expérimentale de mortalité sur des larves axéniques.

En 1996, le protocole de détection du virus de type Herpès a été amélioré sur des larves d'éclosérie, avec en particulier, la mise en œuvre de la technique d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Renault *et coll.*, 2000). Cette méthode fiabilisée permet le traitement rapide d'un grand nombre d'échantillons.

Le recrutement des larves de *Crassostrea gigas* est assez variable d'une année sur l'autre et d'un secteur à l'autre.

En 1998, un faible captage de naissain d'huîtres creuses a été observé dans le bassin d'Arcachon. Aucune analyse n'a alors relevé la présence du virus Herpès dans les larves. Cependant, en l'absence d'analyses poussées et en raison de la méconnaissance des facteurs influant sur l'activité pathogène de ce virus, il était impossible de savoir s'il était ou non impliqué dans ces mortalités. De nombreuses autres hypothèses de mortalité pouvaient expliquer par ailleurs ce déficit de captage : conditions physico-chimiques ou hydrologiques du milieu, défaut de l'alimentation larvaire, contamination par un polluant (Auby *et coll.*, 2000).

En 2000, l'étude d'un échantillon de larves du bassin d'Arcachon a révélé un résultat positif pour la détection d'ADN de type Herpès.

Cette étude s'inscrit dans la poursuite du suivi de détection virale sur les larves de *Crassostrea gigas* à Arcachon et en Charente, devenu systématique depuis 1999 (Thébault, 2000).

Elle a, tout d'abord pour objectif d'optimiser le protocole de détection sur des larves du milieu naturel.

Les résultats obtenus permettront alors de tester la reproductibilité de la mise en évidence du virus dans l'échantillon positif en 2000, et de tester d'autres sites.

De plus, ce suivi pathologique, mis en parallèle avec les observations sur l'évolution des populations du milieu naturel, permettra peut être de préciser les relations entre la présence de l'agent infectieux et son impact sur le développement larvaire.

Enfin, la détection de virus de type Herpès dans les larves du milieu naturel pourrait corroborer l'hypothèse d'une transmission verticale de l'agent infectieux.

CONTEXTE DE L'ETUDE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Hôte, Milieu et Agent

L'étude des causes de mortalité et en particulier de l'implication du virus Herpès dans celles-ci impliquent de connaître les trois compartiments hôte, agent, milieu (Toma et coll., 2001). D'autre part il faudra essayer de comprendre dans un second temps les relations respectives entre ces trois éléments.

Les caractéristiques de *Crassostrea gigas* et notamment de sa reproduction, sont particulièrement importants pour expliquer l'allure des distributions de larves au cours de l'été.

Une fois les larves émises dans le milieu, il faudra essayer de comprendre quels sont les facteurs environnementaux susceptibles de provoquer des mortalités.

Le rôle potentiel de l'Herpès sera ensuite étudié.

1. Modalités de la reproduction et du développement larvaire chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

a. Différenciation sexuelle

L'huître japonaise est hermaphrodite avec sexualité alternative irrégulière. L'inversion de sexe se produit au cours d'une saison de reproduction ou au cours de saisons consécutives. Cette différenciation sexuelle peut s'apparenter à de la protandrie, avec un grand nombre d'individus mâles (70 %) dans la première année et une majorité d'individus femelles dans les populations plus âgées (His et Cantin, 1995)

Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe sont encore mal connus. Cependant, certains facteurs externes (température, nutrition) sont susceptibles de déclencher les changements de sexe et même d'influencer fortement le sex-ratio (Gérard *et coll.*, 1995 ; Lango-Renoso *et coll.*, 1999).

b. La Gamétogenèse

L'appareil reproducteur est réduit aux gonades, structures acino-tubulaires situées dans la région dorso-péricardique. Les gonades ne constituent pas un organe anatomiquement distinct.

Après une activité réduite de la gonade pendant l'automne et l'hiver, la gamétogenèse redevient très active entre les mois de mars et d'avril. La maturité sexuelle est alors atteinte en juillet.

Le cycle de maturation commence par une accumulation de glucides (glycogène) qui seront rapidement métabolisés en lipides (vitellogenèse) dans les mois qui précèdent la ponte (Gabbot, 1975 ; Maurer et Borel, 1986 ; Deslous-Paolis, 1980). Ainsi, le contenu maximal en glucides est atteint au début du printemps (10 à 22 % du poids sec). Les plus fortes teneurs en lipides sont observées avant la première ponte atteignant 13 à 20 % du poids sec, pour redescendre à 6 % juste après le frai (Manaud *et coll.*, 1997).

c. La ponte

Après avoir atteint leur maturité sexuelle, les huîtres sont dans une phase instable où elles sont sensibles à des variations des facteurs externes qui peuvent déclencher la ponte. Une épaisse couche blanc crème enveloppe la masse viscérale ; les huîtres sont alors dites « laiteuses ».

La saison de reproduction dans le bassin de Marennes-Oléron s'étend de mi-juin à début septembre. La date de déclenchement des premières pontes est liée à la température de l'eau (Manaud *et coll.*, 1997). Selon les années, les pontes peuvent être massives ou diffuses. Au cours d'une même saison de reproduction, un individu peut pondre de 4 à 9 fois (His, 1991), l'huître reconstituant des produits sexuels entre les différentes pontes.

Tableau 1 : Stades de cycle sexuel chez *Crassostrea gigas*
(d'après His et Cantin, 1995)

Stades	Descriptif de l'état de la gonade
0	Gonade vide ; correspond au repos sexuel ou à la fin de l'expulsion des gamètes
1	Début de la gamétogenèse ; multiplication des gonies
2	Gonade bien développée, mais la dissociation des gamètes reste difficile
3 ₁	Etat moyen de réplétion de la gonade ; gamètes abondants et facilement dissociables
3 ₂	Etat maximum de réplétion ; gonade hypertrophiée ; couche blanc-crème épaisse entourant la masse viscérale ; gamètes très abondants.
4	Stade d'émission des gamètes ; il y a régression du volume de la gonade.
5	Déplétion presque complète ; animal maigre ; stade se confondant avec le stade 0.

d. Fécondation et vie larvaire

Dans les 24 heures qui suivent la fécondation (réalisée dans l'eau environnante), la larve d'huître, ou véligère, est formée, après un rapide passage par le stade trochophore.

Cette larve présente une coquille à deux valves, reliées par une charnière, qui lui donne une forme de D majuscule, d'où son appellation de larve D (*cf photo 1*). Sa hauteur est alors d'environ 60 µm. Le velum, voile cilié qui se déploie hors de la coquille, permet d'imprimer une certaine mobilité à la larve et assure la captation de sa nourriture. L'appareil digestif larvaire est aussi en place sous sa forme définitive (*cf photo 2*).

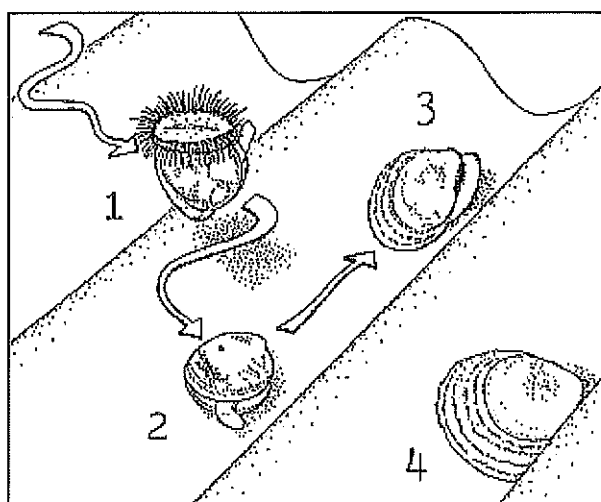
La durée de la vie pélagique de la véligère est fonction de la température et de la quantité de nourriture disponible dans le milieu. Elle est le plus souvent de 21 jours (His et Cantin, 1995).

Au cours de sa vie pélagique, la larve grandit et subit des modifications (*cf Annexe 4*). Vers le sixième jour du développement, l'umbo ou crochet apparaît au niveau de la charnière, la larve est dite umbonée. Elle dépasse alors la hauteur de 110 µm. Ensuite, une tache oculaire apparaît au niveau des premières ébauches branchiales (*cf photo 3*), la larve est alors dite ocellée (hauteur supérieure à 250 µm). Lors de cette phase, la larve devient exotrophe stricte après avoir épuisée la totalité de ces réserves vitellines (Auby *et coll.*, 2000). La dernière phase de la vie pélagique, la larve est pédivéligère (hauteur de 300 µm) caractérisée par le développement d'un pied (*cf photo 4*). Cet appendice permet, de part ses rôles sensitif et

glandulaire, la fixation de la larve sur un support solide. Le phototropisme de la larve devient alors négatif et elle cherche un support pour se fixer. Cette modification s'accompagne d'une migration dans les couches plus profondes de la colonne d'eau. La larve passe alors d'une phase pélagique à une vie benthique. Cette transition dans le développement de la larve correspond aussi à un changement du mode de déplacement qui devient de plus en plus actif avant l'immobilisation totale de l'animal.

Après sa fixation, la larve subit une métamorphose avec disparition des palpes labiaux et du velum et développement des branchies.

C'est à ce stade que les larves peuvent être captées sur des collecteurs (cf photos 5 et 6)



- 1 : larve pédivéligère nageuse,
- 2 : larve rampant sur le support à l'aide de son pied,
- 3 : larve fixée par le bord de la coquille,
- 4 : larve en croissance s'étalant sur le collecteur.

Figure 1 : Schéma représentant les différentes phases de la fixation des larves d'huîtres sur un collecteur (d'après Joly *et coll.*, 1989).

Une terminologie particulière, basée sur la taille des larves, est employée par les biologistes conchylicoles (tableau 2).

Tableau 2 : Stades employés par les biologistes conchylicoles pour décrire le développement larvaire de *Crassostrea gigas* et leurs équivalences avec les appellations des malacologistes (His, 1991).

Nombre de jours après la fécondation	Appellation des malacologistes	Hauteurs (µm)	Stades des biologistes conchylicoles	Hauteur (µm)
1 à 6	Véligères – Larves D	57 - 105	Petites	57 – 105
6 à 18	Véligères umbonées	105 - 260	Evoluées Moyennes Grosses	105 – 150 150 – 235 235 - 260
18 à 22	Véligères ocellées	260 - 280	En fixation	> 260
22 à 24	Pédivéligères	280 - 300	En fixation	> 260
> 24	Plantigrades	> 300	Naissains	> 300

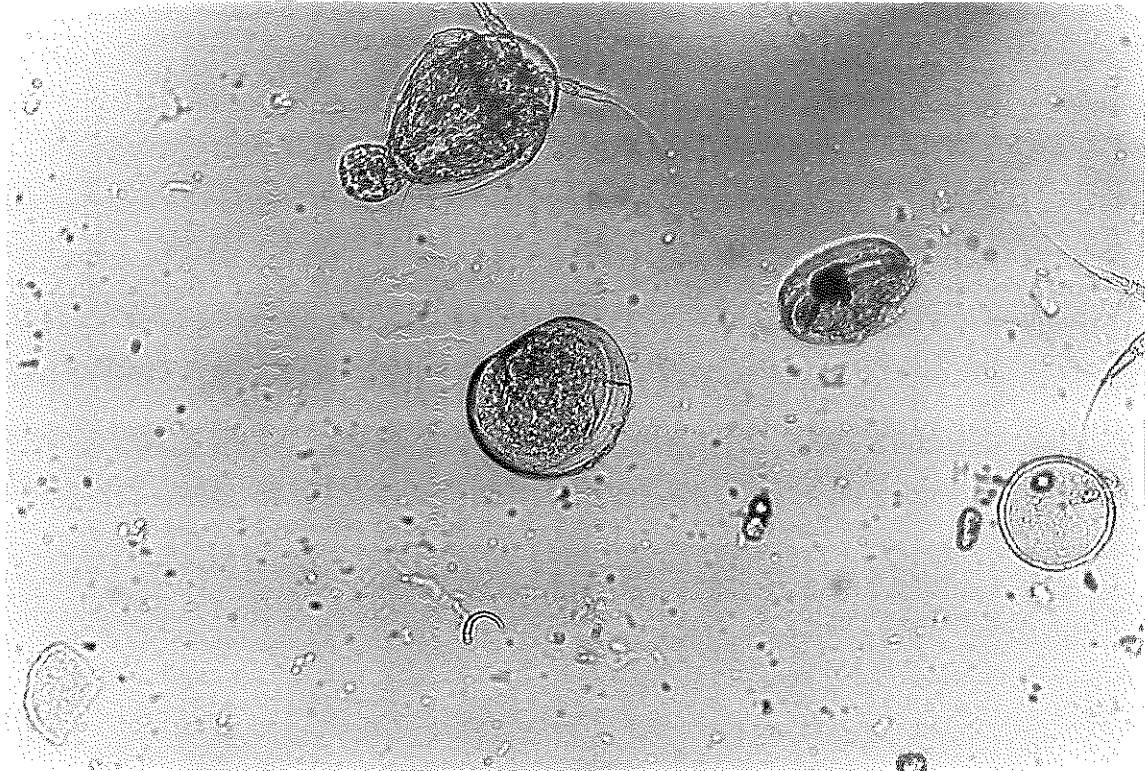


Photo 1 : Larve D de *Crassostrea gigas* ($\times 100$)



Photo 2 : Larve au stade « petite » de *Crassostrea gigas* ($\times 200$)



Photo 3 : Véligères oillées de *Crassostrea gigas* ($\times 200$)



Photo 4 : Pédiveligières de *Crassostrea gigas* en fixation ($\times 100$)



Photo 5 : Coupelles collecteurs utilisées pour le captage naturel de *Crassostrea gigas*

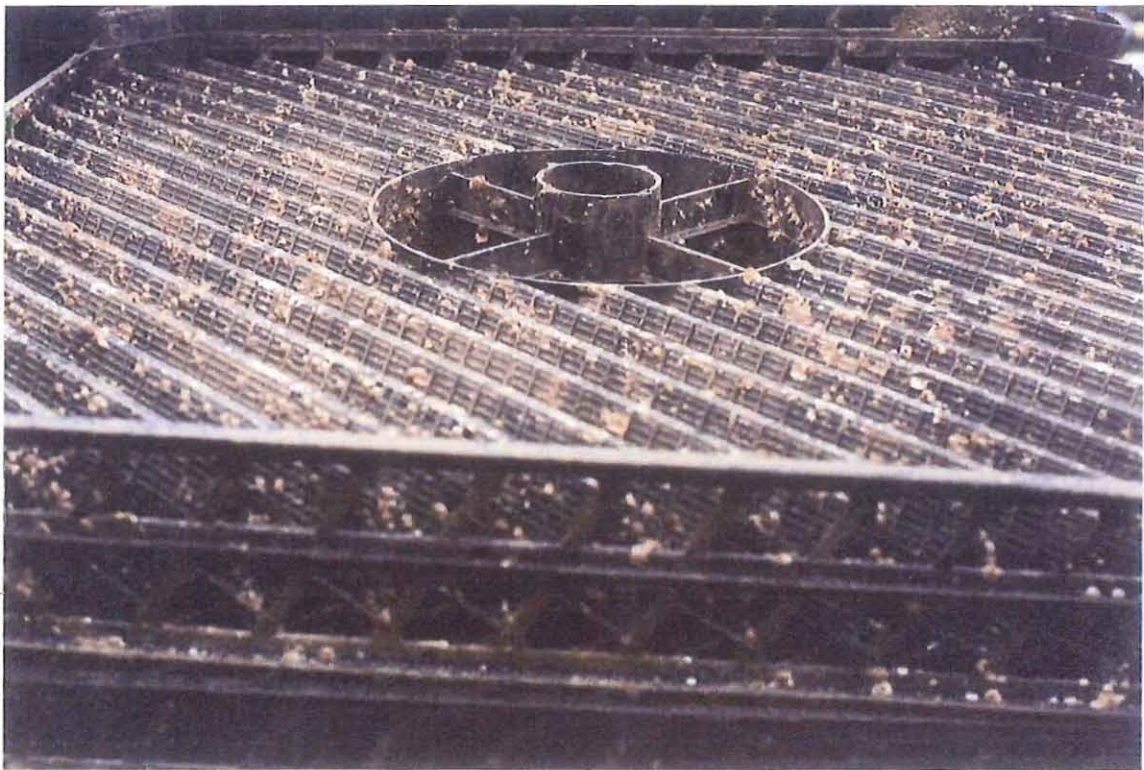


Photo 6 : Cadres plénaux utilisés pour le captage naturel de *Crassostrea gigas*

2. Description physique des zones de captage et influence des facteurs abiotiques sur l'huître creuse

a. Description des Bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron

Le Bassin de Marennes-Oléron

Le bassin de Marennes-Oléron forme une vaste baie limitée, à l'ouest par l'île d'Oléron qui le protège des vents dominants et des effets de la houle atlantique. Il est bordé par la côte continentale à l'est et au sud. Il reçoit les eaux de la Charente au nord et de la Seudre au sud, mais aussi celles de nombreux ruisseaux collecteurs et des marais qui bordent les rivages. Largement ouvert au nord par le pertuis d'Antioche, il communique seulement, au sud par une passe étroite, le pertuis de Maumusson. Cette topographie particulière influence son hydrologie.

