

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie  
B.P. 133  
17390 La Tremblade

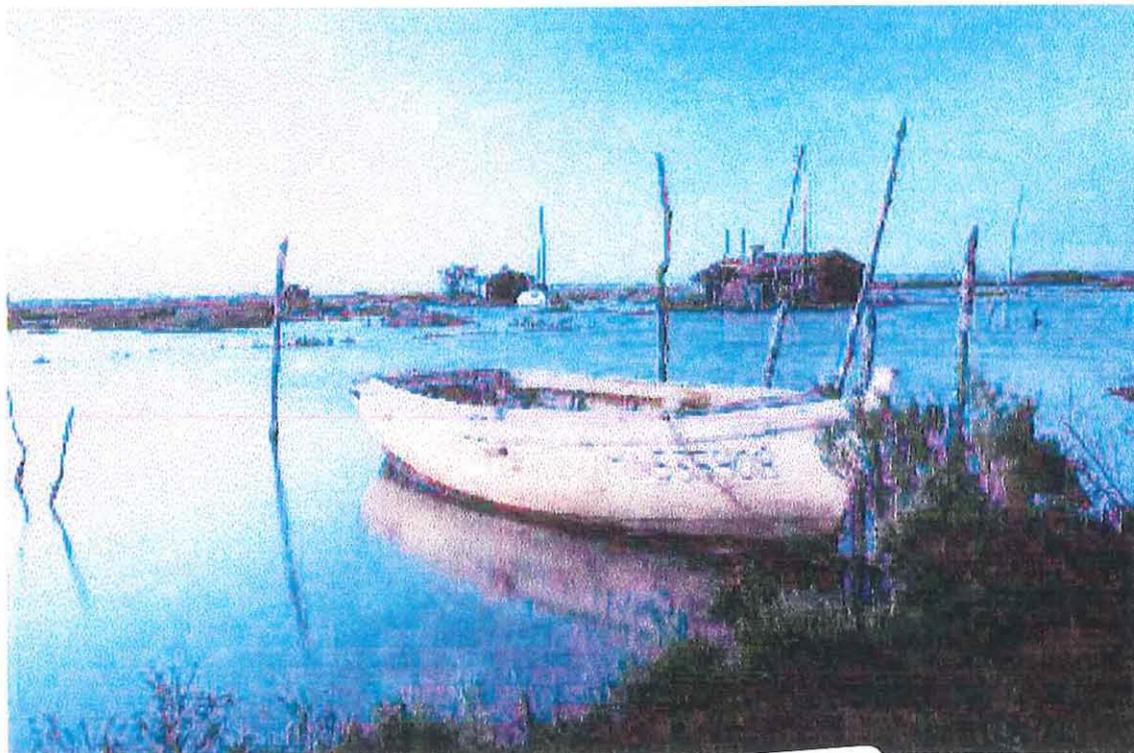
Rapport de stage  
(15 juin au 31 août 1999)  
Licence de Biologie  
Université de La Rochelle

# Etude des mortalités estivales du naissain en poche à Fouras

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADÉ

Raude Maëlle

52035  
H5104  
201000.E



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 00810



IFREMER

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier Jean-Pierre Flassch et André Gérard pour leur accueil au sein du laboratoire de l'IFREMER de Ronce-les-Bains.

Un grand merci à mon maître de stage, Anne Thébault, pour m'avoir bien guidée tout au long de ce stage et pour sa passion pour son métier.

Merci à tout ceux qui m'ont aidé au sein du stage, Bruno Chollet, Phillipe Geairon et Greg.

Je tiens à remercier également toute l'équipe présente dans ce labo pour leur gentillesse et leur bonne humeur quotidienne.

Un petit clin d'oeil à Maëva, à Isa, à Coco et à Gemma pour leur gentillesse exemplaire et à tous les autres qui se reconnaîtrons !.

Et enfin, merci à tous les professionnels, dont Mr Giraudeau, pour leur participation et pour nous avoir confié si gentiment leurs poches.

## RESUME

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est connue pour être une espèce de mollusque bivalve marin d'un intérêt économique très important. Hors, des mortalités anormales, durant les périodes estivales, ont été constatées sur le naissain d'huître creuse en France depuis 1993.

Un virus de type Herpès a été associé à certaines de ces mortalités.

Aussi, chez les adultes, de fortes mortalités ont été également rapportées et semblent être associées à une détresse physiologique au moment de la reproduction.

Les objectifs de cette étude sont d'optimiser l'indicateur de mortalité, de confirmer la cinétique du virus et le rôle ou non des facteurs physiologiques, de compléter une base de données de pathologie intégrée au sein d'un logiciel d'information géographique (ARCVIEW) ainsi que de déterminer les relations entre les facteurs et les mortalités, et d'approfondir l'étude sur le virus de type Herpès au niveau du site choisi.

La mortalité mesurée est considérée comme normale et croit lentement de fin mai à mi-août pour se stabiliser en fin août. Un indicateur de mortalité à 3 critères est indispensable pour une bonne estimation.

Seulement un lot a donné un résultat positif pour la détection d'ADN viral en PCR.

Le taux de glycogène, obtenu par analyses biochimiques sur le naissain, baisse brutalement entre début juin et début juillet comme pour les adultes, aussi la taille et le poids sec augmentent.

Des critères de maturation ainsi qu'un classement des stades de la gamétogénèse avaient été définis lors de la même étude en 1998. Les différents stades sont obtenus grâce à des techniques histologiques. Des différences de maturation gamétique entre périodes sont obtenues, même si seulement 4 lots ont été étudiés.

Pour parfaire l'étude, il faudrait prendre plus de périodes, plus d'individus et considérer le taux de lipides.

**Mots-clés :** Mortalité estivale, *Crassostrea gigas*, virus de type Herpès, gamétogénèse

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
<b>D) DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES ET CONTEXTE DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>3</b>
I.1.) CONTEXTE GÉOGRAPHIQUE ET ÉCONOMIQUE.....	3
I.2.) DESCRIPTION DES MORTALITÉS ESTIVALES DE NAISSAIN .....	3
I.3.) ORIGINE DE MORTALITÉ NON INFECTIEUSE .....	3
I-3-1) <i>La reproduction</i> .....	3
I-3-2) <i>Les réserves énergétiques et la maturation</i> .....	4
I-3-3) <i>Les autres origines</i> .....	5
I.4.) ORIGINE DE MORTALITÉ INFECTIEUSE .....	5
I-4-1) <i>Généralité sur Herpesviridae</i> .....	6
FIGURE 3.....	7
I-4-2) <i>Herpesvirus sur Crassostrea gigas</i> .....	9
I.5.) ORIGINE DE MORTALITÉ SUR FOURAS.....	12
I.6.) DONNÉES DES PRÉ-ÉTUDES .....	13
I.6.1) <i>Pré-étude 1997</i> .....	13
I.6.2) <i>Etude 1998</i> .....	13
I.6.3) <i>Objectifs de l'étude 1999</i> .....	14
<b>II) MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>15</b>
II.1. LA POPULATION STATISTIQUE .....	15
II.2. PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE.....	15
II.3. MESURE DE MORTALITÉ .....	15
II.4. MESURE DE LA GAMÉTOGÉNÈSE .....	16
II.4.1. <i>Techniques histologiques</i> .....	16
II.4.2. <i>Détermination des stades de maturation gonadique par histologie</i> .....	16
II.4.3. <i>Echantillonnage</i> .....	17
II.5. LA POLYMERASE CHAIN RÉACTION (PCR).....	17
II.7. MESURE DU TAUX DE GLYCOGÈNE .....	17
<b>LE TAUX DE GLYCOGÈNE EST MESURÉ GRÂCE À UNE MÉTHODE BIOCHIMIQUE (MÉTHODE DE DUBOIS ET AL, 1956) (ANNEXE 11). .....</b>	<b>17</b>
II.8. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES .....	18
<b>III) RESULTATS .....</b>	<b>18</b>
III.1. ) LA MORTALITÉ .....	18
III.1.1) <i>Mortalité en 1999 avec le critère 1</i> .....	19
III.1.2) <i>Mortalité en 1999 avec le critère 2</i> .....	20
III.1.3) <i>Mortalité en 1999 avec le critère 3</i> .....	20
III.1.4. <i>Comparaison des 3 critères</i> .....	21
III.2) LES ANALYSES PCR.....	22
III.3) LES ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	22
III.3.1. <i>Le taux de glycogène</i> .....	22
III.3.2. <i>Le poids sec</i> .....	23
III.3.3. <i>La longueur</i> .....	23
III.4) LA MATURATION GONADIQUE .....	24
III.4.1. <i>Les stades de maturation en fonction des sexes</i> .....	24
III.4.2. <i>Rapport entre la taille et le sexe des individus</i> .....	25
<b>IV) DISCUSSION-CONCLUSION.....</b>	<b>28</b>
IV.1) PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE .....	28
IV.2 ) LA MORTALITÉ.....	28
IV.3 ) LA TECHNIQUE DE PCR .....	29
IV.4 ) LA MATURATION GAMÉTIQUE .....	29
IV.5 ) LES ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	30

**V) CONCLUSION.....30**

**BIBLIOGRAPHIE.....31**

## INTRODUCTION

L'élevage de l'huître plate dans la région Centre-Ouest remonte à l'antiquité. Les Grecs et les Romains consommèrent les huîtres d'un immense banc naturel qui s'étalait des côtes scandinaves aux côtes atlantiques sud.

Le développement de l'huître creuse fût lié à un événement particulier. En effet, en 1867, l'équipage d'un navire, le «Morlaisien», dût jeter sur les côtes de la Gironde sa cargaison d'huîtres portugaises.

Dans les années 1970, ces huîtres furent atteintes d'un problème viral, une maladie des branchies qui décima pratiquement toute la population.

Aussi, deux parasites, *Martelia refringens* (1974) et *Bonamia ostrea* (1979), sévirent sur les populations d'huîtres plates. La production annuelle passa ainsi de 20000 à 2000 tonnes.

Enfin, vers la fin des années 1970, l'ensemble du bassin ostréicole fût réensemencé à partir d'une autre espèce en provenance de Colombie Britannique (Canada) et du Japon, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Celle-ci semble s'être bien adaptée aux conditions du milieu offert par l'environnement local. Mais, elle n'est pas plus à l'abri que ces prédécesseurs. En effet, des épisodes de mortalité de larves et de naissain ont été décrit sur l'ensemble du littoral français depuis 1991 avec un pic dans les années 94 et 95 (M-I Lodato, 1997). Depuis, cette mortalité est plus modérée. Une étude sur une population d'adultes montre 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).

Le problème des pertes économiques, entraîné par ces mortalités, a contraint les chercheurs de l'IFREMER de Ronce-les-Bains à s'intéresser à cette espèce d'huître, *Crassostrea gigas*.

D'après des données d'écologie marine sur des animaux dans leur milieu naturel, ces mortalités pourraient être dues à différentes raisons comme le retard de la métamorphose, des perturbations biologiques, physiques ou hydrologiques, le stress physiologique (insuffisance en réserve d'énergie), la compétition ou la prédation ainsi que les maladies ou le parasitisme (Heather L.Hunt, Robert E.Scheibling, 1997). Mais, il faut noter que les mortalités juvéniles importantes sont cependant assez fréquentes en milieu naturel et qu'elles ne sont considérées comme anormales qu'à partir un certain taux (20 % en 15 jours) en élevage.

Depuis l'été 91, années de fortes mortalités anormales de larves d'huîtres creuses issues d'écloserie française, des mortalités sporadiques ont été observées sur des larves et du naissain, produits en écloserie ou provenant du captage naturel (Nicolas et al., 1992). Ces mortalités, augmentant chaque année durant la période estivale, seraient ainsi liées à la détection d'un virus de type Herpès (Renault et al, 1994b).

Une répartition de la présence du virus dans la population est donc à étudier.

Il faut aussi déterminer si le moment des mortalités coïncide avec une détresse des réserves énergétiques (relevé du poids et de la taille des animaux) ou alors, s'il démarre en même temps que l'apparition du virus.

Ces informations peuvent ainsi être un atout majeur pour l'exportation de l'espèce à l'étranger.

Aussi, lors d'une étude sur une population de naissain *Crassostrea gigas*, la petite

taille et le grand nombre des animaux (de l'ordre de plusieurs millions d'individus par concessions) posent des difficultés supplémentaires d'estimation des mortalités et il est ainsi difficile d'estimer les pertes en élevage. Un bon indicateur de mortalité cumulée doit donc être trouvé et optimisé au cours du temps.

C'est pourquoi, une première étude établit en été 1997 a permis d'établir la méthodologie à appliquer pour estimer les mortalités sur un site traditionnel de captage de naissain, la pointe de la Fumée à Fouras.

Une deuxième étude, plus poussée, effectuée durant l'été 1998 par Gregory Allard, avait pour objet l'estimation des mortalités sur ce même site et la détermination des liens qui existeraient entre mortalités, détection virale et état physiologique des animaux.

Mais des questions subsistent encore, en effet, l'étude de l'été 1998 a montré des biais d'étude qui devraient être corrigés pour l'été 99. D'autre part, l'étude de l'été 99 devrait permettre d'optimiser l'indicateur de mortalité, de confirmer la cinétique du virus et le rôle ou non des facteurs physiologiques. Enfin, une base de données de pathologie sera intégrée au sein d'un logiciel d'information géographique (ARCVIEW), ce qui permettra d'établir des données historiques du site et d'ajouter, au cours du temps, des données océanographiques, écologiques et environnementales.

Cette étude va ainsi permettre de répondre à des questions fondamentales comme le lien entre les facteurs et les mortalités, et d'approfondir l'étude sur le virus de type Herpès au niveau du site choisi.

## **I) Données bibliographiques et contexte de l'étude**

### **I.1.) Contexte géographique et économique**

La presqu'île de Fouras est un site ostréicole traditionnel (figure 1) située en plein cœur de la zone littorale Ré-centre-ouest. Cette région possède 30 % des ventes de naissain de l'ensemble des sites d'élevage français, (70 % pour Arcachon), ce qui en fait un pôle économiquement très important et représente un lieu d'élection privilégié pour le captage du naissain.

Ainsi par de nombreux transferts, la production fourasine est dispersée sur tout le territoire.

Le captage du naissain se fait par des collecteurs adaptés (coupelles, tubes ou cadres pléneaux) et le naissain d'huître étudié, est fixé à la fin de l'été l'année précédente.

Ce naissain est mis en poche de mailles 6 mm, avec une moyenne de 5 kg d'huîtres par poche, déposées sur des tables surélevées.

L'avantage du site de la Pointe de la Fumée est qu'il est accessible à pied, et le naissain capté sur place. De ce fait, aucun juvénile ne provient d'un autre site, il n'y a donc pas d'introduction. Aussi, les concessions sont accessibles à des coefficients d'exondation compris entre 40 et 120.

Le site de la Pointe de la Fumée est représenté par 156 concessions, partagées en 117 concessionnaires. Le nombre d'individus par poche est de l'ordre de 1000, et les poches de naissain s'échelonnent de 6 à 1000 sur les concessions.

### **I.2.) Description des mortalités estivales de naissain**

Depuis l'introduction de *C. gigas* en France, des mortalités estivales ont été régulièrement observées dans deux bassins de la façade atlantique (Marennes-Oléron et Arcachon). A partir de 1991 et surtout au cours de 1994 et 1995, des mortalités ont été constatées dans des zones non traditionnellement concernées. De plus, des mortalités importantes ont affecté des individus produits en éclosérie-nurserie. Ces mortalités concernent dans la majorité des cas (à l'exception du banc de Ronce, dans le bassin de Marennes) des juvéniles, préférentiellement des huîtres en pleine pousse et élevées sur sol. Elles surviennent lors de réchauffement important. Elles sont par taches, localisées à des secteurs précis, limitées dans le temps et ne présentent pas d'extension fulgurante qui laisse à penser à un phénomène épizootique.

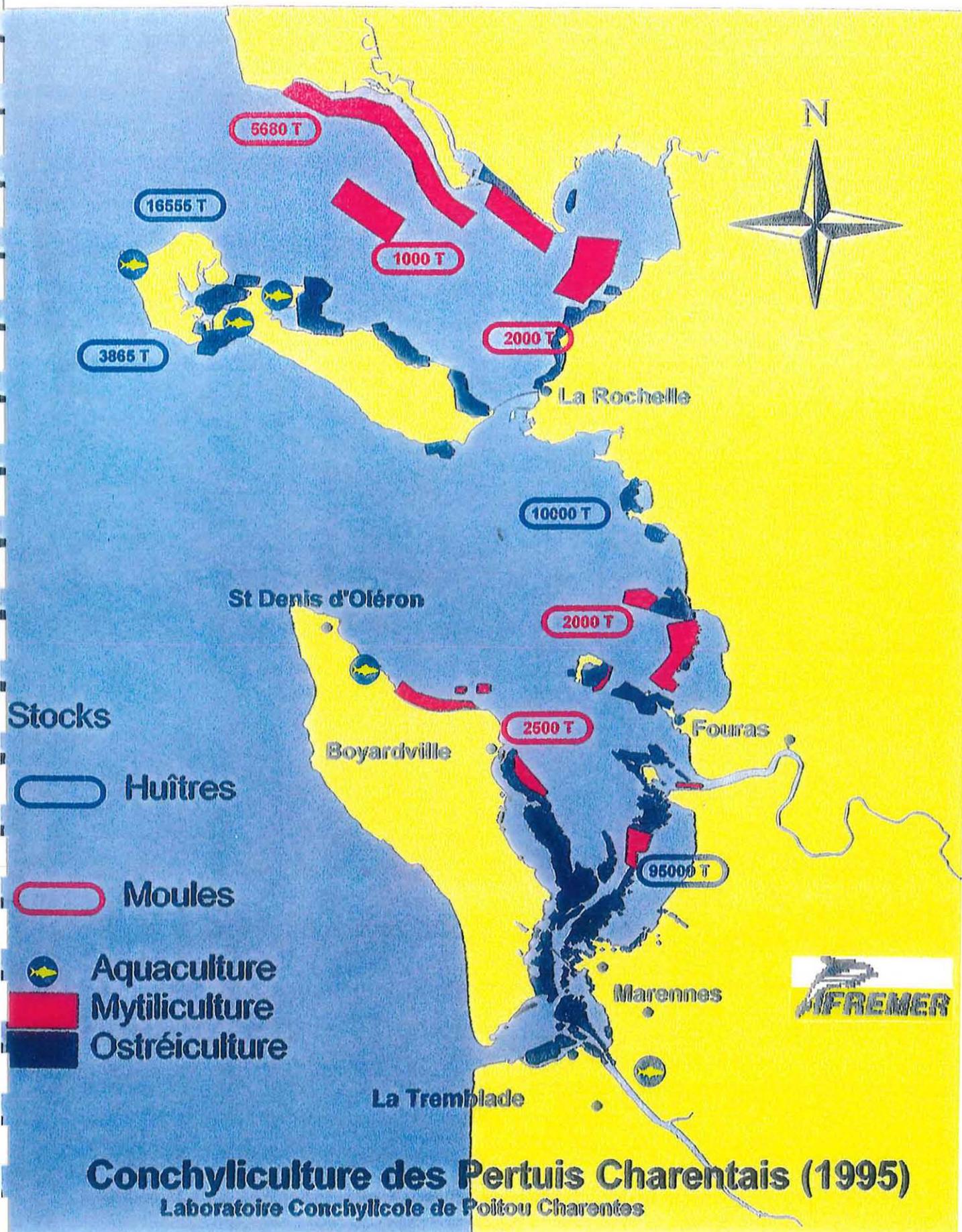
Enfin, celles-ci ont été nettement inférieures globalement au cours de l'année 1996 qui a été une année avec des températures printanières et estivales situées dans la moyenne des années antérieures à 1992.

### **I.3.) Origine de mortalité non infectieuse**

#### **I-3-1) La reproduction**

L'huître creuse présente un hermaphroditisme successif, et est alternativement mâle puis femelle. Le changement de sexe s'effectue à chaque saison de reproduction. La gamétogénèse

Figure 1



est un phénomène rythmique, qui comprend différentes phases. Au repos hivernal, succède une phase de production et de maturation des gamètes au printemps.

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 (Boucher C. 1978). La fécondation a lieu en pleine eau, et est synchronisée grâce à un contrôle par des fertilisines. Chaque animal émet entre 20 et 30 millions de gamètes. Dans les 18 heures après la formation de l'œuf, celle-ci devient larve trochophore puis larve veligère après 24 heures. Environ 15 jours après la fécondation apparaît l'umbo, et la larve se fixe pour devenir le naissain.

D'après D. Maurer et al., 1986, une étude descriptive sur les mortalités estivales de *C. gigas* dans le bassin d'Arcachon ne trouve pas de lien entre la maturation gamétique, le sexe et les mortalités de juvénile de 1 à 2 ans. Ces résultats relativement contradictoires avec ceux de Soletchnik et al. (1997) montrent la nécessité de mener une étude sur le sujet.

### I-3-2) Les réserves énergétiques et la maturation

Durant le mois de mai, les réserves en glucides et en glycogène baissent au profit des lipides des gamètes (Gabbot, 1976).

Il a aussi été démontré que des modifications biochimiques survenaient au cours de la vittellogénèse (Lubet, 1959; Gabbot, 1976). De plus, il existe une relation entre les cycles des constituants biochimiques et la gamétogénèse (Perdue et al, 1981).