Cette hydrologie s'apparente au régime des eaux d'estuaire. Les apports d'eau douce par la Seudre et la Charente affectent principalement la salinité des eaux à leur embouchure qu'à proximité des pertuis où l'influence océanique est prépondérante. Ainsi, au milieu du bassin, la salinité peut descendre à 15 ‰ en période de crue, et elle dépasse rarement 32 à 33 ‰ en été.

La température oscille généralement entre 6 et 23 °C.

La configuration géographique du secteur et les apports de matières en suspension par les eaux fluviales concourent à l'envasement du bassin particulièrement dans les zones à faible courant. Le bassin de Marennes Oléron est un peu comme un entonnoir dont la partie la plus étroite se situe dans le Pertuis de Maumusson.

L'hétérogénéité du milieu, dans l'espace et le temps explique en grande partie comment le bassin de Marennes-Oléron peut être si favorable au captage, à l'élevage ou à l'affinage des huîtres et connaître cependant des périodes difficiles.

Le bassin d'Arcachon (d'après Manaud et coll., 1997)

Le bassin d'Arcachon présente une forme triangulaire dont la surface avoisine les 15 500 ha dont 5 000 ha de bancs de sables et de vase qui émergent entre les chenaux à marée basse. Il communique avec l'océan par de nombreuses passes encombrées de bancs de sable particulièrement instables. Il reçoit les eaux de plusieurs cours d'eau dont l'Eyre est le principal.

Les variations de température saisonnières sont importantes, particulièrement pendant les grandes marées. C'est une conséquence de la nature du sol. En effet, le sable subit rapidement les variations de la température de l'air. Les températures moyennes varient entre 8 et 21 °C.

Les salinités moyennes oscillent de 26 à 33 ‰. L'influence des eaux douces se fait sentir dès le début de l'automne sur la côte sud ; sur la côte ouest à la fin de l'hiver et enfin dans la zone centrale du bassin au printemps.

La vitesse des courants est généralement faible en période de mortes-eaux (0,30 à 0,40 m/s). Elle double en vives-eaux pour atteindre 2 m/s, à la surface des grands chenaux.

b. Les Facteurs Environnementaux contrôlant le cycle de reproduction de *Crassostrea gigas*

La durée de vie larvaire et le taux de survie sont conditionnés par des facteurs climatiques (température et salinité), des facteurs nutritionnels (quantité et qualité de

nourriture disponible) et les mortalités provoquées par des maladies, les prédateurs ou les compétiteurs.

Température

Les études de Héral sur le bassin de Marennes-Oléron, en 1986, confirment les résultats des travaux postérieurs de Lubet (1980). En effet, il existe des corrélations négatives entre les températures automnales et printanières précédant la ponte et la date de celle-ci. Ainsi, les températures automnales sont d'une grande importance dans le déclenchement de la gamétogenèse comparées à la relative indépendance des conditions hivernales.

En fait, la reprise de l'activité germinale (hiver) est indépendante de la température du milieu. Elle se produit grâce à la mise en place d'un programme complexe endocrinien établi à la fin du cycle sexuel précédent. Cependant, la température a un impact direct sur la vitesse de la gamétogenèse au printemps dans une limite inférieure de 15°C, en dessous desquels la gamétogenèse ralentie (Mann, 1979). La durée de maturation est donc d'autant plus courte que la température est élevée sans dépasser les 25°C.

Les durées de vie larvaire sont thermodépendantes atteignant 15 jours à 24-25°C et 28 jours à 20-22°C. Selon une série d'expériences réalisées *in vitro* par His *et coll.* (1989), le préférendum de température des larves, pour lequel la croissance est maximale, est de 30°C. Ainsi, les températures élevées, en réduisant la durée de vie larvaire, augmentent par la même les taux de survie dans les populations larvaires.

Dans les conditions les plus favorables, les taux de survie dans le milieu naturel seraient de 10 % (Gouletquer, 1995)

Salinité

L'huître creuse se reproduit dans une gamme très large de salinité (10 à 30 ‰). La croissance la plus élevée est observée aux salinités de 25 ou 30 ‰ en fonction de la température.

La température et la salinité ont des effets combinés sur la régulation du cycle sexuel. En effet, selon Marteil (1976), plus les salinités sont élevées en cours de maturation et plus les températures requises pour la ponte sont fortes.

L'optimum pour la survie larvaire dans le bassin de Marennes-Oléron est estimé à 25 ‰ pour une température de 20 à 21°C (Héral, 1990).

Nutrition larvaire

Le développement larvaire présente plusieurs périodes distinctes. La première correspond à la phase endotrophe pendant laquelle les réserves vitellines de l'œuf sont utilisées (1 à 2 jours). La deuxième correspond à la phase mixotrophe, pendant laquelle les éléments exogènes commencent progressivement à être ingérés, en plus des réserves. Enfin, la larve devient exotrophe et se nourrit exclusivement à partir du milieu extérieur (His, 1991).

L'ultraplancton (2 à 10 µm) et le nanoplancton (10 à 20 µm) sont les composants majeurs du régime alimentaire des larves de bivalves. Les bactéries et le picoplancton (< 2 µm) constituent plutôt un complément alimentaire d'autant plus important que la larve est peu évoluée.

La disponibilité de nourriture durant les premiers jours de la vie pélagique est probablement d'une importance primordiale pour le succès du recrutement ultérieur.

Les larves se nourrissent de phytoplancton, de matière organique dissoute, de bactéries ou de protozoaires.

La relation entre la nutrition, la croissance et le développement larvaire ne dépend pas simplement de l'abondance et de la composition du phytoplancton mais aussi de l'accessibilité des algues (taille, forme, densité) en liaison avec le comportement alimentaire des larves (Boidron-Metairon, 1995).

En effet, la température est un des paramètres qui influence très fortement le développement du phytoplancton.

Les pollutions

Les bassins concernés dans le captage naturel des larves d'huîtres creuses sont soumis à différents types d'activités polluantes. Ainsi, les activités culturales des bassins versants comme l'agriculture et la sylviculture (Arcachon) utilisant des pesticides et des engrais ont un impact important sur le milieu.

Autour des bassins, la démoustification est aussi très répandue pour prévenir des éclosions massives d'Insectes. Ainsi de façon mensuelle à partir du mois de janvier, du téméphos ou de la delthaméthrine, un inhibiteur de l'acétylcholine, sont répandus sur les zones de ponte (Auby *et coll.*, 2000).

Le nautisme représente aussi une source de pollution ayant trois origines possibles : le rejet de polluants organiques et bactériens par suite de l'habitation des bateaux ; le rejet d'hydrocarbure, d'oxyde d'azote, de plomb et de particules liées au fonctionnement des moteurs ; la dissolution des anodes de protection et des peintures antisalissure. Ces substances peuvent avoir un impact considérable sur l'écosystème et perturber l'économie ostréicole (crise du tributylétain qui a marqué l'ostréiculture arcachonnaise).

L'ensemble de ces polluants peut agir à différents niveaux du cycle de développement de l'huître creuse. En effet, ils affectent tout d'abord les adultes en réduisant la production des gamètes. De plus, de part le mode de fécondation externe, divers contaminants peuvent inhiber cette dernière à des concentrations infralétales en intervenant directement sur les gamètes. Différents composés (insecticides organochlorés, métaux ou composés organométalliques) sont aussi susceptibles d'altérer la croissance des larves.

A ces actions directes sur l'huître creuse s'ajoute aussi des effets indirects, qui, en touchant les espèces planctoniques, peut affecter la nutrition des larves.

La prédation et la compétition trophique

Les larves d'huître creuse, qui naissent et se développent pendant l'été, ne sont donc qu'une composante du compartiment zooplanctonique. Parmi les facteurs explicatifs du développement de ces larves, il convient donc de prendre en compte l'abondance des autres organismes planctoniques, qu'ils soient prédateurs (aptés à consommer les larves d'huîtres), compétiteurs trophiques (aptés à consommer la même nourriture que les larves) ou compétiteurs spatiaux (aptés à limiter la fixation des larves). Ainsi, les Protozoaires (Foraminifères, Tintinnides), les organismes méroplanctoniques (Annélides, Phoronidiens, Gastéropodes), les nauplii de Copépodes, les Cirripèdes, les Appendiculaires, ainsi que l'ensemble des espèces fixées sont considérés comme potentiellement compétitrices des larves d'huître. Les Noctiluques, les Siphonophores, les Cladocères, les Copépodes de taille supérieure à 200 μm , les larves zoé de Décapodes et les Chaetognathes sont eux assimilés à des taxons prédateurs des larves de *Crassostrea gigas* (Auby *et coll.*, 2000).

L'hydrodynamisme

Les larves, grâce à leur couronne ciliée ou velum, sont capables de mouvements de faible amplitude dans toutes les directions, elles restent cependant à la merci des courants

existant dans les bassins, comme tout organisme planctonique . Ainsi, il a été démontré dans certains estuaires (étude sur la rivière d'Auray par Marteil, 1960) que la distribution des larves coïncidait avec les données hydrographiques, leur densité diminuant régulièrement à l'approche de l'embouchure où les courants sont plus forts. Il existe aussi des différentiels de densité en fonction du cycle des marées, les plus fortes concentrations se produisant en période de mortes-eaux (Marteil, 1960). En revanche, les phénomènes sont plus complexe dans les bassins (Arcachon et Marennes-Oléron), parsemés de chenaux délimitant des bancs où les géniteurs se répartissent inégalement. La distribution des larves ne coïncide pas alors totalement avec les données hydrographiques et elle semble être essentiellement fonction du secteur de production des larves (Marteil, 1976). La distribution horizontale des larves émises est donc aussi un paramètre important dans le captage du naissain. En effet, la courantologie locale peut entraîner les larves dans des zones défavorables pour la fixation.

Outre l'action de ces facteurs physiques et physiologiques influants sur le développement larvaire, il a été démontré expérimentalement que le virus de type herpès peut être à l'origine de mortalités chez les larves de *Crassostrea gigas*.

3. Caractéristiques des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

a. Propriétés structurales

Les Herpèsvirus sont caractérisés par la présence de quatre éléments structuraux majeurs :

- Le nucléoïde ou core correspond au support de l'information génétique. Il s'agit d'un ADN bicaténaire linéaire.
- La capsidie protéique est caractéristique de cette famille de virus. Elle présente une structure icosaédrique constituée de l'assemblage de 12 pentamères et de 150 capsomères hexamériques (Wildy et Watson, 1963).
- Le tégument correspond à une structure fibreuses située entre la capsidie et l'enveloppe (Roizman et Furlong, 1974).
- L'enveloppe, élément indispensable à l'infectiosité, confère sa maturité à la particule virale et détermine l'aspect sphérique du virus. Elle dérive des membranes cellulaires et est caractérisée par la présence de lipides et de protéines virales.

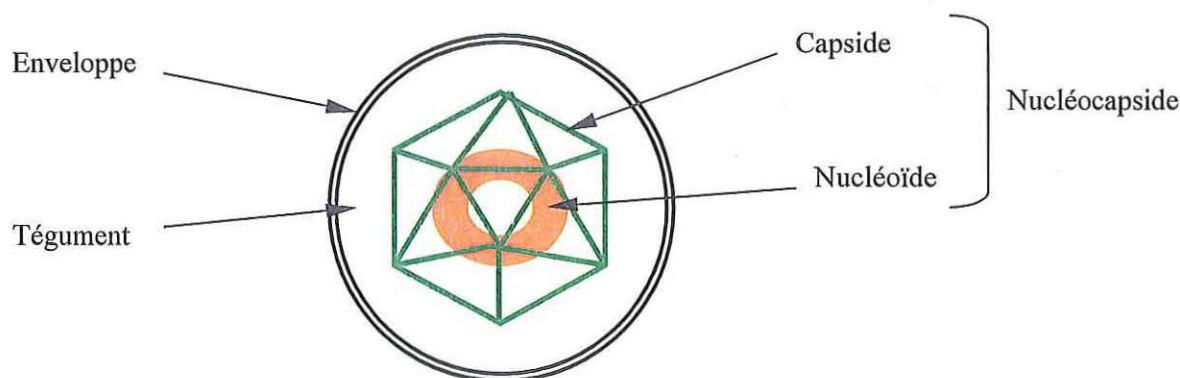


Figure 2 : Structure d'une particule virale de type Herpès

b. Réplication et cycle viral

La mode de pénétration des Herpèsvirus est défini comme étant un phénomène de fusion des membranes cellulaires et virales (Morgan *et coll.*, 1968) dépendant de l'attachement spécifique du virus sur des récepteurs cellulaires.

Après pénétration (phénomène actif) de l'ADN viral dans le noyau de la cellule, débute la synthèse virale: la transcription de l'ADN viral est intranucléaire. Après épissage, les ARN messagers sont traduits en protéines dans le cytoplasme de la cellule hôte.

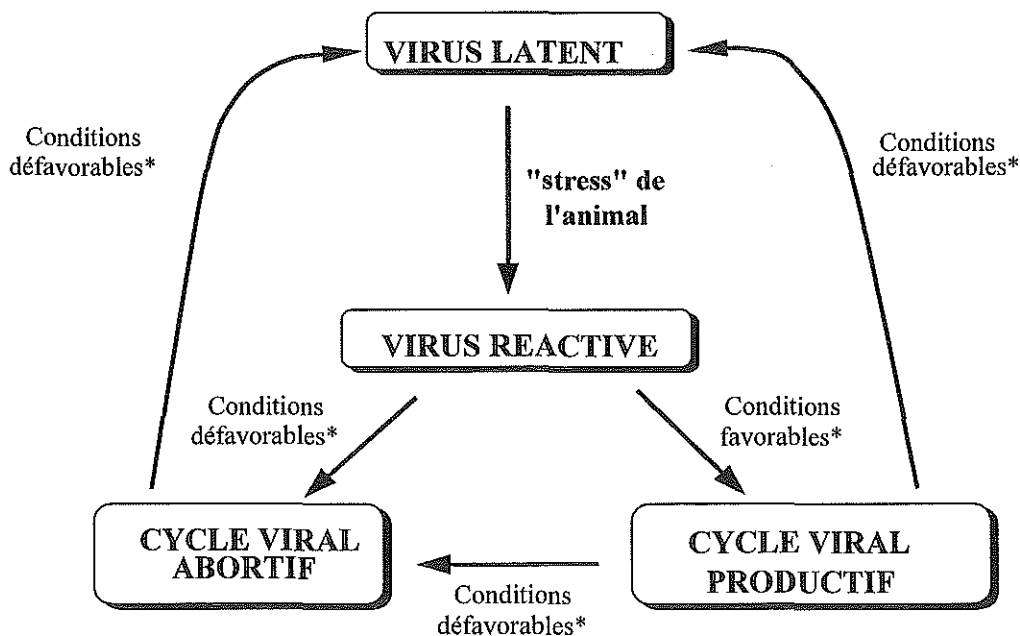
L'assemblage des particules virales a lieu dans le noyau des cellules infectées.

Dans le cytoplasme, les particules virales sont généralement localisées à l'intérieur de vésicules qui auraient pour origine le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Darlington et Moss, 1969). Les virions sont respectivement libérés ou par exocytose ou par un processus similaire à la sécrétion des protéines solubles.

c. Latence virale

Le cycle viral des *Herpesviridae* est caractérisé par la capacité des virus à persister sous forme latente, pendant toute la vie de l'hôte.