A l'issue des mesures physiologiques effectuées sur les huîtres adultes de différents lots conditionnés par la température, les stades de maturation sexuelle sont déterminés sur la base d'observations macroscopiques et microscopiques à partir de critères issus des échelles de maturation de Marteil (1976) et Le Dantec (1968). Les critères macroscopiques concernent le recouvrement de la masse hépatopancréatique par la gonade et l'émission de produits génitaux à partir d'une pression sur la gonade (P. Soletchnik, 1996). Ces critères ne pourront être utilisés sur le naissain, en raison de la différence de taille. Cette étude montrait aussi une faiblesse physiologique marquée par un déficit de réserves en glycogène sur les huîtres de 2.5 ans et de 1.5 ans à un stade de maturation avancé.

Mori (1979) relie les mortalités à une intense glycogénolyse, menant à des teneurs en glycogène minimales à la ponte. De plus, il y aurait une accumulation de lipides dans l'épithélium du diverticule digestif accompagnée d'une diminution de l'activité physiologique. Les graisses deviendraient alors la principale source d'énergie mais elles ne seraient pas suffisantes pour couvrir les besoins énergétiques de l'huître et une mortalité en découlerait alors.

Une étude de D. Maurer et al. en 1986 sur des juvéniles montre que les mortalités se produisent après une chute marquée des réserves glucidiques, ceci grâce à une analyse des constituants biochimiques, et qu'elle résulterait d'un déficit énergétique, dont les effets sont brutalement aggravés par une intensification des chocs (thermiques et dû à l'assec) auxquels sont soumis les mollusques.

- Par contre, le naissain étant d'une taille beaucoup plus petite, seule une analyse histologique permettrait de différencier les stades gamétiques, d'autres critères pourront donc être pris en compte.
- Il faudra extrapoler les résultats de l'étude de Soletchnik et al. (1997) sur le naissain de 8 mois à 1 an, et vérifier que le déficit énergétique peut expliquer les mortalités.

- Il faudra déterminer le lien entre le déficit énergétique et les autres origines possibles de mortalité.

### I-3-3) Les autres origines

D'autres causes peuvent intervenir sur la mortalité du naissain. Très souvent, cette mortalité est due à l'association de plusieurs facteurs:

⇒ liés au milieu:

- ◇ dessalure brutale ou prolongée
- ◇ variations climatiques extrêmes
- ◇ malaïgues provoquant une anoxie: exemples sur l'étang de Thau (1997)
- ◇ manque de nourriture
- ◇ bloom de plancton toxique: exemple sur Pen Bé et en baie de

Bourgneuff: *Gymnodinium cf nagasienke*, dinoflagellé, a été responsable de mortalités importantes au cours de l'été 1995 en baie de Bourgneuff.

⇒ biologiques:

- ◇ prédation (poissons, bigorneaux perceurs, crabes,...) (Annexe 1)
- ◇ compétition (algues, balanes, arénicole,...) (Annexe 2)

⇒ liées aux pratiques professionnelles:

- ◇ transfert
- ◇ chocs thermiques
- ◇ stress provoqué lors de dragage, pêche,...

⇒ liés aux activités humaines:

- ◇ pollution chimique accidentelle
- ◇ pollutions dues aux activités urbaines, agricoles, industrielles
- ◇ peintures anti-salissure à base de TBT: exemple sur Arcachon : de 1977

à 1981 les larves ne se développaient pas normalement et ne passaient pas au stade évolué.

## I.4.) Origine de mortalité infectieuse

Les pathologies affectant les productions de mollusques sont essentiellement virales ou parasitaires, si l'on considère la liste des maladies reconnues graves ( OIE, 1997).

Par exemple, *Bonamia ostreae* et *Marteilia sp* sont deux parasites protozoaires découverts dans les années 70 en France et responsable d'une diminution très importante de la production d'huître plate.

Les principaux agents affectant l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sont les suivant :

- *Mikrocytos mackini* : cette maladie n'est pas présente en France.
- *Haplosporidies* : des *Haplosporidies* particulièrement virulentes sont décrites dans des pays tiers. Elles sont aussi décrites en France mais sans lien avec des mortalités.
- *Perkinsus marinus* : cet agent n'a jamais été décrit en France.

On peut trouver des agents qui suivant les cas sont considérés comme des symbiontes ou

comme des agents opportunistes :

- Parmi les métazoaires, *Mytilicola intestinalis* et *Polydora sp.*
- Parmi les bactéries, les *Chlamydiés* et les *Vibrio*. Mais *Crassostrea virginica*, en nurserie, pourrait être affectée par une bactérie du genre *Vibrio spp* (Mijin Lee et al, 1996).

Deux virus ont été décrits sur les huîtres : *Iridovirus* et virus de type Herpès.

L'huître japonaise, *C. gigas*, a été importée à la fin des années 60. Cette espèce a alors remplacé rapidement l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*. En effet, le constat de l'absence de sensibilité de l'huître japonaise aux Iridoviroses, qui décimaient alors toutes les populations de *Crassostrea angulata*, a conduit à la substitution de cette espèce, au moyen de l'importation de géniteurs de *C. gigas* de Colombie Britannique et de naissains du Japon ( R-M Le Deuff, 1995).

Ces virus sont considérés comme des agents potentiellement dangereux pour les cheptels d'huître (R-M Le Deuff, 1995). Le virus de type Herpès d'abord diagnostiqué en écloserie sur les larves (1991) serait aussi impliqué dans les mortalités de naissain d'écloserie ou du milieu naturel en France. Les pathologies affectant les productions d'écloserie sont essentiellement virales ou bactériennes (R-M Le Deuff, 1995).

Le virus de type Herpès, quant à lui, représente toujours un danger pour *C. gigas*. En effet, des examens en histologie et en microscopie électronique à transmission des échantillons de larves malades ont permis de déceler la présence de lésions associées à ces particules virales. Leur taille, leur morphologie et leur localisation ont laissé penser qu'elles seraient apparentées à la famille des *Herpesviridae* ( Nicolas et al., 1992). Il est donc important de bien l'étudier afin, éventuellement, de contrer son action pathogène qui pourrait affecter le naissain en poche. En effet, les virus observés chez les larves et le naissain semblent très proches (T. Renault et al., 1994).

#### I-4-1) Généralité sur *Herpesviridae*

Des infections impliquant des virus de type Herpès ont été décrites chez plusieurs espèces de mollusques bivalves d'intérêt économique dans différentes régions du globe. Ainsi, le premier cas d'infection à virus de type Herpès chez les bivalves marins a été rapporté en 1972 aux Etats-Unis chez des adultes d'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972). Des mortalités massives, associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* ont été décrites depuis 1991 en France sur des larves et des juvéniles d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* (Nicolas et al., 1992 ; Renault et al., 1994) et d'huîtres plates, *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec, 1993 ; Renault et al., 1994). Un virus similaire a également été décrit en Nouvelle-Zélande chez des larves des espèces *C. gigas* et *Tiostrea chilensis* ( Hine et al., 1992 et 1998) . De plus, des particules virales de type Herpès ont été observées dans des hémocytes d'huîtres adultes de l'espèce *O. angasi* en Australie (Hine et Thorne, 1997). En 1997 et en 1998, des analyses de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* et de larves de palourdes européennes, *R. decussatus* présentant de fortes mortalités et provenant d'une écloserie privée française ont permis de mettre en évidence un virus de type Herpès ( Renault, 1994)

Ainsi, selon des critères morphologiques, quelques virus des mollusques bivalves marins ont été apparentés aux *Herpesviridae* (Nicolas et al., 1992). Chez les bivalves marins, les

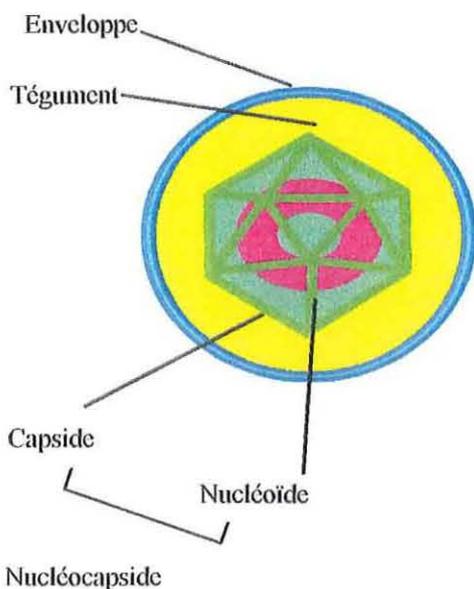
### I-4-1-1) Structure

La présence d'un seul type d'acide nucléique (ADN bicaténaire) caractérise ces virus qui sont alors parasites obligatoires des cellules eucaryotes. Ceux de la famille *Herpesviridae* présentent une structure complexe qui peut se diviser en quatre éléments. (Fig. 3).

C'est par cette structure spécifique, observable en microscopie électronique, que ces virus sont classés dans la famille *Herpesviridae*.

Figure 3

#### Structure d'une particule virale de type herpès (d'après Renault *et al.*, 1997)



- ▲ **Le nucléoïde** : structure opaque aux électrons, constitué d'ADN viral bicaténaire et de protéines.
- ▲ **La capsid** : formée de protéines, elle contient le nucléoïde.
- ▲ **Le tégument** : structure fibreuse localisée entre la capsid et l'enveloppe.
- ▲ **L'enveloppe** : structure la plus externe du virion, elle est indispensable à l'infectiosité des particules virales