Il semble que la phase de latence constitue une étape grâce à laquelle le virus assure sa pérennité. En effet, l'activation du phénomène de latence est essentielle pour le maintien des virus au sein d'une espèce hôte. Ce caractère permet aux herpès virus de procéder à une multiplication importante lorsque les cellules hôtes possèdent un métabolisme optimal. Ce phénomène permet aussi au virus de persister dans l'organisme infecté à l'abri de la réponse immunitaire.



*conditions favorables / *défavorables pour le virus

Figure 3 : Cycle viral des *Herpesviridae* (d'après Renault *et coll.*, 1997)

La phase de réactivation est induite à la suite d'un stress de l'hôte ou suite à l'action de composés chimiques ou d'hormones. Lorsque les conditions sont les plus favorables, il y a production intensive de particules virales filles infectieuses. Ceci induit une cytolysse ou un

phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée), c'est le cycle productif. Au contraire, dans des conditions qui s'avèrent défavorables, le cycle est abortif et produit des particules virales immatures et non infectieuses (particules virales enveloppées ou capsides vides).

La cytopathologie des *Herpesviridae* est caractérisée par la mort des cellules lorsque l'infection est productive. Des altérations structurales et biochimiques, affectant le réticulum endoplasmique et la membrane cytoplasmique, aboutissent à l'éclatement des cellules infectées. Une libération massive des particules matures est alors susceptible d'infecter les cellules voisines.

d. Infections à virus de type Herpès observées chez les Huîtres creuses

La première infection à virus de type Herpès touchant une espèce d'invertébré est décrite en 1972 (Farley *et coll.*, 1972). Le phénomène est rencontré aux Etats-Unis chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*.

Plus récemment, des mortalités importantes de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, associées à la présence de virus de type Herpès, ont été observées simultanément en France (Nicolas *et coll.*, 1992) et en Nouvelle-Zélande (Hine *et coll.*, 1992).

Cette famille de virus affecte aussi d'autres espèces de Bivalves : *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec, 1993), *Tiostrongia chilensis* (Hine *et coll.*, 1998), *Ruditapes philippinarum* et (Renault, 1998), *Ruditapes decussatus* et *Mercenaria mercenaria* (Barry et Yevitch, 1972).

Les épisodes de mortalités massives observées sur le naissain et les larves de l'huître creuse, sont généralement décrits pendant les périodes chaudes de l'année (Nicolas *et coll.*, 1992 ; Renault *et coll.*, 1994) ou lorsque les individus sont élevés en eau chauffée à 25-30°C (Le Deuff *et coll.*, 1996).

Ces observations suggèrent que des températures élevées favorisent le développement de l'infection virale. En effet, ce facteur pourrait influencer la durée du cycle viral productif, mais aussi activer les virus présents chez les animaux sous forme latente.

Outre l'aspect ponctuel des épisodes infectieux, il a été démontré qu'il existait une transmission horizontale, d'une part entre larves infectées et saines de *Crassostrea gigas* (Renault *et coll.*, 1997) et d'autre part entre larves d'*Ostrea edulis* infectées et larves saines de *C. gigas* (Le Deuff, 1995). De plus, l'existence d'une transmission verticale est fortement suspectée (Le Deuff *et coll.*, 1996); En effet, le virus a été détecté chez les adultes et le naissain dans le milieu naturel. La mise en évidence de l'infection des larves par l'agent pathogène indiquerait donc la possibilité d'une transmission du virus des parents vers leur progéniture. Le Phase larvaire correspond actuellement au chaînon manquant dans cette transmission verticale.

Cette hypothèse est renforcée par l'apparition très précoce, en éclosion, de mortalités larvaires associées à la détection de virus de type Herpès.

Des observations morphologiques ont été réalisées sur des larves axéniques infectées expérimentalement par un virus de type Herpès.

L'examen macroscopique de matériel vivant fait apparaître une diminution de la prise alimentaire et du déplacement des larves. Ainsi, les larves moribondes nagent en cercle avec leur velum moins étendu que pour des larves saines. Le velum peut aussi présenter des lésions plus ou moins importantes.

L'examen histologique à partir de coupes semi-fines révèle des lésions qui affectent principalement les cellules fibroblastiques. Les cellules infectées présentent un cytoplasme

anormal et un noyau hypertrophié avec la chromatine qui se marginalise. Les hémocytes sont aussi atteints par l'infection et montrent une condensation anormale de la chromatine.

Ces observations se retrouvent aussi dans l'étude des larves infectées en microscopie électronique. Cette technique permet toutefois de spécifier l'emplacement des particules virales dans les cellules (noyau et vésicules dans le cytoplasme).

Les connaissances actuelles sur les mortalités sporadiques de larves de *Crassostrea gigas*, faisant intervenir un virus de type Herpès, proviennent essentiellement d'observations faites sur des individus d'écloserie. Or, les techniques d'élevages en milieu confiné peuvent être propices à la déclaration de pathologies. En effet, la production contrôlée de larves se fait de manière intensive avec l'obtention d'un grand nombre d'individus. Elle est aussi caractérisée par une monospécificité des larves obtenues.

II. Optimisation de l'outil diagnostique

1. Bilan du suivi depuis 1998

La technique de détection de virus de type Herpès sur les larves par PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à réaliser une amplification enzymatique permettant une multiplication des copies de l'ADN viral.

Cette amplification se fait sur des séquences cibles correspondant à des couples d'amorces complémentaires.

En 1998 et 1999, les amorces utilisées étaient OHV3 et OHV4 avec une simple PCR (Thébault, 2000). Les échantillons sont analysés après un simple tri sur des tamis de différents maillages. Tous les résultats obtenus sur des lots de larves du milieu naturel se sont avérés négatifs.

En 2000 le couple d'amorces utilisés a changé, il s'agit de OHV3 et OHV114. Le mode de préparation des échantillons reste cependant identique. Un résultat positif a été obtenu sur un lot de larves oeillées d'Arams (270-320 µm), à Arcachon du 9 août 2000 avec les amorces OHV3/OHV114, GP3/GP4, IAP1/IAP2 (Thébault et Robert, 2001, com. Pers.). Il y avait des Gastéropodes dans le lot. Cette ponte n'avait pas évolué par une fixation.

2. Limites de la technique d'analyse

Le protocole de détection, ainsi établi, induit un certain nombre de biais.

La première limite de la détection correspondant à la préparation des échantillons.

Les échantillons récoltés dans le milieu sont composés d'un ensemble d'espèces planctoniques et ne sont donc pas totalement purs en larves de *Crassostrea gigas*, malgré l'étape de tri (cf photos 7 et 8). L'absence d'inhibition de la réaction par les autres organismes doit donc être contrôlée.

D'autres types d'amorces spécifiques de l'ADN de *Crassostrea gigas* ont également été testés sur les échantillons préparés pour la technique de détection de l'Herpès. L'obtention de résultats positifs indiquera que le matériel biologique est en quantité suffisante pour l'étude et qu'il n'est pas affecté par la préparation (cf Annexe 2).

Ainsi, afin de minimiser l'interaction des autres espèces planctoniques, d'autres méthodes de préparations des échantillons devront être testées (réalisation de pools de larves).

La méconnaissance de la possible persistance du virus dans le milieu naturel incite à la prudence pour l'analyse des résultats positifs. Ainsi, d'après l'étude de Sollic (2001) sur la détection d'Herpèsvirus dans les eaux de claires ostréicoles, les différentes amorces spécifiques de l'ADN viral ne permettent pas un niveau de détection identique. Les amorces OHV, permettant d'amplifier une zone non codante du génome viral, et les amorces GP, spécifiques de séquences contenues dans un gène codant pour une glycoprotéine, mettent en évidence dans certains échantillons d'eau de mer la présence de matériel génétique viral. Cependant, sur ces mêmes échantillons, l'utilisation des amorces IAP et AP, permettant d'amplifier des fragments de gènes viraux codant pour une protéine ayant des homologies avec une molécule inhibant l'apoptose, n'aboutit pas à une détection. Si cette détection dans l'eau est une contamination alors les amorces IAP et AP pourraient être plus spécifiques de l'ADN de virus Herpès de l'huître.

De ce fait, il apparaît judicieux d'utiliser ces deux derniers types d'amorces afin de contrôler la présence d'Herpèsvirus dans les larves d'huîtres japonaises des échantillons positifs. Les interférences, dues à des virus présents dans l'eau des échantillons de prélèvements ou adsorbés aux différents éléments du zooplancton, semblent ainsi minimisées.

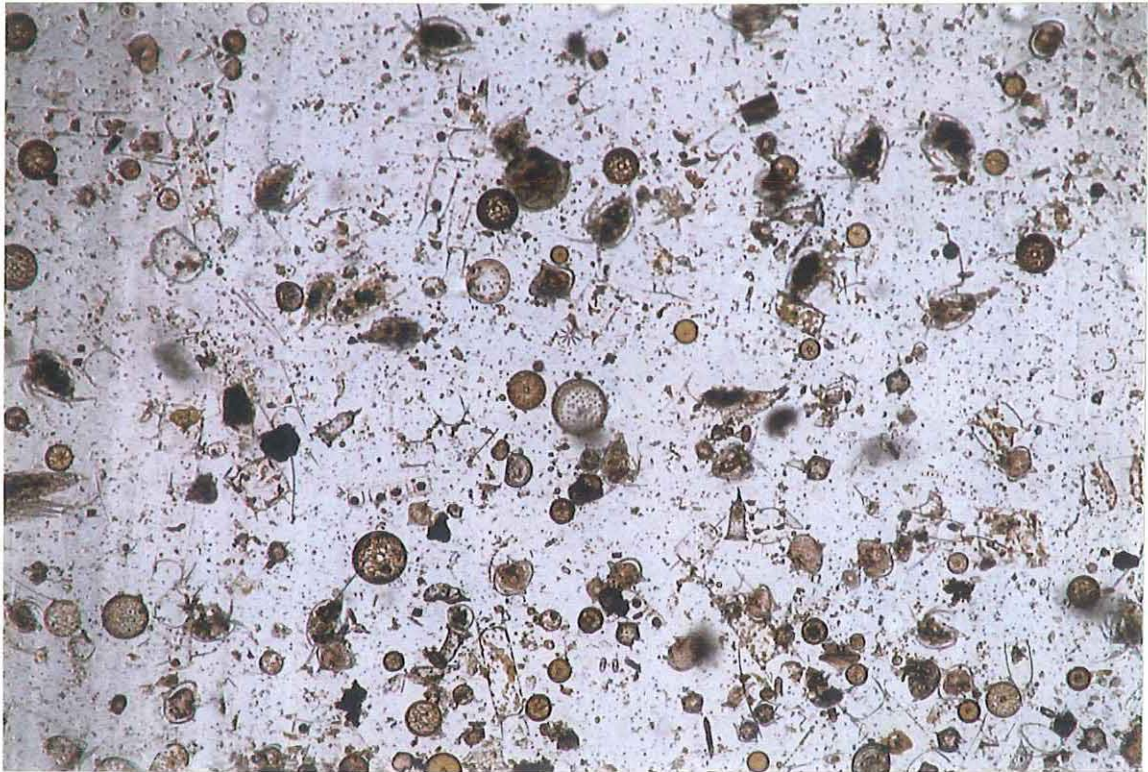


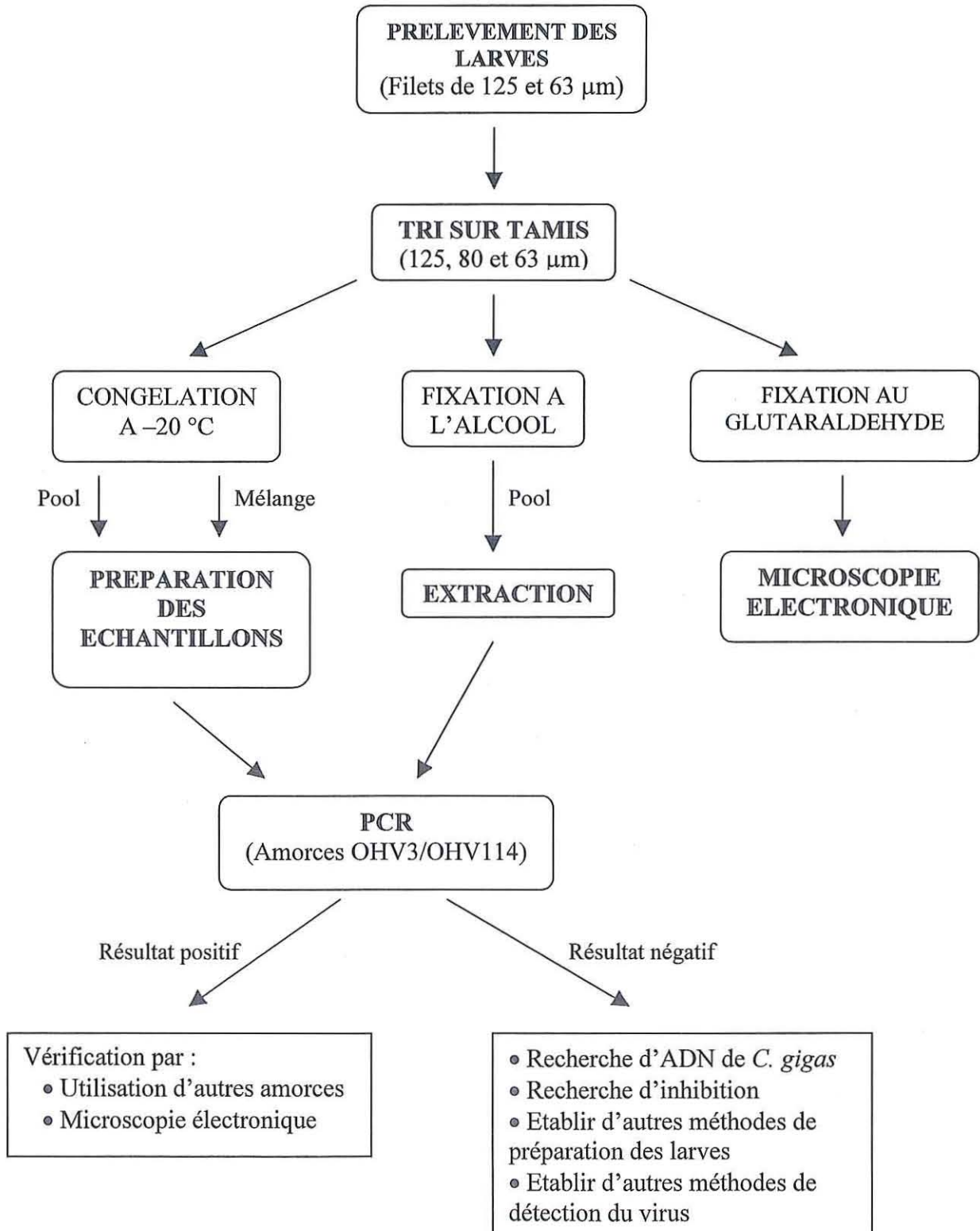
Photo 7 : Diversité spécifique observée dans les prélèvements ($\times 40$)



Photo 8 : Différents planctontes présents dans les prélèvements ($\times 100$)

MATERIEL ET METHODE

I. Démarche expérimentale



II. Matériel Biologique

Cette étude porte sur les larves de *Crassostrea gigas*. Ce terme décrit l'ensemble des stades embryonnaires caractérisés par une vie libre hors de l'œuf. Ce stade précède la métamorphose, qui correspond chez les Mollusques Bivalves marins à l'étape de fixation. On parle alors de naissain (juvéniles).

1. Prélèvements des larves

Dans le bassin de Marennes-Oléron, les prélèvements sont réalisés en quatre points : dans la Seudre, à Coux et Les Faulx ; et dans le bassin, à Mérignac et Les Doux.

Dans le bassin d'Arcachon, les pêches sont effectuées dans différents chenaux : Arès, Piquey et Courbey (secteur ouest) et Comprian, Gujan et Arams (secteur est).

Chaque secteur est échantillonné deux fois par semaine, de deux heures après la haute mer à la mi-marée descendante. Les prélèvements sont réalisés pendant les mois de Juillet et Août.

La technique de pêche de larves a été mise au point et décrite par Boury (1928) puis Trochon (1955), puis reprise par Gras *et coll.* (1971) ; elle est représentée schématiquement par la figure 5.

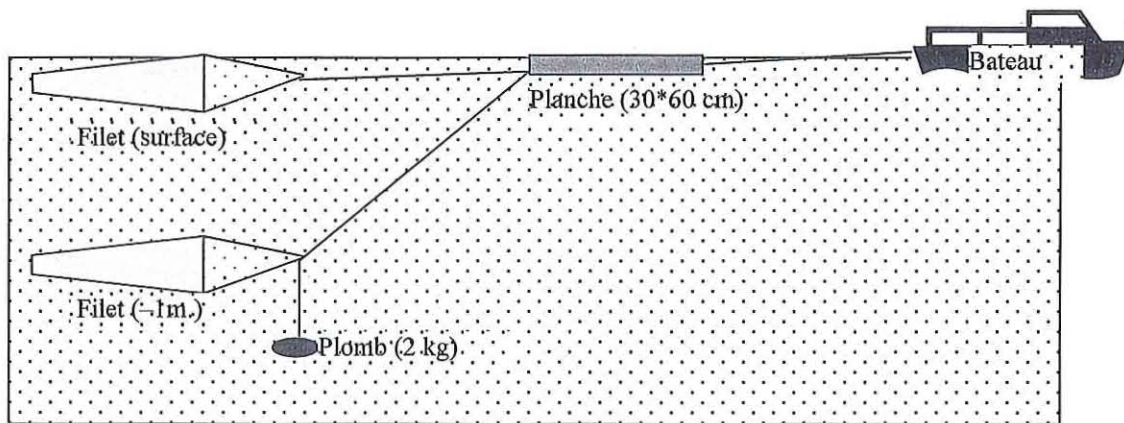


Figure 4 : Schéma du train de pêche utilisé pour la récolte des larves en surfaces et à environ un mètre de profondeur (d'après Gras *et coll.*, 1971).

La collecte des larves d'huîtres creuses se réalise à l'aide de deux filets. L'un d'une maille de 60 μm permet la capture des larves en surface (-0,2 m) ; l'autre, d'une maille de 125 μm retient les larves à une profondeur d'environ un mètre. Le premier filet assure le prélèvement des jeunes larves qui se trouvent principalement en surface. Le deuxième filet, fixé sur un support vertical lesté, permet la récolte des larves à des stades ultérieurs de développement qui ont tendance à migrer vers des couches plus profondes.

Ce dispositif de prélèvement est traîné à l'arrière d'un bateau à une vitesse d'environ 2 nœuds et à contre courant. La durée de chaque trait est de 5 minutes. Au bout de ce temps, les culots sont repris dans environ 50 cm^3 d'eau de mer.

Dans le même temps, les suivis de salinité et de température sont réalisés grâce à un thermo-salinomètre.

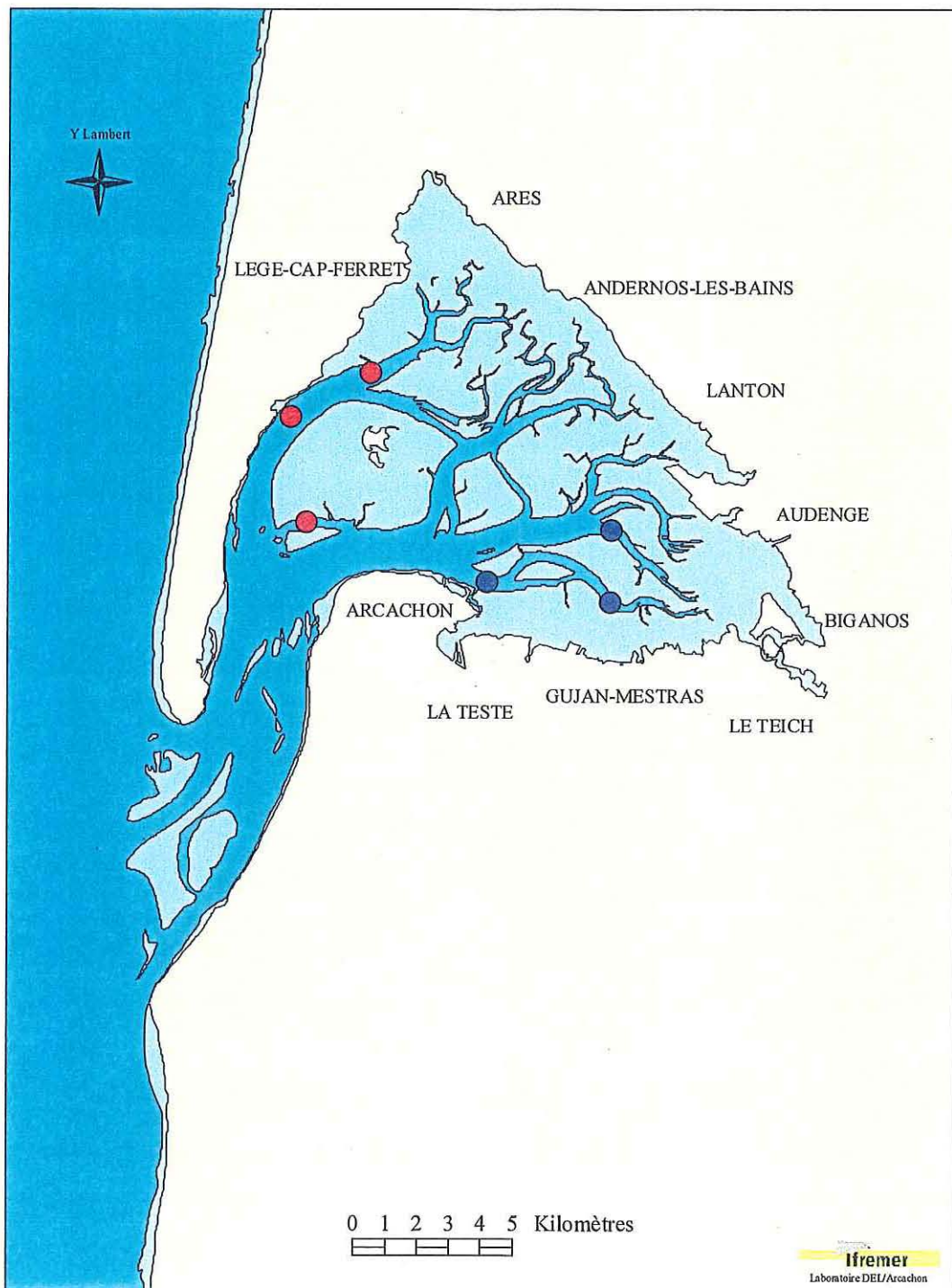


Figure 5 : Localisation des stations de pêche de larves d'huîtres dans le Bassin d'Arcachon (bleu : secteur est ; rouge : secteur ouest).

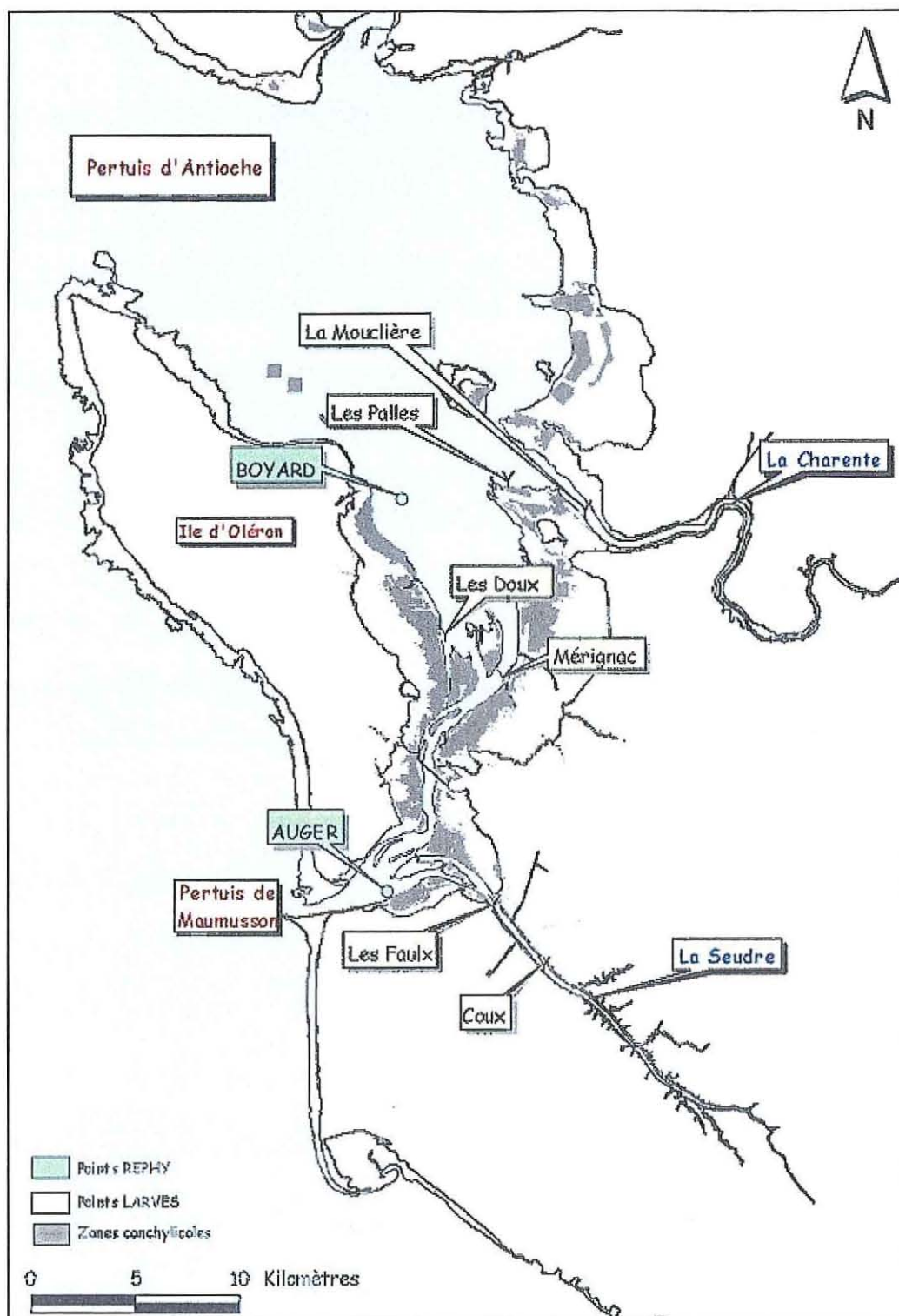


Figure 6 : Localisation des stations de pêches de larves d'huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron



Photo 9 : Train de pêche : planche et filets



Photo 10 : Train de pêche en action

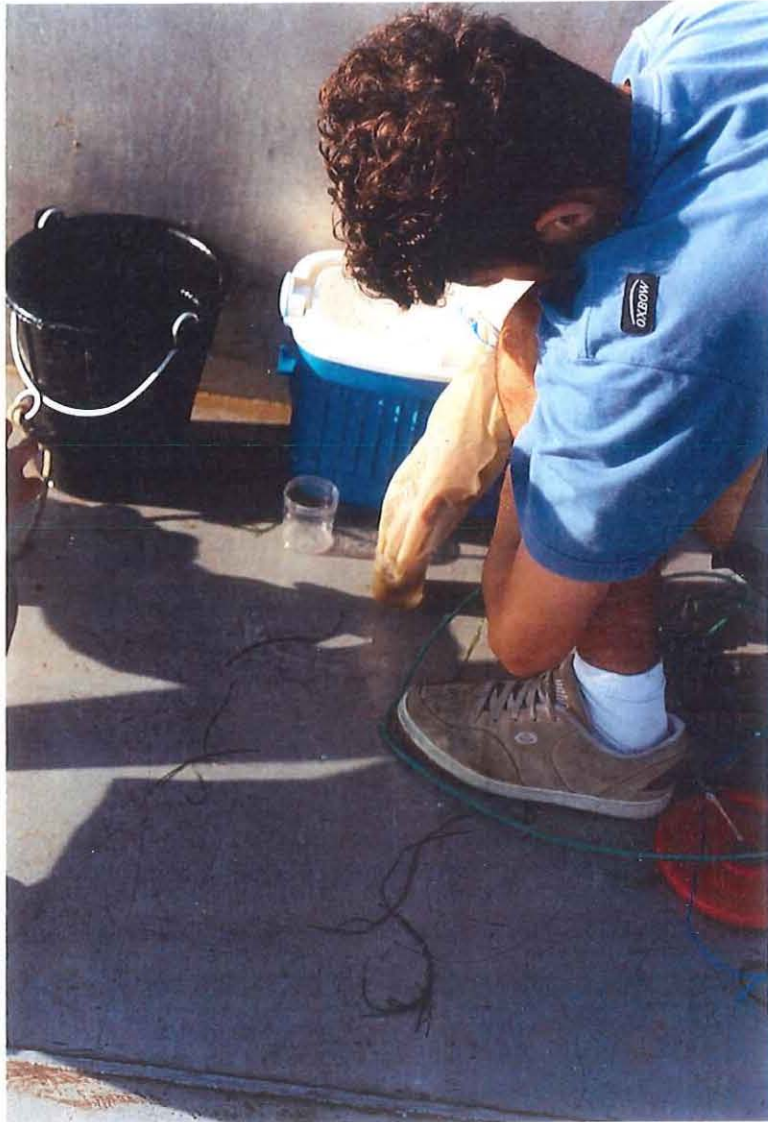


Photo 11 : Récolte du culot de larves

2. Numération des larves

Le dénombrement des larves pêchées est réalisé par le Laboratoire de la Direction Environnement Littoral (DEL).

L'échantillon de prélèvement est homogénéisé et 1 ml du mélange est monté entre lame et lamelle. Les larves sont alors dénombrées par stade (petites, petites évoluées, moyennes et grosses) au microscope.

La numération des larves d'Arcachon se fait sur un procédé quelque peu différent. Ainsi, après décantation, les échantillons sont dilués 5 fois. Le comptage de deux sous échantillons de 0,5 ml est alors réalisé.

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de larves pour 15 m³ pour les dénombrements du bassin de Marennes-Oléron et en nombre de larves pour 1,5 m³ dans le bassin d'Arcachon.

Chaque trait de filet, par station, par maille et par profondeur est traité séparément. Par la suite, pour une station et un stade donnés, le comptage le plus élevé est conservé parmi les résultats des différents filets.

Dans les années antérieures, la technique de comptage sur le bassin de Marennes-Oléron était quelque peu différente. Ainsi, une étape de séparation des larves du reste du zooplancton était préalablement réalisée dans un cristalliseur. L'échantillon était ensuite dilué afin d'obtenir une visibilité suffisante permettant un comptage correct.

3. Tri des larves

Un tri grossier des larves est réalisé par séparation sur trois tamis successifs de taille respective 125 µm, 80µm et 63 µm. Cette étape permet une séparation relative des différentes populations du plancton.

Pour chaque tamis les larves sont reprises dans l'éthanol absolu en vue de l'extraction d'ADN ou dans du glutaraldéhyde à 3% pour la microscopie électronique. Des larves sont aussi conservées à -20°C pour la détection d'ADN viral par PCR.

III. Techniques d'Analyse

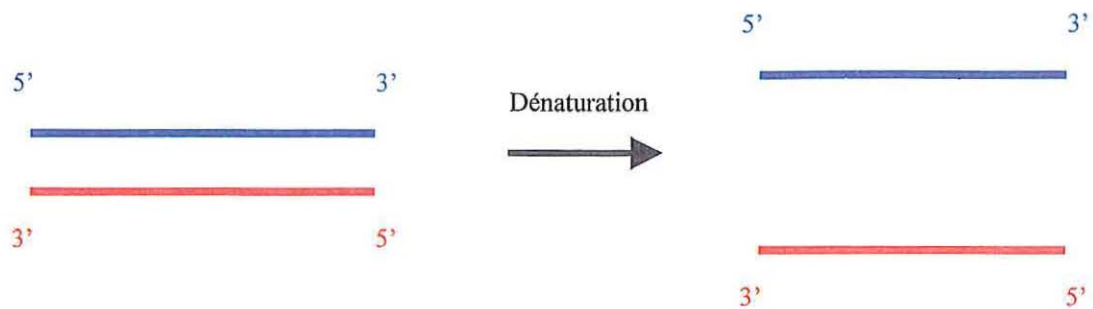
1. La Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR, mise au point par Saiki *et coll.* (1985), est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acides nucléiques situé entre deux séquences connues (amorces). Il s'agit d'une réaction d'amplification enzymatique obtenue à la suite d'une série de cycles de polymérisation (35 cycles).