### I-4-1-2) Cycle des virus de type Herpès

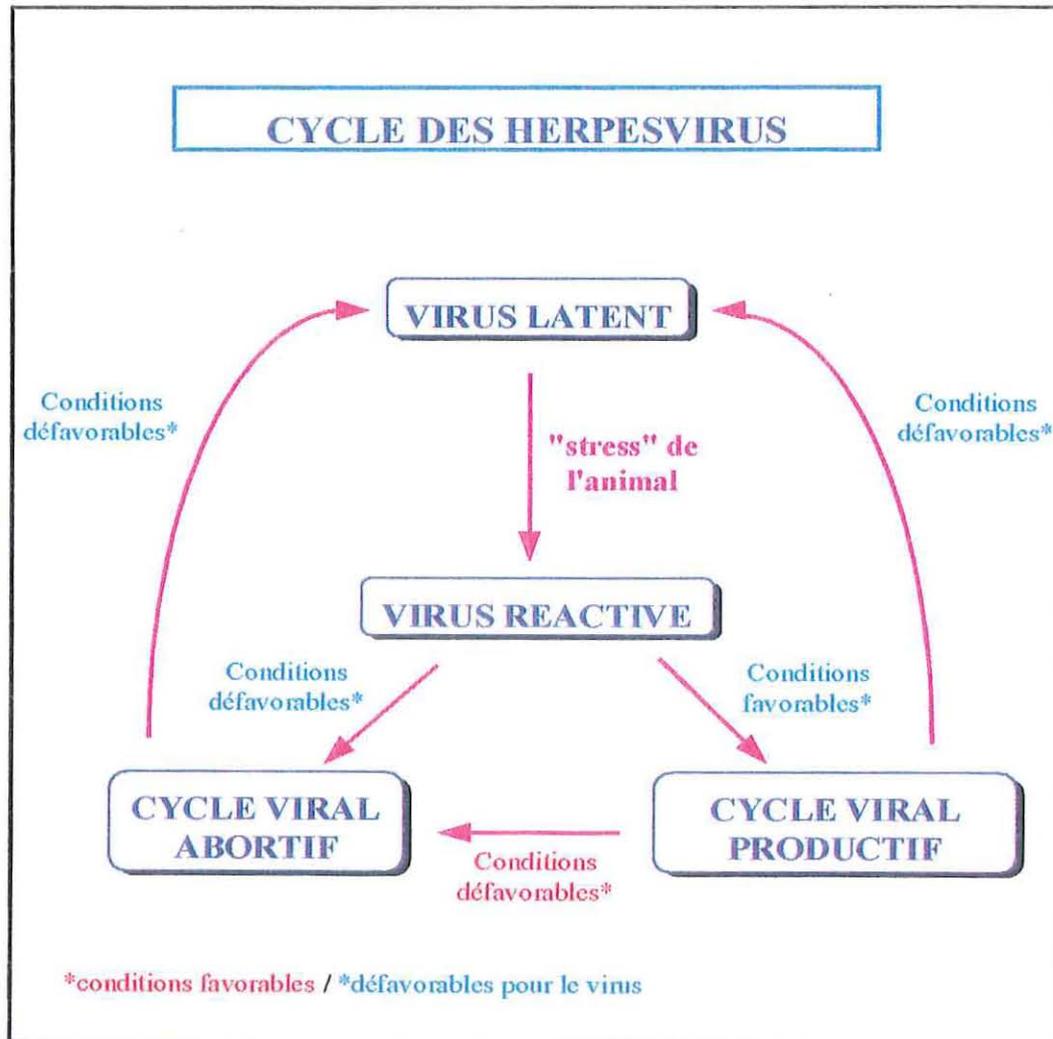
Les particules virales peuvent exister sous différentes formes chez l'hôte :

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

Par contre, elles peuvent exister sous une forme de multiplication peu ou pas productive chez les individus asymptomatiques.

Le cycle viral productif correspond à la phase de multiplication active, c'est-à-dire, à la production de particules filles intègres correspondant à des particules enveloppées et infectieuses. Le cycle viral productif conduit donc à la mort cellulaire. Le nucléole augmente

de taille et se déplace contre la membrane nucléaire, parallèlement, la chromatine se marginalise. Le noyau change alors de forme et présente des excroissances. Puis, les altérations touchent la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, avant la mort de la cellule (Le Deuff, 1995). Ainsi, le cycle viral des virus de type Herpès peut être présenté de la manière suivante : (d'après Renault et al, 1997)



#### 1-4-2) Herpesvirus sur *Crassostrea gigas*

##### 1-4-2-1) Données générales

Des mortalités massives sur des larves d'huîtres creuse *C. gigas* élevées en éclosérie ont été associées aux *Herpesviridae* (Nicolas et al., 1992), le même phénomène a été décrit en Australie (Hine et al., 1992). De plus, sur le naissain, des virus apparentés aux virus de type

Herpès ont été observés, en microscopie électronique, en association avec des mortalités importantes sur des lots particuliers de *C. gigas* (Renault et al., 1994a).

Il a été possible pour la première fois, de purifier des particules virales chez un mollusque bivalve (Le Deuff, 1995), ce qui a permis la mise au point de nouvelles méthodes de diagnostic et d'étudier d'autres caractéristiques du virus. Ainsi la reproduction expérimentale chez les larves a été obtenue.

La résistance du virus dans le milieu extérieur ainsi que les conditions de transmission sur le naissain sont encore inconnues.

#### I-4-2-2) Anatomopathologie

Les lésions histologiques, chez *Ostrea edulis*, observées sur coupe histologique de matériel infecté sont surtout localisées au niveau des tissus conjonctifs de différents organes et essentiellement nucléaires. Elles consistent principalement en la présence de larges noyaux dont la chromatine est condensée en périphérie. La présence d'autres noyaux atypiques, très condensés, est également fréquente.

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, les réactions inflammatoires autour des cellules infectées restent cependant réduites.

Enfin, il est possible d'observer des images de nécroses dans le cas d'infection avancée (Le Deuff, 1999).

Hors, l'observation histologique seule n'est pas spécifique du fait de l'absence de signes pathognomoniques, et c'est après examen en microscopie électronique à transmission que la présence virale est confirmée ou non. De plus c'est dans les cellules au noyau hypertrophié que les particules sont le plus souvent observées.

#### I-4-2-3) Diagnostic par la réaction de PCR

Le diagnostic par histologie est peu sensible et peu spécifique, de plus la microscopie électronique est une technique de lourde réalisation, qui pose le problème de l'analyse d'un grand nombre d'échantillon. Devant ces difficultés une nouvelle a été mise au point : la Polymerase Chain Réaction (PCR).

Cette technique mise au point en 1985 par Saiki (Saiki et al. 1988) est une réaction enzymatique de polymérisation de l'ADN. L'une des propriétés des ADN polymérases est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce (Kaplan et al. 1989). Ainsi pour amplifier une séquence désirée, il suffit de choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques, capables de s'hybrider à ses bornes et de réaliser les réplifications.

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 (Annexe 3).

La séquence cible d'amplification est la région de l'ADN qui sera spécifiquement amplifiée au cours de la PCR. La taille de la séquence cible varie d'une centaine à quelques centaines de bases. Une PCR comporte en général 30 cycles d'amplification, un cycle étant défini comme la période au cours de laquelle la quantité d'ADN cible est multipliée par deux.

L'intérêt de cette technique réside dans sa rapidité et sa simplicité, elle permet également de traiter un grand nombre d'échantillons.

De plus le seuil de détection d'ADN viral est très faible et aucune autre technique n'est actuellement aussi sensible, elle est de plus spécifique au virus par les amorces qui reconnaissent une partie de son génome.

Un témoin négatif contenant de l'eau à la place du surnageant, est présent pour chaque lot et sert de contrôle de contamination. De plus, 1 témoin positif de dilution 2500 copies est déposé par rangée de puit et par PCR, il permet de vérifier si l'amplification a lieu. Ainsi pour qu'un lot soit considéré positif lorsqu'il présente de l'ADN viral après migration, tous les témoins négatifs doivent être négatifs, et tous les positifs positifs.

L'analyse par pool est un avantage car elle permet de traiter davantage d'individus, mais, elle pose la difficulté d'estimer la prévalence (c'est le nombre total de cas ou de foyer d'une maladie, dans une population déterminée, au cours d'une période donnée ou un instant donné). En effet, on ne peut estimer la prévalence en nombre d'individus contaminés directement et d'autre part, il y a dilution des particules virales au sein des 5 individus, enfin, il est pris une part relative variable de ce pool d'individus au moment de la préparation des échantillons (voir matériels et méthodes ci-après).

#### I-4-2-4) Exemples sur d'autres espèces

De nombreux cas d'infections à virus de type Herpès ont été rapportés chez les vertébrés vivant en milieu aquatique. L'essor des élevages aquacoles favorise essentiellement le développement de ces maladies virales. Ainsi, les principales infections à virus de type Herpès touchent surtout les reptiles comme la tortue verte marine, *Chelonia mydas*, les amphibiens comme la grenouille léopard, *Rana pipiens*, et surtout les poissons comme la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, ou le poisson-chat d'élevage, *Ictalurus punctatus*.

Cependant, des cas d'infections à virus de type Herpès ont également été décrits chez des mammifères marins. Ainsi, deux virus ont pu être identifiés comme appartenant à la famille des *Herpesviridae* chez des phoques veau-marin, *Phoca vitulina*, lors d'une épidémie dans un centre aux Pays-Bas (Borst et al., 1986).

Il faut signaler également que le virus de type Herpès peut être détecté chez les mammifères et aussi chez les hommes.

#### I-4-2-5) Aspects épidémiologiques du virus de type Herpès

Afin de faire une étude fiable et correcte, il est indispensable d'entreprendre une étude épidémiologique sur le sujet. Plusieurs questions doivent être posées :

↳ Comment mener une étude descriptive des mortalités estivales et du virus de type Herpès ? :

##### ❶ Définir la population cible

↳ Où trouve-t-on le virus de type Herpès en France ?

⇒ Les premières détections ont été faites en histologie et en

microscopie électronique. Au cours de l'été 91, le virus a été détecté sur des larves d'écloserie. En 1992 et 1993, il a été détecté sur du naissain d'écloserie. En 1993 et 1994, du naissain issu du milieu naturel de Charente et de Méditerranée a été trouvé infecté par microscopie électronique. En 1994, du naissain d'Arcachon a donné un résultat positif en microscopie électronique mais une seule particule virale avait été trouvée sur l'échantillon. Une expérience de T. Renault sur des géniteurs de Brest, d'Arcachon et de Marennes a montré que leurs larves étaient contaminées en virus de type Herpès, ce qui fut confirmé par microscopie électronique. La détection par PCR a montré que dans toutes les régions où des échantillons de naissain ont été prélevés l'ADN viral était présent : la détection sur Arcachon date de 1998 (absence d'échantillons prélevés en 1997 et 1996), en Bretagne, en Charente et sur l'étang de Thau depuis 1996.

☞ Quand le trouve-t-on ?

⇒ En 1998, la détection a été possible de mai à août mais il faut tenir compte du fait qu'il y a très peu d'échantillons prélevés au cours des autres mois. La température semble jouer un rôle, au moins sur les larves mais peut-être aussi sur le naissain, dans le passage à la phase de multiplication active (Le Deuff et al., 1996).

☞ Qui est touché ?

⇒ Les larves de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, de l'huître plate *Ostrea edulis*, de la palourde *Ruditapes decussatus* en écloserie (T. Renault, com. pers., 1998) se trouvent infectées. Le naissain d'huîtres creuses en écloserie et dans le milieu naturel est aussi victime du virus.

☞ Comment cela se passe-t-il et quels sont les moyens de diagnostics ?

⇒ Les mortalités sur des larves sont d'emblée générales et massives, de plus la détection est extrêmement précoce au cours de la vie larvaire. Sur le naissain, les mortalités observées ne s'étendent pas aux lots voisins. La transmission verticale contenu de ces données est fortement suspectée. La détection du virus par PCR serait optimale au début des mortalités. De surcroît, la détection par PCR ne détecte que de l'ADN viral sans que l'on puisse savoir si le virus est en phase active et en quelle quantité.

② Définir les estimateurs.

☞ Estimer la prévalence : Le taux de prévalence est la prévalence rapporté à l'effectif de la population exposée à la maladie (Toma B. et al, 1991).