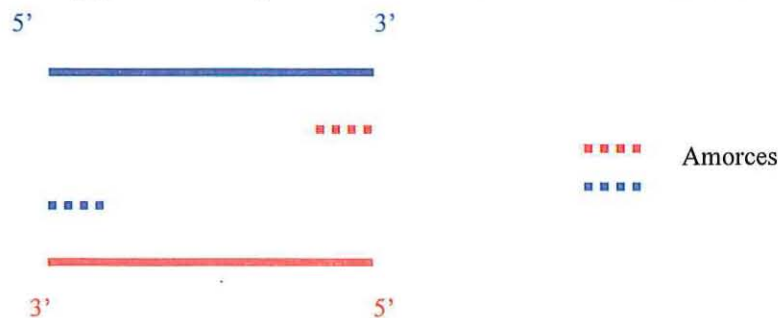
La particularité de cette technique réside dans le fait que les copies d'ADN néosynthétisées servent de matrices au cours des cycles d'amplification suivants.

La PCR se décompose en trois étapes, chacune réalisée à une température particulière :

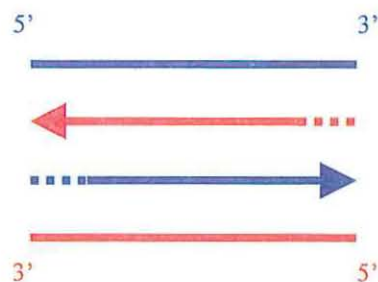
- Dénaturation : réalisée à 94°C, elle permet la séparation des deux brins de l'ADN bicaténaire. Chaque ADN monocaténaire servira de matrice à l'amplification génique.



- Hybridation : elle est dépendante de la température qui est déterminée selon cette formule empirique : $T_m(^{\circ}\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$ avec $T_m = \% \text{ GC}$ des amorces. A cette température, les amorces qui servent de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice. Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie, qui forment des points de départ de la polymérisation spécifique. Leur cinétique d'hybridation est beaucoup plus élevée que celle des ADN matrices entre eux.



- L'élongation : elle correspond à la polymérisation de l'ADN, à partir des extrémités 3' des amorces, par le bief de l'enzyme Taq polymérase (issue de *Thermus aquaticus*). Cette enzyme prend pour matrice le brin d'ADN, et elle agit à 72°C . L'utilisation de cette protéine relève de son pouvoir à supporter des températures allant jusqu'à 95°C (température de l'étape de dénaturation).



2. Technique de PCR appliquée à la détection de virus de type Herpès (cf Annexe 1)

Préalablement les échantillons destinés à l'analyse PCR sont broyés. Après passage au bain-marie bouillant, le traitement consiste en une centrifugation puis à une congélation rapide après aspiration du surnageant. Il n'y a pas d'extraction d'ADN. Le protocole est ensuite celui décrit par Renault *et coll.*, 2000.

Deux couples d'amorces ont été utilisés OHV3/OHV114 et IAP3/ IAP4.

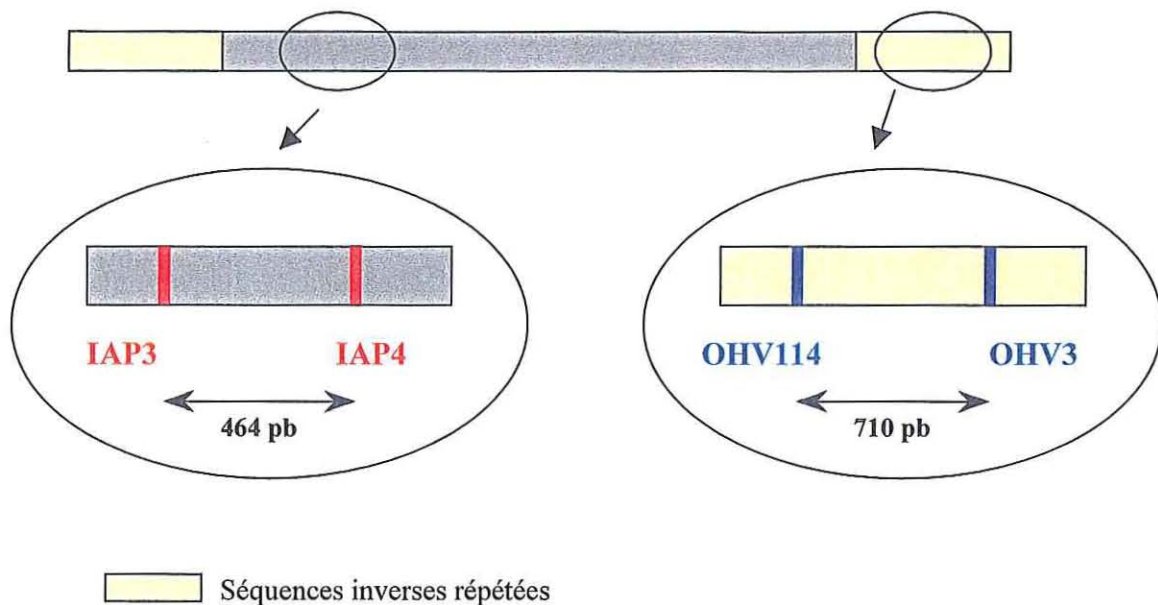


Figure 7 : Structure du génome du virus de type Herpès de l'huître. Localisation des amorces utilisées en PCR : OHV114/OHV3 et IAP3/IAP4

Le protocole d'amplification de séquences virales a été optimisé par Renault *et coll.*, en 2000. La mise en évidence de l'ADN amplifié se fait par migration électrophorétique sur gel d'agarose marqué au bromure d'éthidium. La taille des fragments obtenus (*cf figure 8*) est comparée avec celle d'un témoin positif.

En effet, différents témoins sont aussi utilisés. Les témoins négatifs sont réalisés à partir d'eau bidistillée. Ils permettent de détecter d'éventuelles contaminations des réactifs ou de la zone de travail au cours des manipulations. Les témoins positifs sont composés d'ADN extrait de virus purifié (2500 copies ou 5000 copies). Ils permettent de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR. Les résultats de ces témoins déterminent si les analyses peuvent ou non être interprétées.

Enfin, l'inhibition de réaction sera également contrôlée. Le principe est de rajouter à un surnageant négatif un fragment d'ADN viral connu et de vérifier que sa détection est possible (Renault *com. Pers.*, 2001). Ce fragment a été obtenu à partir d'une délétion de la séquence virale originale de 77 pb. Le fragment attendu de ce témoin d'inhibition est donc de 632 pb. Un témoin positif a été ajouté contenant de l'eau et le fragment.

Afin de tester la qualité du prélèvement, certains lots négatifs ont été testés pour la recherche d'ADN d'ITS de *Crassostrea gigas* selon le protocole de Hedgecock *et coll.*, 1999.

IV. Modélisation hydrodynamique du devenir des larves dans le bassin de Marennes-Oléron

Le logiciel MARS 2D permet de simuler, pour une zone donnée, les courants marins, les hauteurs d'eau et les concentrations en éléments solubles. Il permet ainsi d'appréhender le déplacement des larves à partir d'une zone de ponte définie.

Il est alors possible de prévoir la dispersion des larves au cours de leur développement, en prenant en compte la circulation des masses d'eau dans le bassin. Et donc de déterminer les contraintes de l'hydrodynamisme sur la survie larvaire et le captage du naissain.

RESULTATS

I. Généralités sur le développement larvaire dans les bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon

D'une manière générale, les densités de larves montrent des variations inter-annuelles importantes tant par secteur que sur l'étude des bassins en globalité. De même, les dates de ponte semblent être diversement réparties durant la période estivale.

1. Le bassin de Marennes-Oléron

L'observation des quatre dernières années de suivi montre une forte disparité de répartition larvaire entre le secteur Seudre (Les Faulx et Coux) et le bassin (Les Doux et Mérignac). En effet, dans la Seudre (*cf figure 9*), les émissions larvaires semblent plus précoces et la quantité de larves au stade « grosses » se stabilise rapidement par rapport à l'autre secteur (*cf figure 8*).

Lors de cette période d'étude, la croissance larvaire apparaît comme optimale, dans le milieu du mois d'août (semaines 33 et 34).

La durée du développement larvaire est d'environ 3 semaines.

L'année 1999 s'est révélée excellente pour le captage avec 6,7 % des larves « petites » qui parviennent au stade ultime de développement (grosses). En comparaison, l'année 2000 est marquée par une évolution très limitée des larves, seulement 0,07 % des larves atteignant le stade « grosses » (*cf figure 10*).

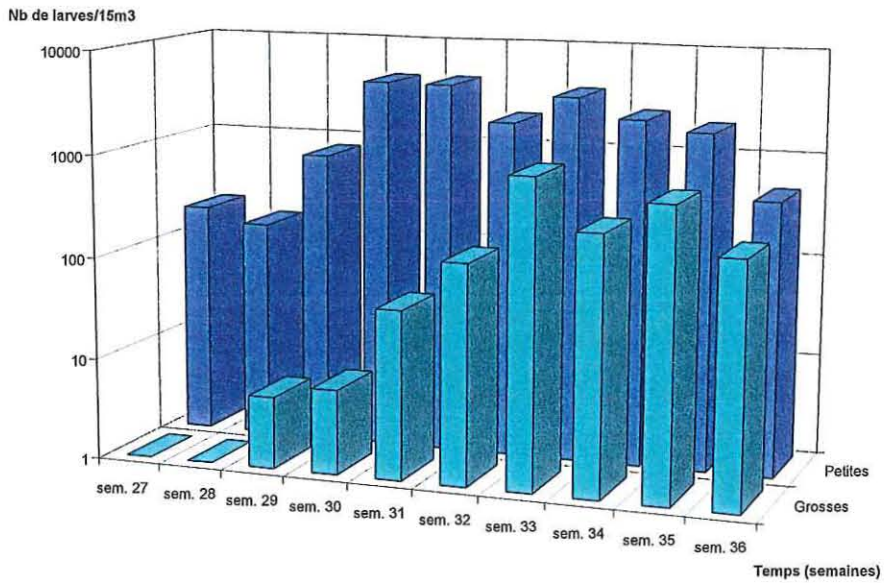


Figure 8 : Moyenne des quantités de larves (petites et grosses) pour les années 1997, 1998, 1999 et 2000 pour le secteur bassin de Marennes-Oléron.

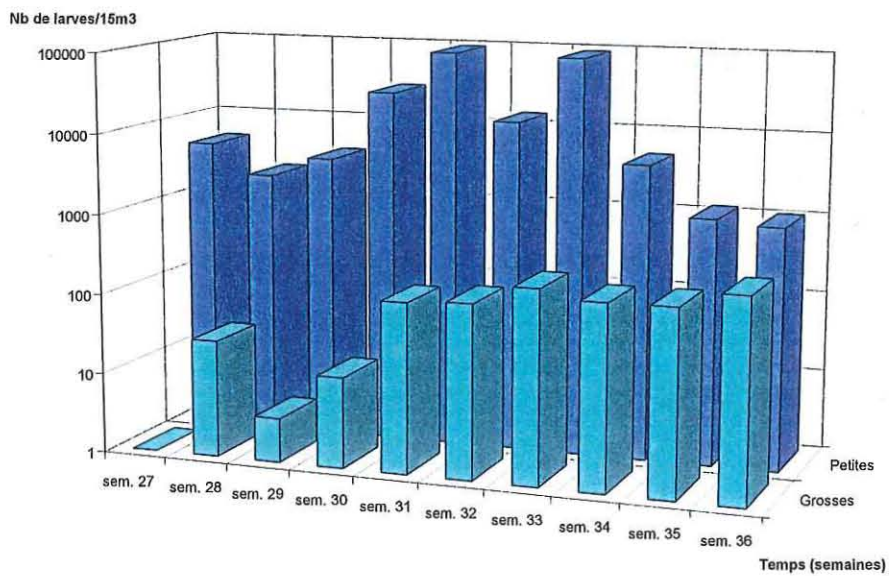


Figure 9 : Moyenne des quantités de larves (petites et grosses) pour les années 1997, 1998, 1999 et 2000 pour le secteur Seudre.

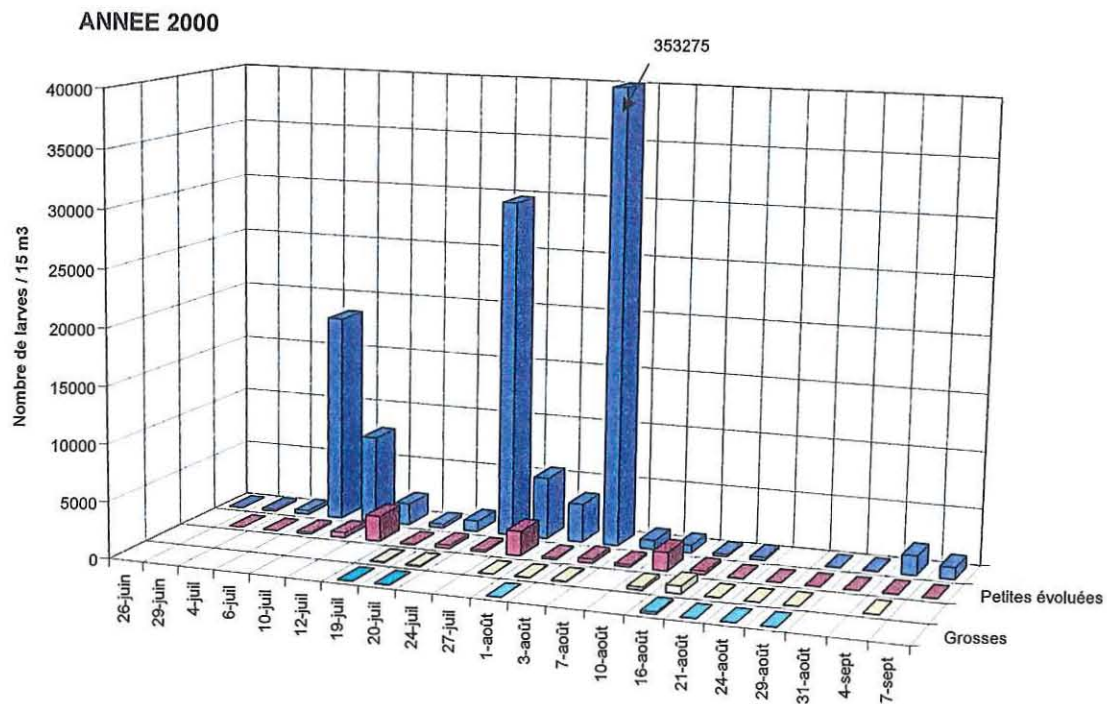


Figure 10 : Moyenne des quantités de larves pour l'ensemble du bassin de Marennes-Oléron, en 2000.

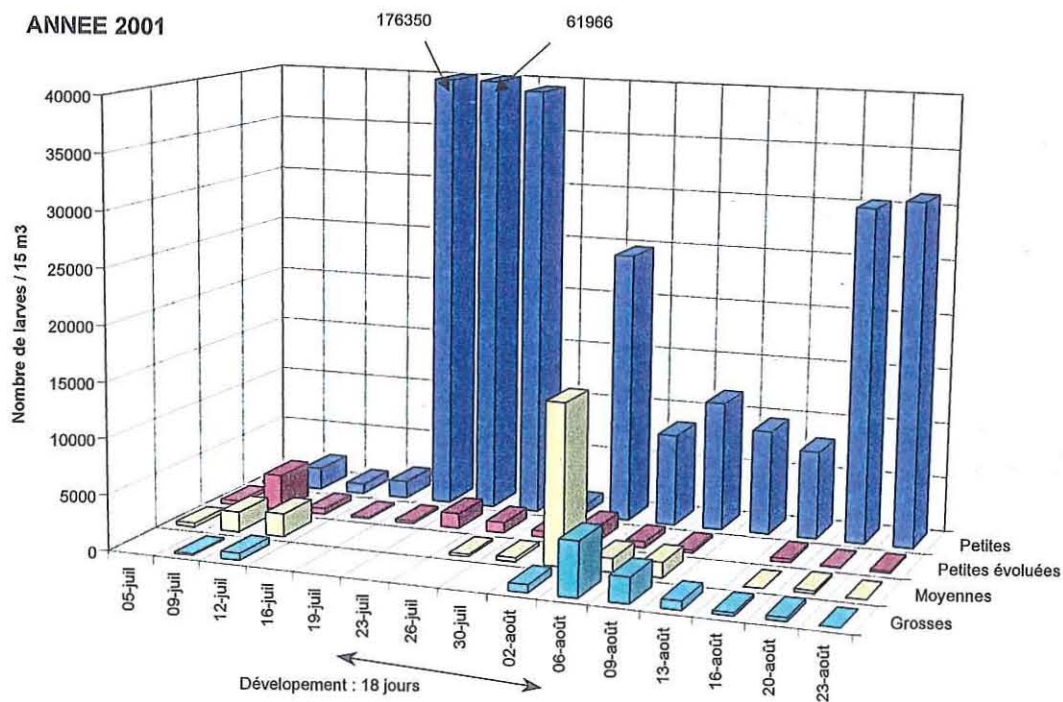
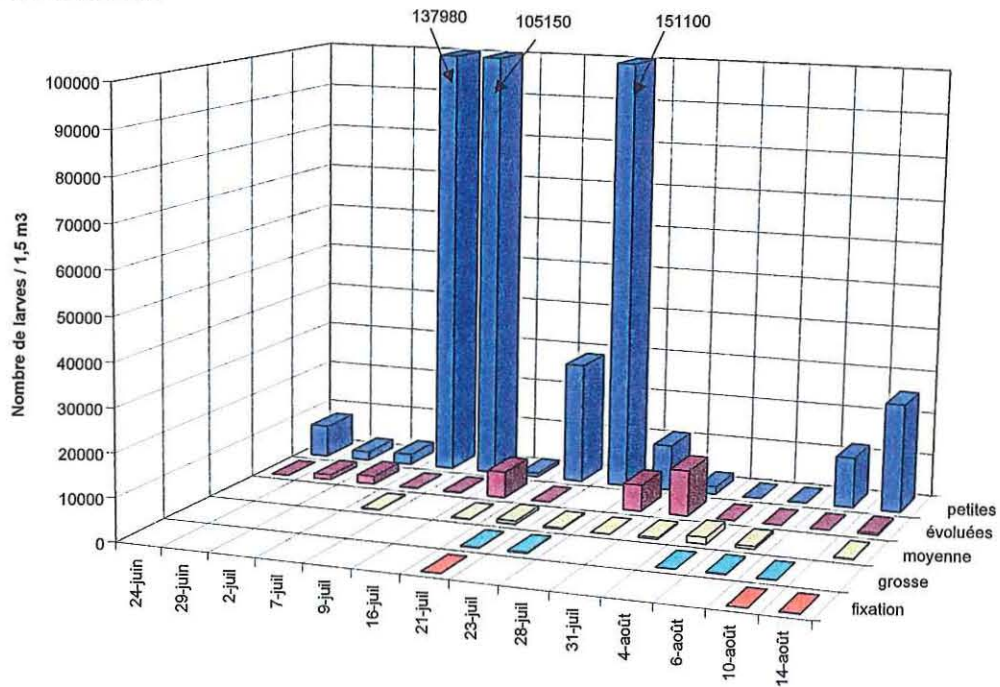


Figure 11 : Moyenne des quantités de larves pour l'ensemble du bassin de Marennes-Oléron, en 2001.

2. Le bassin d'Arcachon

SECTEUR EST



SECTEUR OUEST

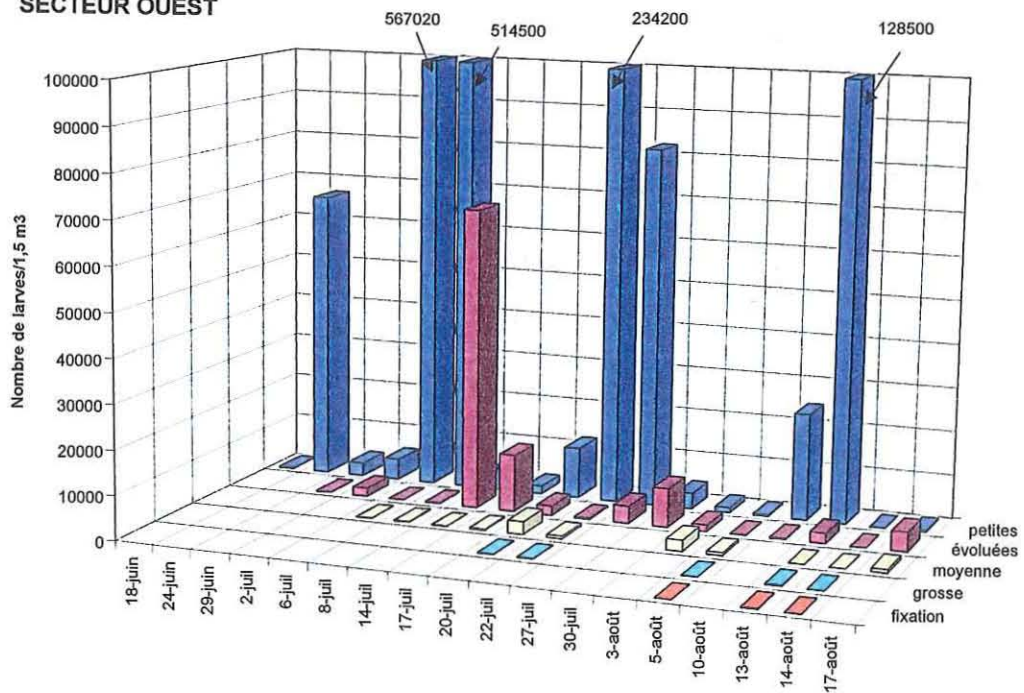


Figure 12 : Résultat des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du bassin d'Arcachon en 1998.

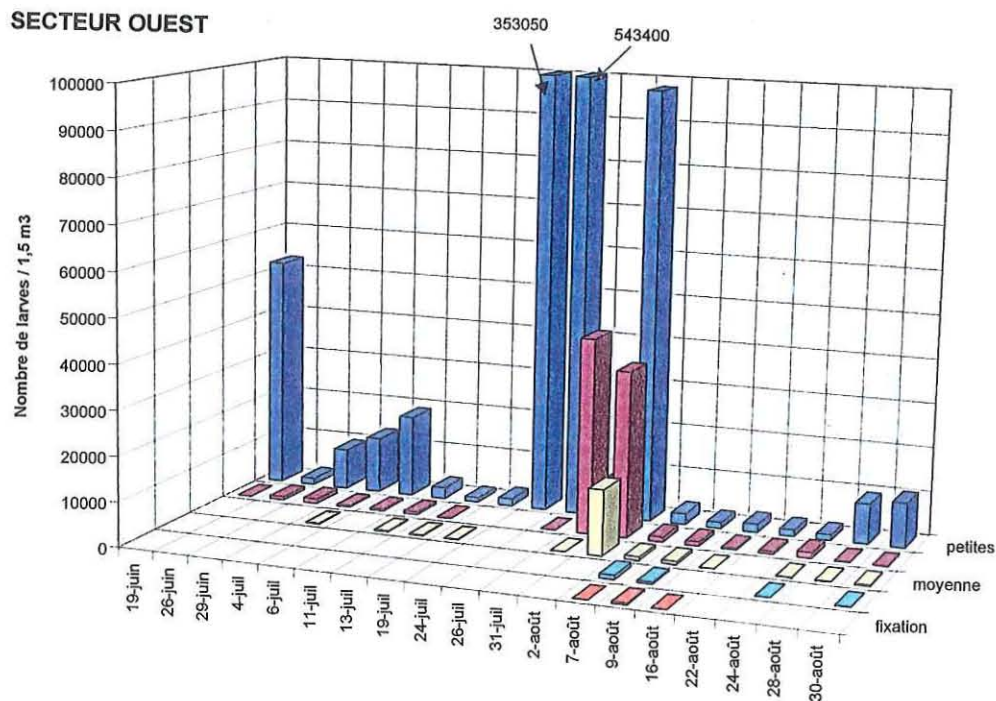
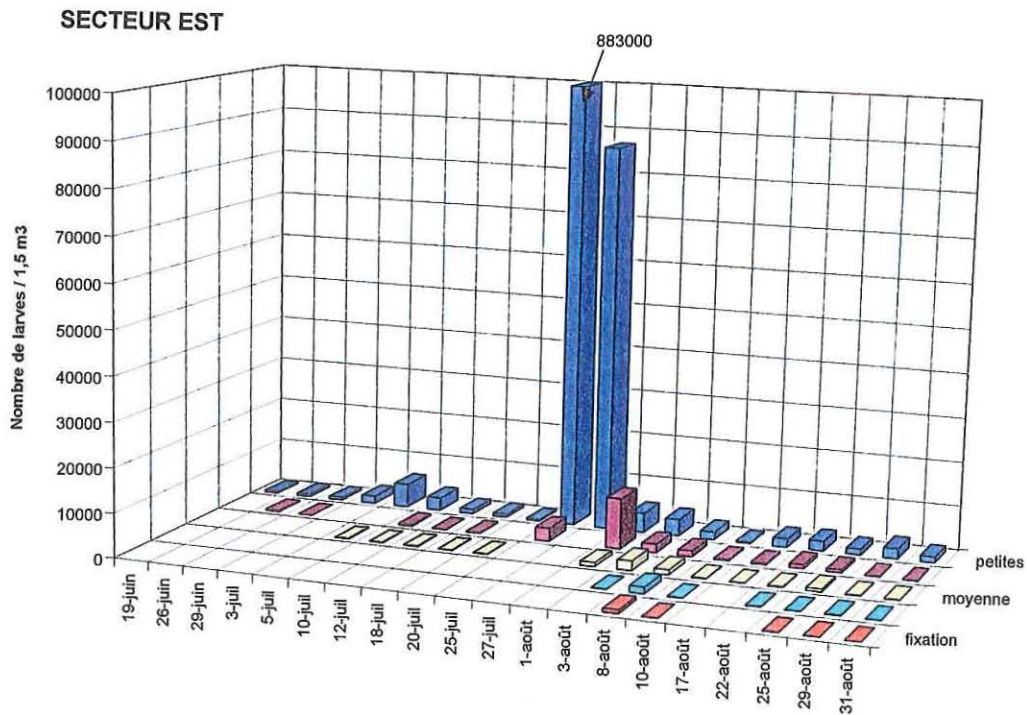


Figure 13 : Résultat des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du bassin d'Arcachon en 2000.

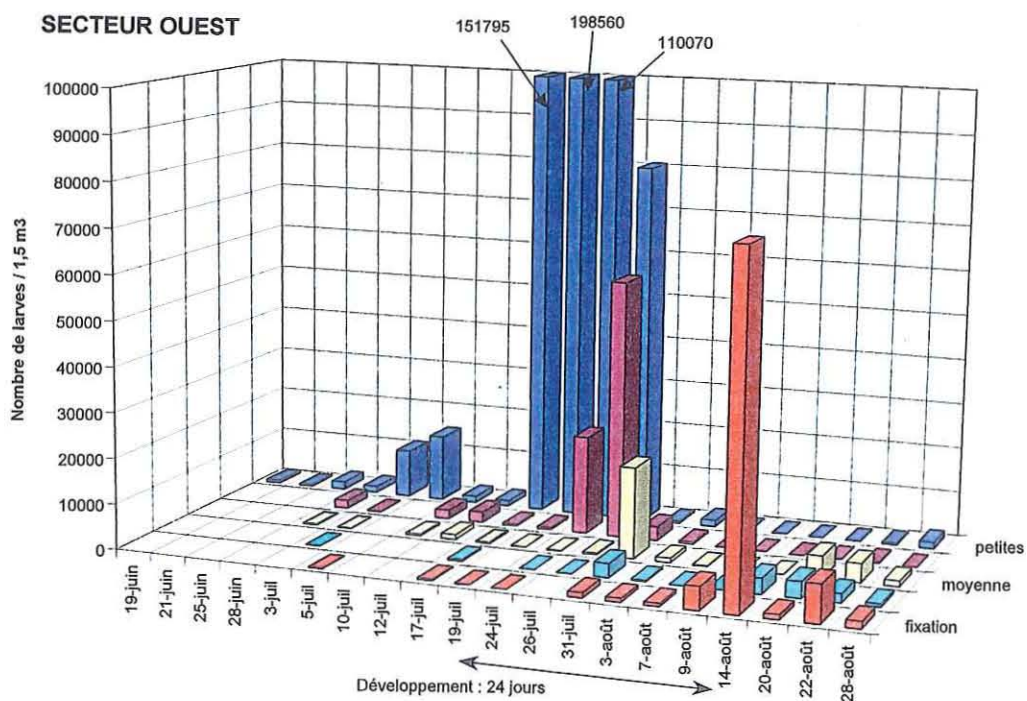
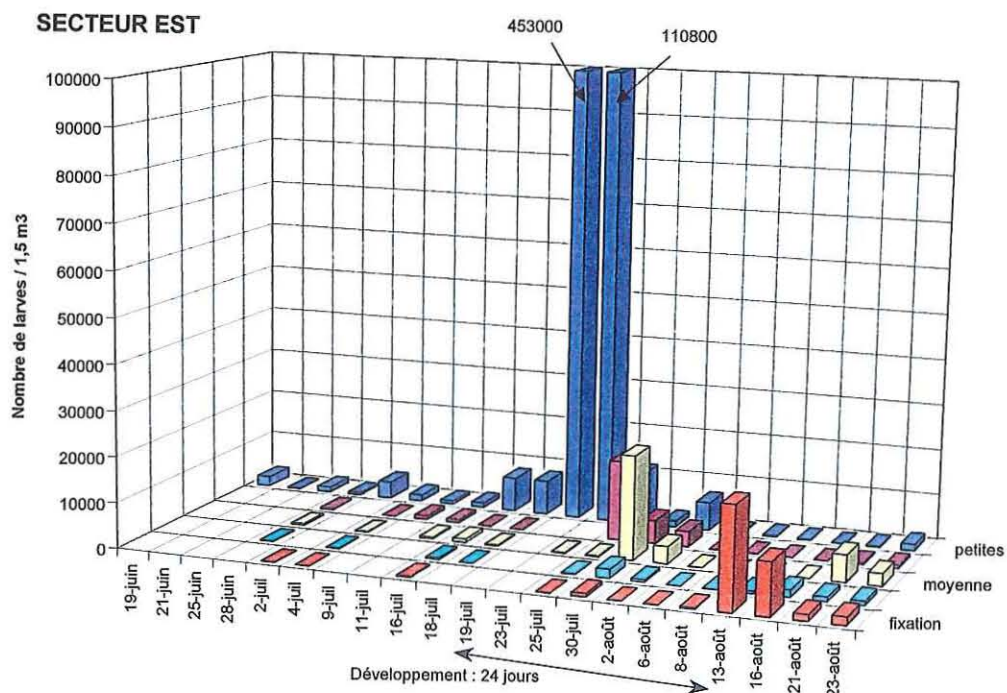


Figure 14 : Résultat des comptages larvaires dans les secteurs est et ouest du bassin d'Arcachon en 2001

L'étude de la période allant de 1985 à 2000, révèle des caractéristiques générales du développement dans le bassin.

Ainsi, le temps écoulé, entre les premiers pics de larves « petites » et l'observation de larves en fixation, varie selon les années entre 15 et 21 jours.

De plus, les larves aux stades les plus évolués apparaissent plus précocement dans le secteur est que dans le secteur ouest de la baie. En effet, la première ponte est toujours plus précoce dans les populations des hauts du bassin que dans celle qui se développe dans le secteur plus océanique, avec un décalage pouvant parfois dépasser un mois (Manaud *et coll.*, 1997).

Les pontes importantes se produisent vers le début du mois de juillet dans le secteur est. Des larves en fixation sont alors observées à la fin de ce mois. Cependant, certaines années, les pontes massives se produisent plus tôt, au mois de juin.

Au cours des années normales de captage, les larves aux stades « grosses » et « en fixation » sont présentes pendant plusieurs semaines entre fin juillet et fin août.

L'année 1998 a été marquée par un très faible taux de captage du naissain (*cf figure 12*). L'évolution des premiers stades du développement larvaire semble normale, alors que les larves aux stades les plus évolués (« grosses » et « en fixation ») sont absentes dans la colonne d'eau.