En France, il est pratiquement impossible de mener une enquête de ce genre. D'une part, l'état

du stock du naissain (population exposée) n'est pas connu précisément ni en tonnage ni dans sa répartition géographique, d'autre part, au sein d'une même région ou entre régions, les pratiques zootechniques sont très différentes, enfin, il faut se poser la question à quelle échelle il est intéressant d'obtenir le taux de prévalence : sur la France, sur une région, sur un bassin, sur une zone, sur une concession, sur une poche ou sur des animaux.

Ainsi, une zone représentative a été choisie afin de mener l'enquête sur une portion restreinte du territoire français (plus facile à étudier). Le taux de prévalence (nombre d'individus / Nombre d'individus à risque) à un temps donné est donc beaucoup plus facilement calculable et la mortalité plus facile à estimer. Une répartition et une description de l'infection sont alors obtenues. Ainsi, on peut étudier simultanément à l'échelle d'une zone, des concessions, des poches et des pools de 5 animaux.

### **I.5.) Origine de mortalité sur Fouras**

En 1994 et en 1995, des mortalités anormales sur le naissain en poche durant la période estivale ont été observées par les ostréiculteurs de la Pointe de la Fumée à Fouras. Ce site représentatif du captage de la région et géographiquement bien situé pour des raisons d'accessibilité a donc été choisi pour l'étude du suivi de la mortalité du naissain d'huître creuse. Ainsi, en 1995, des techniques histologiques ont permis de suspecter le virus de type Herpès sur du naissain sauvage de ce site.

Mais, il a fallu définir le problème des estimateurs car il existe des biais dont il faut tenir compte :

⇒ Biais de mesure : - Fiabilité de la PCR ?

- Les faux positifs : la contamination est toujours possible mais peut être détectée par des témoins négatifs qui sont systématiquement ajoutés pour la réaction de PCR. La spécificité de la PCR est considérée comme excellente.
- Les faux négatifs : il peut y avoir 3 types de difficultés :
  - Le manque de sensibilité que l'on ne considérera pas dans cette étude mais qui dépend de la qualité des amorces utilisées.
  - L'inhibition de réaction : il n'y a pas d'extraction d'ADN proprement dite (cf. Matériels et Méthodes). Un témoin interne de la réaction de PCR peut permettre de détecter ce type de problème
  - La dégradation de l'ADN : la recherche d'ADN dans l'échantillon avec d'autres amorces peut éventuellement détecter ce type de difficulté.

- Mesure des mortalités ? Le grand nombre d'individus et leur petite taille entraînent des imprécisions importantes, d'autre part, l'estimateur est à contrôler.

⇒ Biais d'échantillonnage : Choix du site de Fouras, des professionnels, du mode de zootechnie, aussi le pas de temps choisi va entraîner des difficultés pour extrapoler ces résultats au niveau national.

## **I.6.) Données des pré-études**

Des études préliminaires ont donc été nécessaires pour entreprendre une étude définitive fiable et valide afin de comprendre et de déterminer les principales causes de mortalités sévissant sur les populations de naissains d'huître.

### **I.6.1) Pré-étude 1997**

L'objectif de la pré-étude 97 était de déterminer l'impact et de caractériser les mortalités estivales sur le naissain en poche à Fouras.

L'échantillonnage a été effectué selon une grappe à 3 degrés. Trente ostréiculteurs possédant des concessions sur la Pointe de la Fumée à Fouras et du naissain en poche au cours de l'été ont été tirés au sort et soumis à un questionnaire.

Toutes les concessions appartenant à ces professionnels ont été retenues. Les concessions sont suivies bimensuellement et 3 poches sont tirées au hasard, le tirage au sort se renouvelant à chaque période, à partir des tables de nombre de hasard.

Une mesure de mortalité est effectuée sur deux prélèvements réalisés par poche.

Les résultats obtenus ont montré que 3 poches par concession suffisaient pour voir apparaître des différences entre concessions à chaque période. Il n'y a pas de différence significative entre deux prélèvements d'une même poche.

Un suivi en parallèle de poches marquées a pu valider l'hypothèse qu'il n'y avait pas d'influence de la pesée et mesure de mortalité sur la mortalité de la période suivante.

Les mortalités augmentent au cours du temps, de mai à août, pour atteindre une moyenne de 15 % au mois d'août (A. Thébault, com. Pers.).

### **I.6.2) Etude 1998**

L'objectif de l'étude 98 était de valider l'échantillonnage et les mesures réalisées en 1997 sur le site de la Pointe de la Fumée à Fouras et de déterminer les relations entre mortalité, statut infectieux et maturation gamétique.

En 97, la mortalité mesurée qui semblait être une mortalité cumulée augmentait régulièrement de mai à août pour atteindre une moyenne de 15 %. Les résultats de 98 montrent que la mortalité dite «cumulée» croît lentement de fin mai à fin juin puis rapidement entre fin juin et début juillet pour se stabiliser et décroître en août, avec une mortalité cumulée atteignant 37 %, ce qui ne correspond pas aux résultats obtenus en 97. Seul le critère «morte avec les 2 valves encore attachées» avait été pris en compte, ce qui a pu entraîner un biais de mesure dans l'estimation de la mortalité cumulée, en effet, il paraît logique que les 2 valves finissent par se séparer, ce qui a pu entraîner une sous-estimation des mortalités. D'autres types d'estimateurs permettront peut-être de corriger ce biais en 99.

Il a été établi que l'effet concession existait sur les mortalités et confirmait les résultats de 97. La concession est une unité qui permet, contrairement à la poche, une interprétation et une action possible.

Aussi, une détection d'ADN viral est apparue au moment de l'augmentation maximale de mortalité.

Aussi, la mesure de prévalence pose problème : On analyse les animaux par pool de 5 individus. On ne sait donc pas s'il y a dilution, on ne prend qu'une partie de l'échantillon.

Ceci pourra être ajusté en connaissant précisément la fraction relative qui est prise pour faire la réaction de PCR. D'autre part, le fait d'utiliser des pools ne permet pas de connaître la prévalence en nombre d'animaux. Il a été décidé pour 99 de choisir la période la plus infestée par le virus de type Herpès, et d'analyser 240 individus en individuels pour répondre à cette question de façon plus précise.

Enfin, les relations entre mortalité, statut infectieux et maturation gamétique n'ont pu être validées lors de cette étude et nécessitent des recherches plus poussées en histologie et en PCR. Cependant, la taille des animaux n'a pas été prise en compte, or, il semble qu'il y ait un lien entre la taille et la maturation gamétique.

### **I.6.3) Objectifs de l'étude 1999**

- Correction des biais survenus durant l'étude 98 :
  - Optimisation de l'indicateur de mortalité
- Confirmation de la cinétique du virus et estimation du taux de prévalence au cours du temps sur l'été 1999.
  - Rôle des facteurs physiologiques par analyses biochimiques (réserves et reproduction).
  - Création d'une base de données par des systèmes d'information géographique (SIG), ces systèmes sont des outils et des modes opératoires permettant l'acquisition de données pertinentes, ainsi que leur traitement et leur restitution sous des formes précises. La principale caractéristique des SIG est la manipulation des informations liées à la représentation du territoire ( M-I Lodato, 1997). Ainsi, un cadastre numérisé des parcelles du Domaine Public Maritime a été créé puis exploité à des fins de cultures marines (Andrieu, 1995). Il existe actuellement des SIG qui ont des informations sur l'environnement (bathymétrie, hydrologie, température), ainsi que des données du cadastre sur Marennes-Oléron. La superposition de ces données avec des données de pathologie et ceci représenté par cartographie peut permettre de mettre en évidence l'influence de différents facteurs sur les mortalités. On peut même avoir ainsi des données sur plusieurs périodes de temps, ce qui peut permettre de regarder l'évolution spatiale et temporelle des pathologies rencontrées. Des SIG sont ainsi de plus en plus utilisés en épidémiologie animale et humaine.

## **II) MATERIELS ET METHODES**

### **II.1.La population statistique**

La population cible de notre étude, est le naissain en poche de la région de Fouras, en période estivale.

La population source est le naissain en poche d'une partie de la région de Fouras en période estivale, sur des concessions accessibles à pied, appartenant à des personnes habitant Fouras.

## II.2. Plan d'échantillonnage

Le type de sondage effectué, est en grappe à 3 degrés.

- ➔ Les concessionnaires sont tirés au sort et du même coup les concessions (grappe). La démarche est la même que pour l'étude de 1998, avec 5 concessions supprimées et 1 ajoutée soit 8 concessions. Les concessions sont représentées sur la carte en annexe 4.
- ➔ Trois poches sont tirées au sort puis marquées et suivies au cours du temps.
- ➔ Au sein de chaque poche, à chaque période, un tirage au sort d'un échantillon d'huîtres de la poche, sans remise est réalisé.

La poche, est vidée dans un conteneur, l'ensemble est homogénéisé et un volume d'au moins 100 individus est prélevé à l'aide d'un récipient, pour prélever le plus au hasard possible. La poche est ensuite refermée et attachée sur la table, sa masse évolue au cours du temps et des prélèvements.

L'unité statistique choisie pour l'étude est d'un individu pour l'histologie, la biochimie et les mesures de mortalité, elle est de cinq individus pour les réactions de PCR.

Si une poche vient à disparaître, si son contenu est épuisé, elle est remplacée par une nouvelle, tirée au hasard dans la concession.

Le calendrier des prélèvements dépend essentiellement des marées. Ainsi ont été choisis les jours de marée de vives eaux aux coefficients les plus importants pour chaque maline pour échantillonner, les prélèvements sont bimensuels de fin mai à fin août.

## II.3. Mesure de mortalité

Au laboratoire, tous les animaux prélevés bimensuellement sont pris en compte, les échantillons sont pesés, lavés et les individus comptés.

Il y a 3 critères pour estimer les mortalités:

- ouverte avec les deux valves encore attachées à la charnière
- ouverte avec les deux valves encore attachées à la charnière + les valves supérieures + les valves inférieures
- ouverte avec les deux valves encore attachées à la charnière + les valves inférieures.

## II.4. Mesure de la gamétogénèse

### II.4.1. Techniques histologiques

Le but est d'immobiliser les structures en conservant une morphologie la plus proche possible de celle à l'état *in vivo*, et empêche 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, le fixateur utilisé en routine est le Davidson (composition en annexe 5), qui est une solution salée de formol.

De par sa composition à base d'eau de mer, le Davidson permet une bonne fixation des animaux marins.

Pour notre étude, c'est la coloration topographique à l'hémalum éosine qui a été choisie (réalisation des coupes et coloration en annexes 6 et 7).

L'hémalum permet de colorer les structures nucléaires ou basophiles en bleu à violet foncé, les cytoplasmes prennent une teinte grise. La coloration des autres structures en rose est réalisée par une coloration acide, l'éosine. La mise en œuvre de cette coloration est simple et reproductible. Elle permet d'observer les structures tissulaires au microscope photonique.