II. Evolution des larves à Arcachon et en Charente au cours de l'année 2001

1. Variation temporelle des populations larvaires dans le bassin de Marennes-Oléron (*cf figure 11*)

Il est tout d'abord à noter que, dès les premières pêches, des larves évoluées sont observées, et des larves « grosses » sont aussi comptabilisées début juillet. Le début des pêches tardif ne permet d'observer les pontes dont elles proviennent.

Une ponte massive a lieu entre le 19 et le 26 juillet dans les deux secteurs : Seudre et bassin. Environ 18 jours après, les premières larves « grosses » apparaissent.

Les larves au stade ultime sont présentes dans la colonne d'eau pendant la première quinzaine du mois d'août. Des pontes, plus réduites et plus diffuses, sont aussi enregistrées pendant cette période surtout dans la Seudre.

Après la ponte massive du mois de juillet, le développement larvaire semble correct, avec 2,5 % des larves au stade « petite » qui arrive au stade ultime. Les différents stades sont bien représentés avec cependant une anomalie au niveau des petites évoluées qui sont en densité inférieure aux larves moyennes.

Une deuxième ponte importante se produit un mois après la première (20 août à 23 août). Cependant, l'arrêt des pêches ne permet pas de savoir l'évolution de ces larves.

2. Conditions Physico-chimiques du milieu dans le bassin de Marennes-Oléron

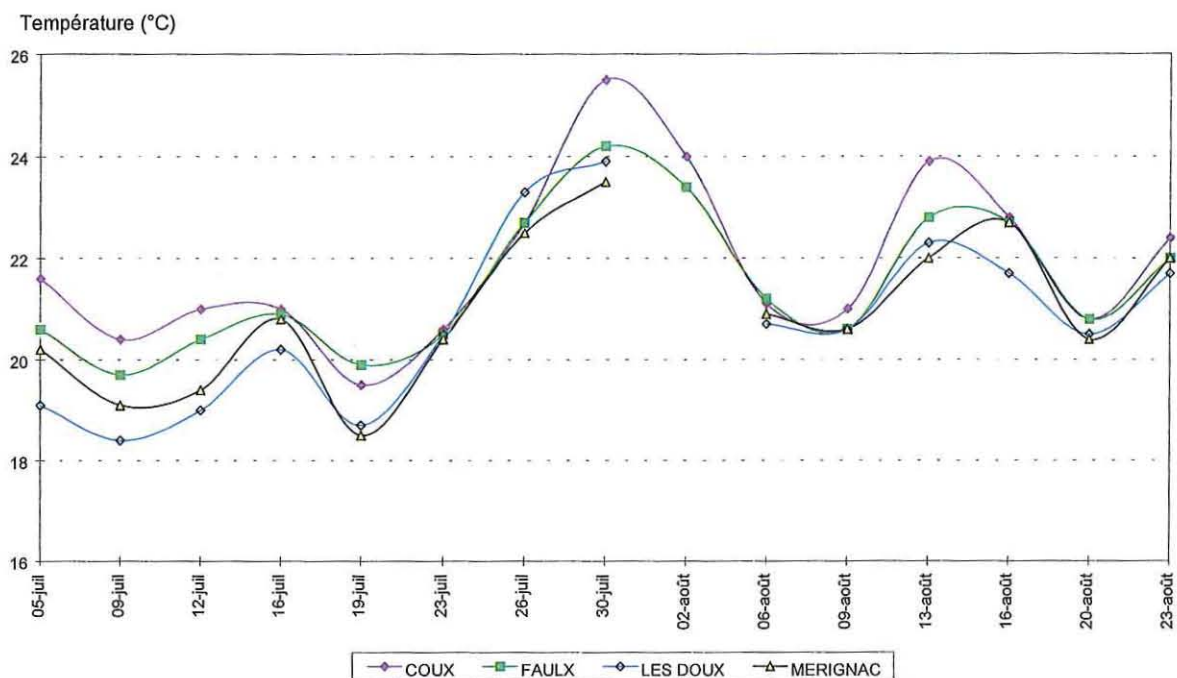


Figure 15 : Evolution des températures aux quatre points de prélèvement du bassin de Marennes-Oléron, en 2001

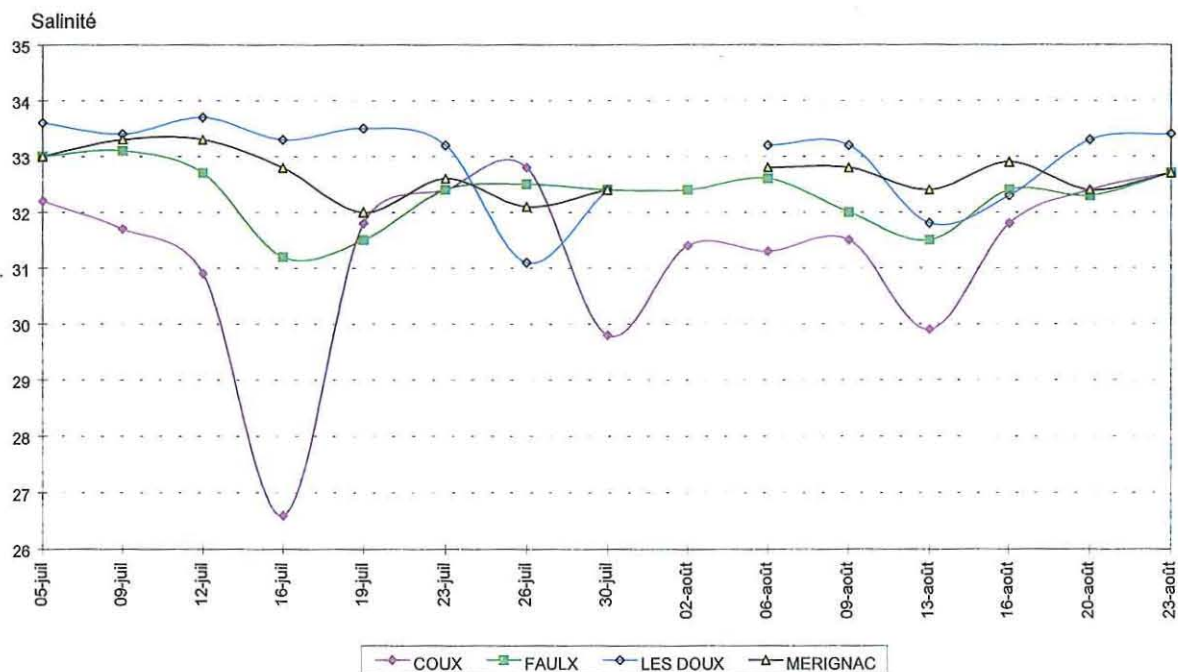


Figure 16 : Evolution des températures aux quatre points de prélèvement du bassin de Marennes-Oléron, en 2001

La température moyenne des eaux de surface (21,3 °C) se rapproche de celle de 1999. Elle est supérieure de 0,6 à 1,3 °C par rapport aux années antérieures. Les fluctuations de température aux différents points d'étude sont comparables, avec cependant des valeurs plus élevées au niveau de la Seudre. La ponte massive du mois de juillet coïncide avec une forte augmentation de la température qui passe de 19,4 à 24 °C. Ensuite, au mois d'août, malgré des fluctuations, la température reste au-dessus de 20,7 °C.

L'été 2001 est marquée par une salinité faible (moyenne de 32,3 ‰) des eaux de surface, en moyenne inférieure de 0,2 à 1 ‰ aux années précédentes. De part des conditions estuariennes, la salinité au niveau du secteur Seudre est en moyenne de 1 ‰ inférieure à celle du bassin.

3. Variation temporelle des populations larvaires dans le bassin d'Arcachon (cf figure 14)

Des larves en fixation sont déjà présentes dans les pêches au début du mois de juillet et à la mi-juillet ce qui est plus précoce qu'en 1998 et 2000.

Une ponte massive est observée aux mêmes dates que pour le bassin charentais (du 19 au 26 juillet).

Trois semaines plus tard, une importante densité de larves en fixation est observée. La durée de développement complet de cette cohorte (environ 24 jours) est ainsi normale.

Il est à noter que cette cohorte ne peut pas être suivie au cours des différents stades. En effet, la densité des larves « grosses » est très minoritaire par rapport à celle des larves en fixation.

Le taux de survie de la cohorte est d'environ 10 % (pourcentage de larve au stade « petites » qui parviennent au stade ultime : larves en fixation). Cette valeur est beaucoup plus élevée à celle observée dans le bassin charentais.

L'année 2001, donne des comptages plus élevés qu'en 2000 et 1998. Les larves « grosses » et « en fixation » sont observées plusieurs semaines de suite. Cependant, contrairement au bassin de Marennes-Oléron, une deuxième ponte n'est pas observée pendant le mois d'août.

III. Résultats de l'examen macroscopique des larves vivantes

Il est tout d'abord à noter que les prélèvements contiennent un grand nombre d'espèces planctoniques autres que les larves de *Crassostrea gigas*. En effet, dans les échantillons différents taxons sont représentés en plus ou moins grande densité. Les Copépodes sont observés dans la totalité des prélèvements et leur nombre peut parfois atteindre 50 % du total des espèces représentées.

A partir de fin juillet, les larves de Gastéropodes deviennent de plus en plus abondantes.

Sporadiquement, des larves de Décapodes ou d'Annélides et des Protozoaires sont aussi présentes.

De nombreuses espèces du phytoplancton sont représentées avec les Diatomées et les Péridiniens.

De plus, en fonction des conditions météorologiques des jours qui précèdent la pêche (pluies abondantes, vents forts), des sédiments ou des débris d'Algues sont captés.

Sur les échantillons du Bassin de Marennes-Oléron, l'observation en microscopie optique des larves d'huîtres creuses ne révèle pas d'anomalies. La mobilité des larves semble normale et leur velum n'est pas endommagé. Toutefois, certains individus présentent une coquille brisée, mais il est difficile de déterminer si ce phénomène est à imputer aux manipulations lors du tri ou s'il révèle une réelle malformation.

Au contraire, dans trois échantillons d'Arcachon, des larves mortes (coquilles dépourvues de leur contenu) sont trouvées. Ces échantillons proviennent des prélèvements faits dans les premiers jours d'août, dans le secteur ouest, aux stations Piquey et Jacquets. Ils comprennent des larves moyennes et grosses peu nombreuses, associées à un nombre important d'espèces planctoniques.

IV. Recherche de virus de type herpès par PCR sur du matériel congelé

Tout d'abord, l'absence d'inhibition de la réaction de PCR, par des organismes autres que les larves d'huître, a été testée par l'utilisation d'un standard interne mis au point par Renault *et coll.* (1999). Les résultats positifs obtenus permettent d'accorder une plus grande fiabilité aux résultats négatifs, de détection virale, et de contrôler en partie la validité de la préparation des échantillons.

De même, la mise en évidence d'ADN de *Crassostrea gigas* dans la totalité des prélèvements indique que le matériel biologique est en quantité suffisante pour l'étude et qu'il n'est pas affecté par la préparation.

96 lots du bassin de Marennes-Oléron ont été testés par PCR avec le couple amorces OHV3/OHV114. Chaque lot se compose de trois sous-échantillons correspondants aux trois tamis de maillage différent lors de l'étape de tri.

Toutes les analyses ont été négatives, à l'exception du lot du 24 juillet 2001 provenant de la zone de captage de Mérignac. Cet échantillon contenait de nombreuses larves au stade « petites » avec une majorité de Copépodes et de Diatomées et quelques Cladocères. Le virus Herpès a été détecté dans un seul sous-échantillon correspondant au matériel prélevé sur le tamis de 125 µm avec les amorces OHV3/OHV114 mais pas avec les amorces IAP3/IAP4. Sur les 28 lots provenant du bassin d'Arcachon aucun ne s'est révélé positif, malgré les anomalies détectées en observation macroscopique.

L'utilisation du couple d'amorces IAP3/IAP4, sur le lot positif n'a pas permis de confirmer la présence du virus.

DISCUSSION

I. Interprétation des courbes de dénombrement larvaire dans les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron

Dans le bassin de Marennes-Oléron, en 2001, il n'apparaît pas d'anomalies dans le captage du naissain. En effet, les facteurs abiotiques (température et salinité) des mois estivaux ont peut-être favorisé un développement optimal des larves. Les pluies abondantes du début du mois de juillet ont provoqué une légère dessalure des eaux superficielles. De plus, la température élevée de l'air du mois de juin, et le réchauffement rapide à la mi-juillet ont concouru à maintenir une température des masses d'eau importante.

L'action simultanée de ces deux facteurs a sans doute permis un développement rapide (18 jours) et complet de la cohorte de larves au stade « petite » du mois de juillet. Ainsi, après la ponte (autour du 19 juillet) la température n'a cessé d'augmenter jusqu'à la fixation des larves.

La persistance, dans la colonne d'eau, des larves au stade ultime, à des densités élevées, plusieurs semaines de suite est souvent associé à un captage satisfaisant, (Auby et coll., 2000) mais il faudra le confirmer par des comptages sur collecteurs.

Cette année est aussi marquée par la précocité des premières pontes (mois de juin). Ainsi, des larves en fixation sont déjà présentes début juillet.

Ensuite, le temps de maturation gamétique avant un nouvelle ponte et l'abaissement des températures au début du mois de juillet ont peut être concourus à retarder la ponte massive de juillet.

L'anomalie observée lors du développement de la cohorte provenant de la ponte de juillet, avec une densité de larves « petites évoluées » plus basse que celle des larves « moyennes », est difficilement explicable. Cependant, elle doit sûrement être imputée au protocole de pêche. En effet, le pas de temps séparant deux prélèvements (2 à 4 jours) est parfois plus long que celui séparant le développement de deux stades larvaires successifs.

La saison de reproduction dans le bassin d'Arcachon est semblable à celle du bassin charentais. En effet, la période de reproduction est relativement plus précoce que d'habitude, notamment comparée à l'année 2000 (cf figure 13). Cette précocité est susceptible de favoriser le développement larvaire, de part des conditions trophiques et de températures meilleurs que pour des pontes plus tardives.

Un seule deuxième ponte intervient dans la dernière décade de juillet.

Aucune anomalie n'est observée dans le développement larvaire, avec une persistance des laves en fixation sur la totalité du mois d'août. Des densités de ces larves au stade ultime sont parfois très supérieures à celles des stades antérieurs. Ces anomalies peuvent être imputées à la technique de dénombrement qui surestime les densités des larves développées par rapport à celles des larves « petites » ou « évoluées ». Cependant, sur certaines pêches des mortalités de larves évoluées ont été observées.

Malgré la possibilité de déterminer une évolution générale des populations larvaires, les techniques d'analyses introduisent de nombreux biais.

Tout d'abord, la méthode de prélèvement présente des limites liées au colmatage des filets. En effet, en fonction de la teneur en particules dans l'eau, les filets se colmatent plus ou moins rapidement selon les sites et les périodes dans un même été ou suivant les années. De ce fait, la capture réalisée avec les filets ne peut pas être considérée comme étant représentative de la véritable abondance larvaire. Cependant, ce dispositif, comparé à d'autres méthodes (pompage) offre l'avantage d'échantillonner une masse d'eau plus importante et donc de minimiser la distribution irrégulière des larves dans le milieu (Auby *et coll.*, 2000).

La modification de la technique de comptage pour l'année 2001 en Charente pose aussi des problèmes. Les résultats obtenus avec l'ancien protocole semblent être inférieurs au dénombrement de cette année. Cependant, il est impossible de déterminer dans quelle proportion. Ainsi, les comparaisons inter-annuelles doivent être effectuées sous certaines réserves.

L'interprétation des résultats des dénombrements de larves nécessite quelques précisions. En effet, surtout pour le premier stade (« petites »), les densités observées lors de l'échantillonnage sont très dépendantes de l'indice temporel. Du fait que les pêches sont réalisées tous les deux à quatre jours dans un secteur donné, il existe un décalage plus ou moins important entre la ponte et la récolte des larves à ce stade. Si la pêche est réalisée juste après les 24 heures suivant la ponte dans la zone où les géniteurs ont émis leurs gamètes, les larves « petites » présentent une abondance maximale, due au fait qu'elles ne sont pas encore trop dispersées par l'hydrodynamisme. Plus ce décalage augmente, moins ces larves sont abondantes dans le prélèvement. Il apparaît donc difficile de comparer l'intensité des différentes pontes d'une saison et celles des pontes d'années différentes (Auby *et coll.*, 2000).