## II.4.2 Détermination des stades de maturation gonadique par histologie

Les critères de détermination retenus sont, le sexe (mâle, femelle ou hermaphrodite) et le degré d'évolution dans la gamétogénèse.

Sexe et stade de maturation	Définition
Indéterminé (IND 1+)	Uniquement gonies dans les gonades, mais impossible de détecter le sexe à venir.
Femelle 2+ (Fem 2+)	Ovogonies, cellules prévittelogènes (PV).
Fem 3+	Ovogonies, PV, cellules vittelogènes (V).
Fem 4+	Majorité de V
Fem 5+	Après évacuation des gamètes.
Mâle 2+	Spermatogonies, spermatocytes.
Mâle 3+	Sgonies, Scytes, Spermatides.
Mâle 4+	Majorité de Spermatides très avancés.
Mâle 5+	Après évacuation des gamètes.
Hermaphrodite	Gamètes mâles et femelles présents dans les même gonades.

Bien que subjectifs, les stades ont été établis selon un ouvrage de Pierre Lubet (1959), car des études sur la maturation de *C. gigas* sont en cours, mais aucune n'est actuellement définie.

Les critères choisis volontairement simples, ont été validés par une pré-étude sur 30 lames observées.

## II.4.3. Echantillonnage

A chaque période, un lot de 30 individus est requis pour chaque concession.

## II.5. La Polymerase Chain Réaction (PCR)

Les PCR sont réalisées avec les amorces OHV3 et OHV4 qui amplifient un fragment

de 896 paires de bases.

Un cycle d'amplification se présente en 3 étapes : dénaturation, hybridation et élongation. Ces étapes se réalisent à des températures particulières(annexe 8).

Le protocole (annexe 9) ne comprend aucune extraction d'ADN, les échantillons sont conservés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les huîtres sont broyées par pool de 5, et subissent après dilution, un bain-marie bouillonnant de 10 min. pour éliminer les DNAses. Enfin les surnageants sont obtenus après centrifugation 5 min. à 10 000 rpm.

Les échantillons sont déposés pour migration sur électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% avec du Bromure d'étidium (BET). Puis la lecture s'effectue sur table à ultraviolets (annexe 10)

Les échantillons sont groupés en 6 pools de 5 individus, par lots de 30. Un lot par poche et trois poches par concession sont analysés.

## II.7. Mesure du taux de glycogène

Le taux de glycogène est mesuré grâce à une méthode biochimique (Méthode de Dubois et al, 1956) (annexe 11).

Un lot de 30 individus de 2 poches de 2 concessions choisies a été prélevé durant 2 périodes en vue d'une analyse biochimique, soit en tout, 240 animaux.

Le naissain a été lyophilisé et broyé. 10 mg de chair a été prélevé et mis en solution dans du TCA (Acide Trichloacétique) à 15 % afin d'extraire le glycogène.

La solution est laissée à extraire 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  puis centrifuger à 2000tr/mn pendant 10mn. Ensuite, le glycogène est précipité grâce à de l'éthanol absolu. De l'eau bouillante est ensuite ajoutée.

Une gamme étalon est nécessaire et effectuée à partir de glucose concentré à 100mg/dl dans du TCA à 15 %.

Enfin, le glycogène est dosé par du phénol et de l'acide sulfurique qui permettent de déterminer, par colorimétrie, des micro-quantités d'oses et leurs dérivés.

Puis la quantité de glucide est lu à 490 nm grâce à un spectrophotomètre.

Enfin, les densités optiques sont à comparer à la courbe d'étalonnage du glucose à des concentrations comprises entre 0 et 200  $\mu\text{g/ml}$ . Les sucres présents sont alors mis en équivalence avec le glucose.

## II.8. Traitement statistique des données

Deux types de variables rentrent en compte dans notre étude, elles sont soit discrètes, soit continues. Les premières sont :

- ☆ La mortalité (nombre de vivantes et de mortes par échantillon).
- ☆ La concession.
- ☆ La poche.
- ☆ Le nombre de pool positif en PCR.
- ☆ Le stade de maturation gamétique
- ☆ Le temps (divisé en 6 périodes).
- ☆ Le taux de glycogène.

Les variables continues sont :

- ☆ La fréquence des mortalités par lot.

Les données ont été représentées, afin de vérifier l'allure des distributions et l'équilibre des effectifs pour l'étude de chaque facteur retenu.

Puis, les comparaisons ont été effectuées graphiquement entre groupes (Excel 97).

L'estimation des mortalités a été réalisée à partir de l'intervalle de confiance d'une fréquence. Des méthodes univariées ont été utilisées (test du  $\chi^2$ ), ainsi que des méthodes multivariées d'analyse de la variance (logiciel SAS version 6,12).

Les hypothèses d'analyse de la variance sont :

- ☆ Indépendance des mesures
- ☆ Homogénéité et normalité des variances

Pour cela, les fréquences de mortalités sont transformées en  $\text{Arcsin} \sqrt{f}$

Pour chaque test, un résultat était considéré comme significatif, quand  $P < 0,05$ .

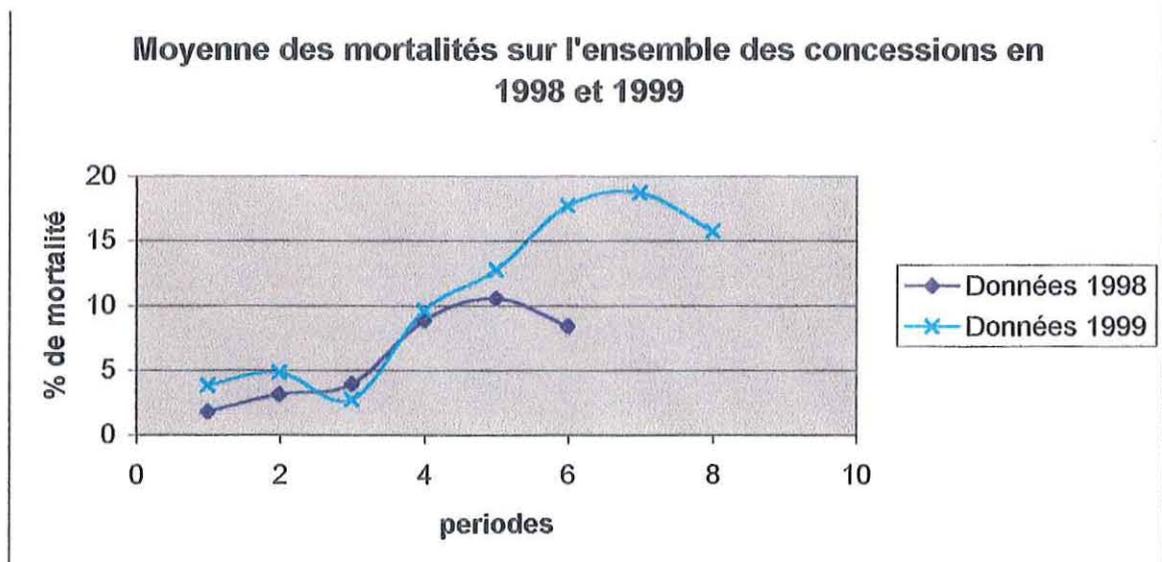
### III) RESULTATS

L'évolution des mortalités a été suivie sur 8 périodes, de fin mai à fin août, tandis que les analyses PCR et biochimiques ainsi que la maturation gamétique ont été suivies sur 2 périodes, soit début juin et début juillet.

#### III.1.) La mortalité

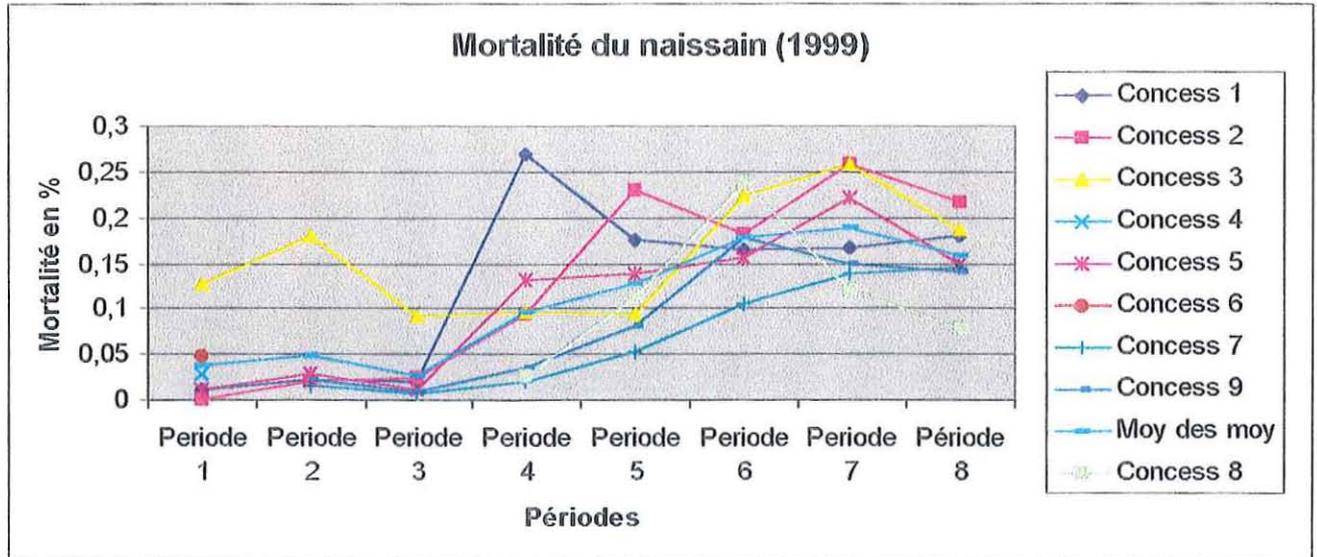
En 1998, la mortalité augmentait faiblement de fin mai à fin juin, puis subissait une plus forte progression entre fin juin et début juillet pour ensuite décroître en août. La mortalité cumulée atteignait 37 % début août.

En 1999, les taux de mortalité sont beaucoup plus élevés mais suivent à peu près le même cheminement.



### III.1.1) Mortalité en 1999 avec le critère 1

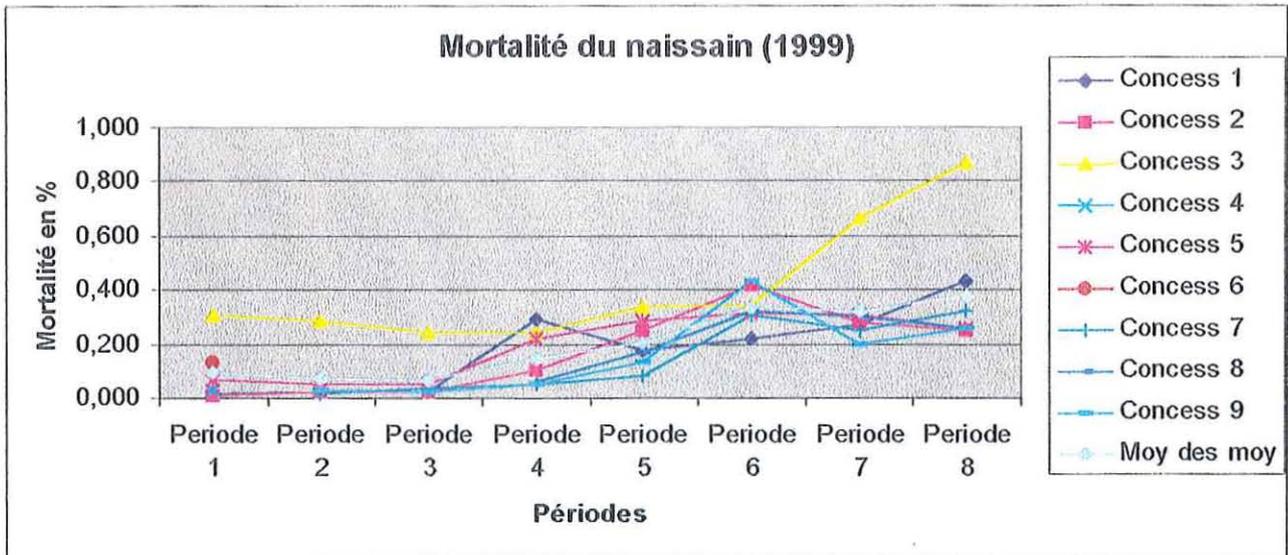
La mortalité 1 correspond au critère nombre d'huîtres mortes avec les 2 valves collées sur le nombre total (huîtres mortes + huîtres vivantes).



La mortalité a tendance à augmenter au cours du temps jusqu'à la période 7 puis elle diminue en période 8. Cependant, pour certaines concessions, elle connaît des baisses durant plusieurs autres périodes (concession 3 en période 3, concession 1 en périodes 5, concession 2 en périodes 6 et concessions 9 et 8 en période 7). En période 8, seule la concession 7 augmente. La moyenne générale de mortalité, quant à elle, connaît une hausse progressive au cours du temps jusqu'à la période 7 (18 %) puis diminue pour atteindre une moyenne de 15 % en période 8.

### III.1.2) Mortalité en 1999 avec le critère 2

La mortalité 2 correspond au critère nombre d'huîtres mortes avec les 2 valves attachées + nombre de valves inférieures + nombre de valves supérieures sur le nombre total.

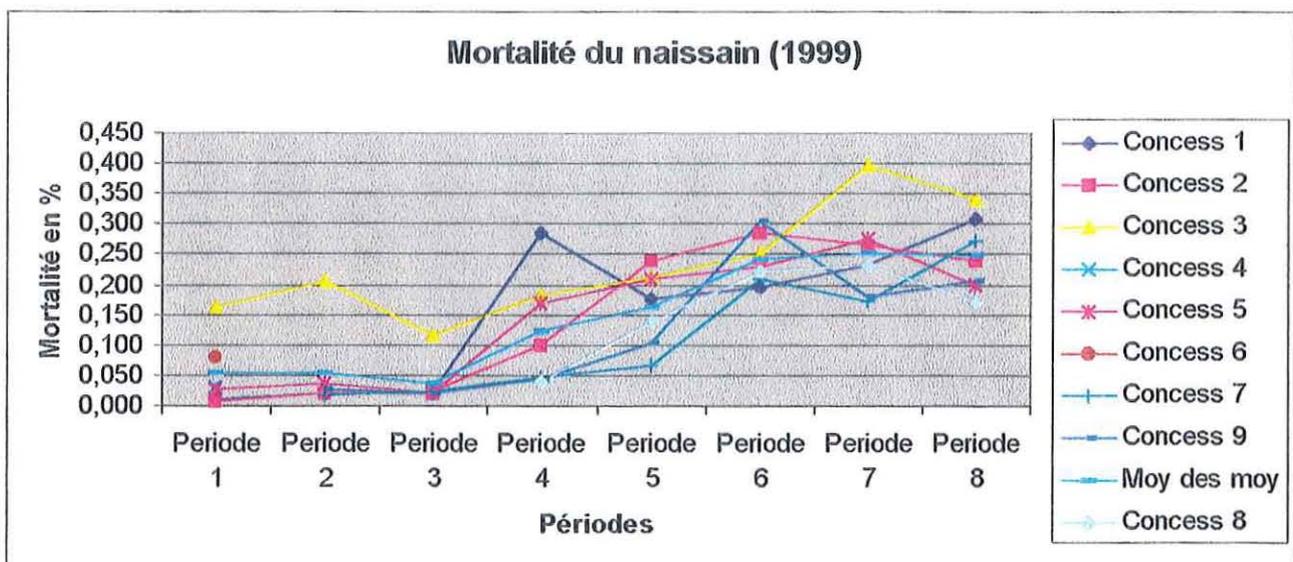


L'allure générale de la mortalité est à une hausse pour chaque concessions. Cependant, la concession 1 connaît une baisse de mortalité dès la 5<sup>ème</sup> période mais elle remonte à nouveau par la suite. Aussi, les concessions 2, 8 et 7 ont une mortalité décroissante au niveau de la 7<sup>ème</sup> période alors que celle de 3 atteint une mortalité de plus de 65 %. En période 8, toutes les concessions sauf 9 et 2 ont leur mortalité qui augmente.

Si l'on s'intéresse à la moyenne générale, on observe une mortalité croissante au cours du temps qui a tendance à se stabiliser aux périodes 6 et 7 pour atteindre 38 % en période 8.

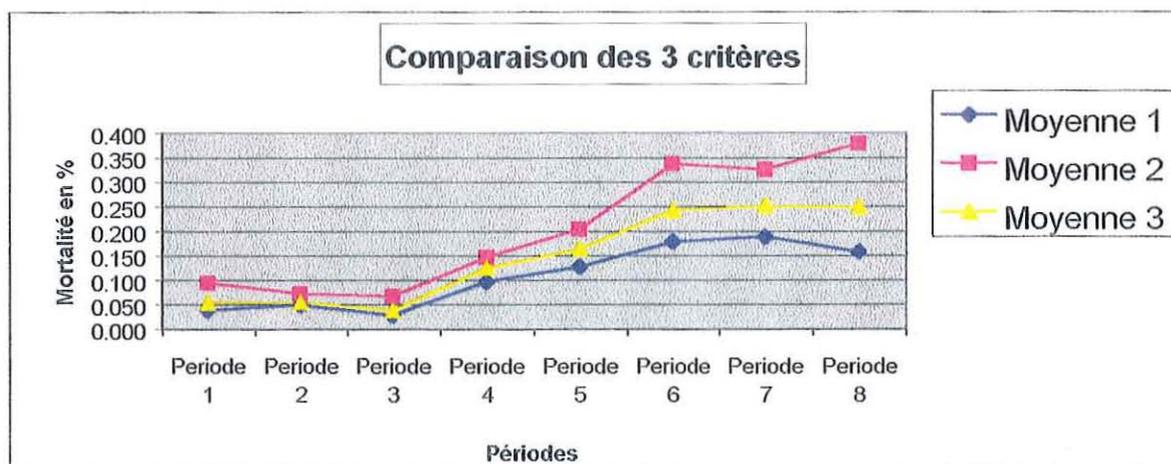
### III.1.3) Mortalité en 1999 avec le critère 3

La mortalité 3 correspond au critère nombre d'huîtres mortes avec les 2 valves attachées + nombre de valves inférieures sur le nombre total.



L'allure générale de la mortalité augmente au cours du temps. La mortalité des concessions suit la même allure que le critère mortalité 2 mais les mortalités représentent un plus faible pourcentage, en effet, la mortalité maximale de la concession 3 atteint son maximum à environ 39 % en période 7. La moyenne des mortalités, de même, augmente progressivement et a tendance à se stabiliser aux périodes 6, 7 et 8 pour atteindre 24% en période 8.

### III.1.4 Comparaison des 3 critères



La mortalité 1 augmente au cours du temps et redescend en période 8.

La mortalité 2 augmente jusqu'à la période 6 puis baisse en période 7 pour remonter en période 8.

La mortalité 3 augmente progressivement pour se stabiliser en période 6,7 et 8.

### III.2) Les analyses PCR

Seul 1 lot a été détecté positif sur 24 en début juillet alors que 3 lots avaient été détectés positifs en fin juin 98 (annexe 12), tous les lots de début juin sont négatifs. Pour un prélèvement de 30 animaux sur la concession touchée, 1 pool de 5 animaux sur 6 a été détecté positif.

PCR 98	FIN MAI	FIN JUIN
Nombre de PCR	23	35
Résultats	NEGATIFS	3 POSITIFS

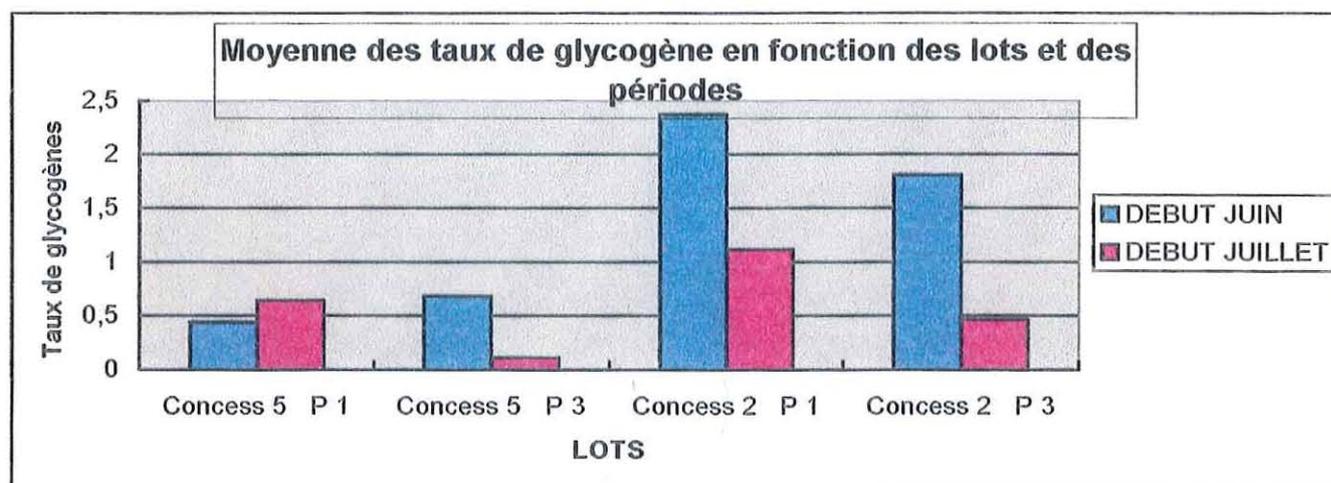
Soit, % de poches positives en 1998 → 8.5 %