Ainsi, l'intervalle de temps séparant les pêches semble adapté pour un suivi général des populations naturelles de larves. Cependant, pour une analyse quantitative poussée, le pas de temps d'échantillonnage devrait être réduit.

L'hydrodynamisme est aussi un paramètre important dans le dénombrement larvaire, car, en fonction des mouvements des masses d'eau, les populations larvaires peuvent être rapidement exportées hors des zones de pêches. La connaissance parfaite des conditions hydrodynamiques des bassins se révèle être d'une importance majeure pour comprendre l'évolution des cohortes lors de leur développement.

De plus, les mesures des paramètres physico-chimiques sont peu fiables, de part, le pas de temps d'analyse (2 à 4 jours). L'utilisation de sonde pourrait permettre un suivi continu, plus rigoureux.

II. Difficultés de la détection du virus de type herpès sur les larves du milieu naturel

Un seul des 121 lots issus des deux bassins ne s'est avéré être positif à la détection du virus Herpès par utilisation d'un couple d'amorce (OHV3/OHV114). Cependant, l'absence de détection avec un deuxième couple d'amorces ne permet pas de conclure à la présence réelle du virus dans le prélèvement. Mais les amorces IAP n'ont pas forcément la même sensibilité.

De plus, il est nécessaire de s'interroger sur la présence du virus au sein même des larves de *Crassostrea gigas*. En effet, de nombreuses autres espèces de Bivalves marins

peuvent être porteur de l'agent pathogène de type herpès. Or, la diversité spécifique présente dans les prélèvements est donc une source de biais qu'en à la détection du virus dans des larves d'huître creuse.

De même, il est possible que l'ADN viral soit conservé dans le milieu, et puisse ainsi être adsorbé sur des particules organiques ou minérales. La détection d'un fragment intègre du génome dans les prélèvements est donc envisageable sans que le virus n'infecte les populations zooplanctoniques.

Des études, pourraient alors être menées pour déterminer le rôle potentiel de vecteur, joué par l'eau, dans la transmission intra et interspécifique de l'infection. Dans ce cas, le principal facteur limitant va être la survie du virus Herpès dans le milieu extérieur.

L'infection de type Herpès a été trouvée en milieu ouvert, plus présente chez certaines familles taxonomiques que dans d'autres. De plus, les larves étaient contaminées. L'hypothèse d'une transmission par l'eau n'est donc pas évidente.

La technique de PCR pose aussi le problème de la sensibilité de la détection. Ainsi, l'obtention de résultats négatifs devra être confirmée par l'utilisation d'autres techniques d'analyses et d'autres techniques de préparation des échantillons.

La microscopie électronique s'inscrit comme une méthode fiable pour tester la viabilité des résultats. Cependant, d'autres techniques comme l'hybridation in situ pourrait être adaptée à la détection du virus sur des larves.

III. Difficulté d'établir un lien entre la détection du virus herpès et une mortalité larvaire

Le lot positif provient d'un prélèvement réalisé au moment de la ponte massive de juillet. Le suivi temporel de l'effectif de cette cohorte ne révèle pas d'anomalie, et la population semble évoluée normalement.

Dans l'autre sens, il n'a pas été détecté d'Herpès virus sur les lots de larves moribondes d'Arcachon.

Des lots positifs n'ont pas été trouvés, sur Arcachon, comme en 2000. Cependant, la technique de détection n'est peut-être pas encore totalement optimisée pour les larves du milieu naturel.

CONCLUSION

Même si le déclenchement de mortalités chez des larves de *Crassostrea gigas*, associée à la présence de virus de type Herpès a été avérée en éclosion, l'étude sur les populations naturelles reste délicate.

En effet, les techniques de détection doivent être optimisées en tenant compte de l'importante diversité spécifique des prélèvements. Ainsi, malgré l'absence d'inhibition de la réaction de détection, la quasi-ubiquité du virus chez les bivalves marins, ainsi que sa possible persistance dans le milieu, pourraient biaiser les résultats obtenus.

De plus, à l'heure actuelle, le suivi temporel et spatial des différentes cohortes larvaires demande des études plus approfondies. La modélisation de la courantologie et de l'hydrodynamisme des bassins est un moyen, de connaître le devenir des populations larvaires, à explorer.

Enfin, la mise en évidence, pour la première fois, d'un lot positif dans le bassin de Marennes-Oléron incite à continuer le suivi annuel entrepris depuis 1998 dans les deux bassins concernés par le captage. Cependant, cet unique cas de détection ne permet pas de conclure sur l'impact réel du virus sur les populations naturelles de larves d'huître creuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUBY I., MAURER D., MASSON N., D'AMICO F., DEYNU D., TOURNAIRE M.P., TRUT G., CANTIN C. et PELLIER C., 2000. Etude des causes du faible captage de naissain d'huître creuse dans le bassin d'Arcachon en 1998. Rapport IFREMER DEL/AR, 139 p. + Annexes.

BARRY M. M. et YEVITCH P. P. 1972. Incidence of gonadal cancer in quahaug *Mercenaria mercenaria*. *Oncology*, n° 26, p. 87 à 96.

BOIDRON-METAIRON I.F., 1995. Larval nutrition. *Marine Invertebrate Larvae*, Ed. L. McEdward. CRC Press, Boca Raton New-York Mondon Tokyo, p. 223 à 248.

BOURY M., 1928. Etude sur la reproduction des huîtres. *Biologie ostréicole*. *Revue des Travaux de l'Office de Pêches Maritimes*, p. 87 à 98.

COMPS M. et COCHENNEC N., 1993. A herpes-like virus from european oyster *Ostrea edulis* L. *J. Inv. Pathol.*, n° 62.

DALES S. et CHARDONNET Y., 1973. Early events in the interaction of adenovirus with HeLa Cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology*, n° 56, p.465 à 483.

DARLINGTON R. W. et MOSS L. H., 1969. The envelope of herpes virus. *Prog. Med. Virol.*, n° 11, p.16 à 45.

DESLOUS-PAOLI J.M., 1980. Contribution à l'étude de la biologie de l'huître *C.gigas* dans le Bassin et les claires de Marennes-Oléron. Thèse, Université d'Aix Marseille.

FARLEY C. A., 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. *Prog. Exp. Tumor Res.*, n° 20, p.283 à 294.

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.

GOULLETQUER P., 1995. Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapport DEL, La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France.

GRIZEL H., 1996. Les maladies des Mollusques bivalves : risques et préventions. *Rev. Sci. Tech. OIE*, n° 16, p. 161 à 171.

GRAS P., COMPS M. et BARON G., 1971. Observations préliminaires sur la reproduction des huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron en 1971. Science et Pêche – Publication mensuelle n° 207 – Octobre 1971.

HEDGECOCK *et coll.*, 1999. Marine Biology, n° 133, p. 65 à 68.

HERAL M., DESLOUS-PAOLI J.M et PROU J., 1986. Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées *C. angulata* et *C. gigas* dans le Bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, n° 15, p. 193 à 207.

HERAL M., 1990. Traditional oyster culture in France. In *Barnabé Edit.*, Bases biologiques & écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec & Doc, Volume 1, p. 347 à 397.

HINE P. M. WESNEY B. et HAY B. E., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, n° 20, p. 219 à 229.

HINE P. M. WESNEY B. et BESANT P., 1998. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*, n° 32, p. 161 à 171.

HIS E., 1991. Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I.

HIS E., ROBERT R. et DINET M.J, 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, n° 100, p. 455 à 463.

HIS E. et CANTIN C., 1995. Biologie et Physiologie des coquillages. Rapport IFREMER.

JOLY J.-P., BODOY A. et BAUD J.P., 1989. Guide du télécapage. Rapport IFREMER.

KIEFF E. et SHENK T., 1998. Modulation of apoptosis by Herpesviruses. *Seminars in virology*, n° 8, p. 471 à 480.

LANGO REYNOSO F., DEVAUCHELLE N., LE PENNEC M. et HATT P.J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de brest", in France. *Invertebrate Reproduction and development*, Sep. 1999, n° 36, p. 141 à 144.

LE DEUFF R.-M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux II.

LE DEUFF R.-M., RENAULT T. et GERARD A., 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, n° 24, p. 149 à 157.

LE DEUFF R.-M. et RENAULT T., 1999. Purification and partial genom cloning of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Journal of General Virology*, n° 80, p. 1317 à 1322.

LUBET P.E., 1980. Influence des facteurs externes sur la reproduction des Lamellibrances. *Oceanis*, n° 6, p. 469 à 489.

MANAUD F., BOUCHET J. M., DELTREIL J. P. MAURER D., TRUT G., AUBY I., DRENO J. P., L'YAVANC J., MASSON N. et PELLIER C., 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. Tome 1 : Physique. Rapport interne DEL/Arcachon, 5 classeurs.

MANAUD F., BOUCHET J. M., DELTREIL J. P. MAURER D., TRUT G., AUBY I., DRENO J. P., L'YAVANC J., MASSON N. et PELLIER C., 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. Tome 5 : Activités ressources vivantes. Rapport interne DEL/Arcachon, 5 classeurs.

MANN R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *C. gigas* and *O. edulis* grown at sustained elevated temperature. *J. mar. Bio. Ass. U.K.* n° 59, p. 95 à 110.

MARTEIL L., 1960. Ecologie des huîtres du Morbihan, *Ostrea edulis* et *Gryphaea angulata*. *Ibid.*, n°29, p. 327 à 446.

MARTEIL L., 1974. La conchyliculture française, 1^{ère} partie. Le milieu naturel et ces variations. *Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes*, p. 50 à 52.

MARTEIL L., 1976. La conchyliculture française, 2^{ème} partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, n° 40, p. 149 à 346.

MAURER D. et BOREL M., 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *C. gigas* dans le Bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis*, n° 15, p. 125 à 134.

MAURER D., AUBY I., MASSON N., SAUTOUR B., D'AMICO F., DEYNU D., TOURNAIRE M.P., TRUT G., CANTIN C. et PELLIER C., 2001. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Rapport IFREMER DEL/AR, 132 p. + Annexes.

MORGAN C., ROSE H. M. et MEDNIS B., 1968. Electron microscopy oh herpes simplex virus. I. Entry. *J. Virol.*, n° 2, p.507 à 516.

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.

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 Pacif oyster, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue Méd. Vét.*, n° 145, p. 735 à 742.

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

RENAULT T., LIPART C., 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. European Aquaculture Society. Special publication n°26, p. 235 à 236.

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 T., LIPART C. et ARZUL I., 2001. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species : virus replication in *Ruditapes Philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, n° 45, p. 1 à 7.

ROIZMAN B. et FURLONG D., 1974. The replication of herpesviruses. In *Comprehensive Virology, Plenum*, New York, Volume 3, p. 1787 à 1793.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALCOMA F., MULLIS K.B, HORN G.T., ERLICH H.A. et ARNHEIM N., 1985. Enzymatic amplification of globulin genomic sequences en restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, p. 1350 à 1354.

SOLLIEC G., 2001. Recherche dans des échantillons d'eau de claires ostréicoles d'ADN de virus de type herpès infectant les bivalves marins. Rapport de Stage. IUT de La Rochelle.

THEBAULT A., 2000. Rapport annuel du réseau de surveillance zoosanitaire des Mollusques marins 1999. 70 p.

TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A., 2001. *Epidémiologie appliquée*. 2nd ed. AEEMA, Maison Alfort, 696 p.

TROCHON P., 1955. Observation sur la répartition en profondeur des larves de *Gryphaea angulata* L. dans les eaux de la région de Marennes. *Revue des Travaux de l'Office de Pêches Maritimes*, p. 363 à 378.

WILDY P. et WATSON D. H., 1963. Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, n° 27, p. 25 à 47.

ANNEXES

Annexe 1 : Mise en œuvre de la réaction de PCR pour la détection d'ADN viral

La purification de particules virales à partir de larves de *Crassostrea gigas* infectées, a permis d'extraire l'ADN du virus de type Herpès (Le Deuff, 1995 ; Le Deuff et Renault, 1999). A partir de cette ADN purifié, des amorces de PCR ont pu être construites.

Les couples d'amorces utilisés sont : OHV3/OHV114 et IAP3/IAP4 (Renault *et coll.*, 1997).

Le mélange réactionnel utilisé pour la détection par PCR de l'ADN du virus de type herpès est présenté dans le tableau A. Les 35 cycles de réaction de PCR sont réalisés dans un thermocycleur PTC 100. Après une première dénaturation à 94 °C pendant 2 minutes, 35 cycles sont effectués, achevés par une phase d'élongation de 5 minutes à 72 °C. Chaque cycle se décompose comme suit : 1 minute de dénaturation à 94 °C, puis 1 minute d'hybridation à 50 °C et enfin 1 minute d'allongement à 72 °C (Renault *et coll.*, 2000).

Tableau A : Mélange réactionnel utilisé pour la détection par PCR de l'ADN viral :

Produits (Eurogentec, Belgique)	Volumes
Eau bidistillée	31,5 µl
Tampon de réaction 10 X	5 µl
Chlorure de Magnésium	5 µl
Mélange nucléotidique (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	5 µl
Amorces OHV3 ou IAP3	1 µl
Amorces OHV114 ou IAP4	1 µl
Taq polymérase Goldstar	0,5 µl
Echantillon d'ADN à tester	1 µl

Les produits de PCR sont ensuite analysés par séparation électrophorétique sur gel d'agarose à 1 % contenant un agent intercalant fluorescent, le bromure d'éthidium. Les échantillons (10 µl) ainsi qu'un marqueur de masses moléculaires sont déposés dans les puits du gel, additionnés d'un tampon de charge. Le gel est ensuite soumis à un champ électrique (100 volts et 400 mA). Après migration, le gel est enfin observé sur un transilluminateur en lumière ultraviolette.

Avant d'être passés en PCR, les échantillons subissent un traitement particulier. Ainsi, les larves sont broyées en tube Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet, en présence d'eau distillée (X µl d'eau distillée pour X mg de larves). Les broyats obtenus sont ensuite placés au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, puis centrifugés (10000 tours, 5 minutes à 4 °C). Les surnageants sont repris dans de l'eau bidistillée (dilution au dixième).

Annexe 2 : Mise en œuvre de la réaction de PCR pour la détection d'ADN de *Crassostrea gigas*

Le couple d'amorces ITSA/ITSB (Hedgecock *et coll.*, 1999)* est utilisé pour la détection de l'ADN génomique de l'huître creuse.

Le mélange réactionnel intervenant dans cette réaction est présenté dans le tableau B.

Tableau B : Mélange réactionnel utilisé pour la détection par PCR de l'ADN de *Crassostrea gigas* :

Produits (Eurogentec, Belgique)	Volumes
Eau bidistillée	32,65 μ l
Tampon de réaction 10 X	5 μ l
Chlorure de Magnésium	3 μ l
Mélange nucléotidique (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	5 μ l
Amorce ITSA	1 μ l
Amorce ITSB	1 μ l
Taq polymérase Sylverstar	0,35 μ l
Echantillon d'ADN à tester	2 μ l

Programme du thermocycleur :

- 2 minutes à 94 °C
- 30 cycles de :
 - 1 minute à 94 °C
 - 1 minute à 52 °C
 - 1'15 minute à 72 °C
- 7 minutes à 72 °C

Les produits de PCR amplifiés sont analysés sur gel d'agarose marqué au bromure d'éthidium.

* : Hedgecock *et coll.*, 1999. Marine Biology, n° 133, p. 65 à 68.

Annexe 3 : Solutions et Produits

Electrophorèse en gel d'agarose :

TBE concentré (utilisé dilué 10 fois) :

- Tris base..... 54 g
- Acide borique..... 27,5 g
- EDTA..... 1mM

Gel d'agarose (1 %) :

- Peser la quantité requise d'agarose
- Ajouter le volume nécessaire de TBE dilué et porter à ébullition.

Tampon de dépôt (utilisé dilué 6 fois : 2 μ l + 10 μ l d'échantillon) :

- Bleu de bromophénol..... 0,25 %
- Xylène cyanol FF..... 0,25 %
- Sucrose..... 40 %
- Conserver à 4°C

Bromure d'éthidium..... 10 mg/ml

Microscopie électronique

Glutaraldéhyde à 3 % :

- Glutaraldéhyde 25 %..... 2,5 ml
- Cacodylate de sodium 0,4 M..... 5 ml
- NaCl 10 %..... 3,5 ml
- Eau distillée..... 9 ml

Annexe 4 : Différents stades de développement larvaire de *Crassostrea gigas*