PCR 99	DEBUT JUIN	DEBUT JUILLET
Nombre de PCR	24	24
Résultats	NEGATIFS	1 POSITIF

Soit, % de poches positives début juillet 99 → 4.2 %  
 % de concessions positives début juillet 1999 → 12.5 %  
 % d'animaux positifs en 1999 → de 0.14 à 0.70 %

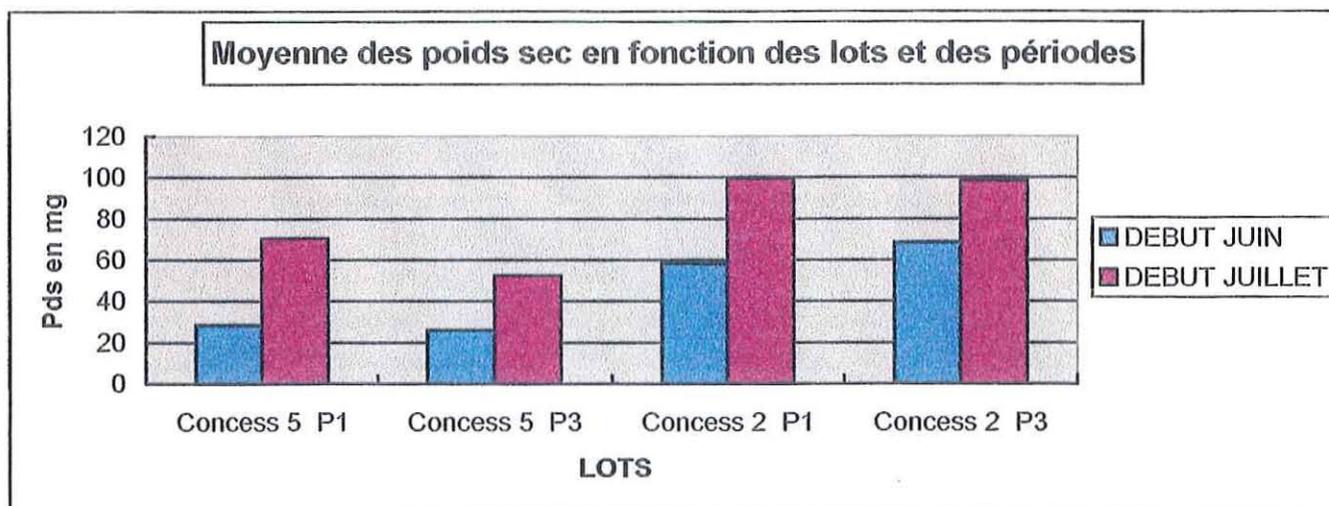
### III.3) Les analyses biochimiques

#### III.3.1. Le taux de glycogène



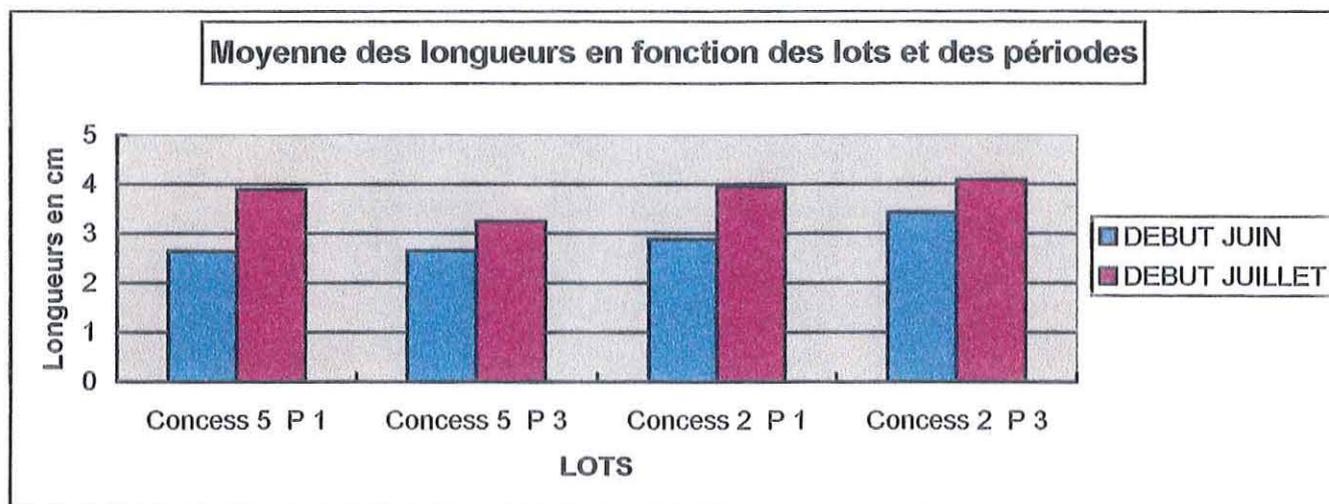
En général, le taux de glycogène chute entre les deux périodes. Seul le lot GIR P1 n'a pas de diminution du taux de glycogène, toutefois cette petite augmentation se situe à peine aux alentours de 0.5 %, elle n'est donc pas très significative.

#### III.3.2. Le poids sec



Le poids sec des huîtres augmente au cours du temps entre les 2 périodes pour tous les lots étudiés.

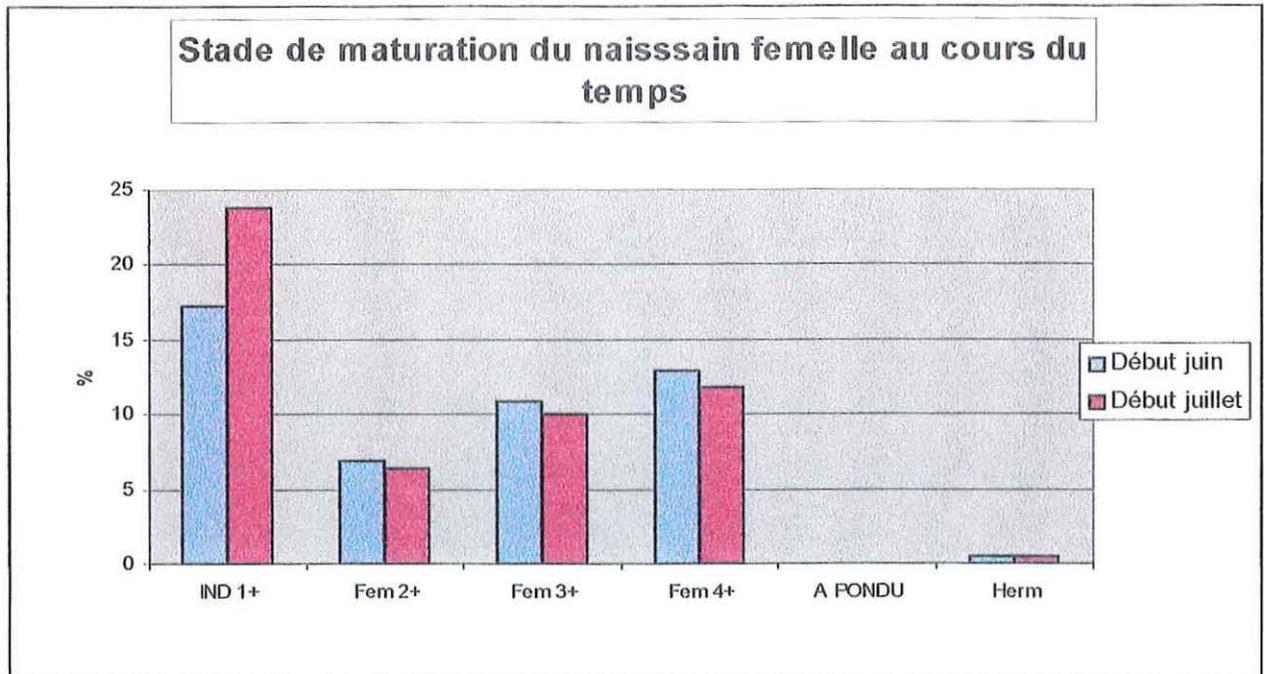
### III.3.3. La longueur



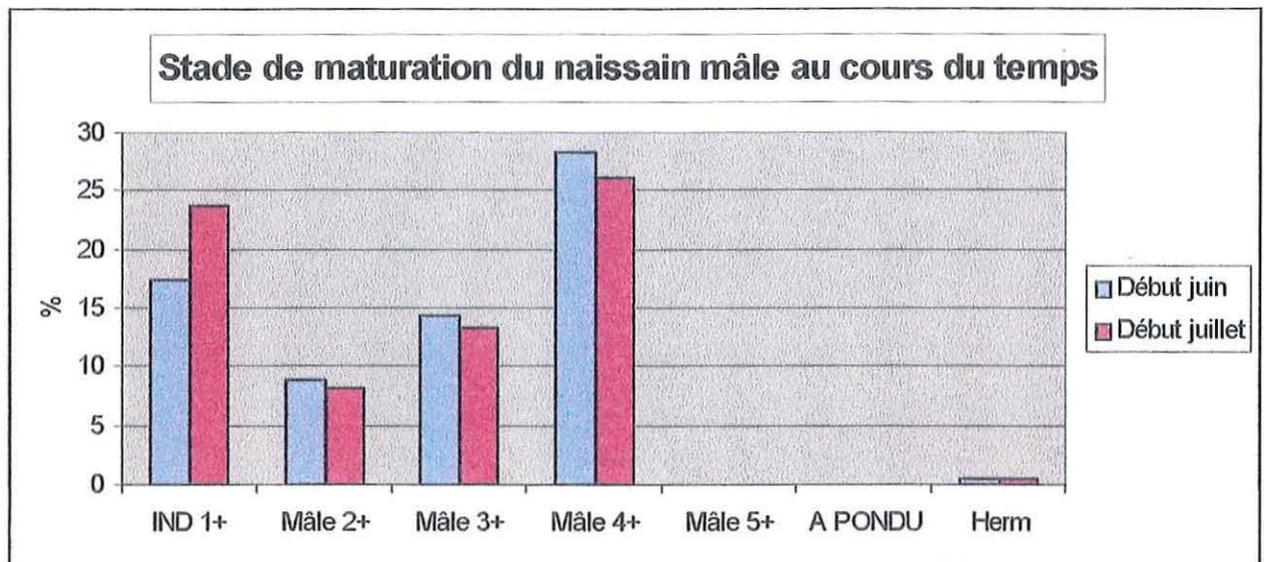
La longueur des coquilles d'huîtres augmente au cours du temps entre les 2 périodes pour tous les lots étudiés.

### III.4) La maturation gonadique

### III.4.1. Les stades de maturation en fonction des sexes



En début juillet, le nombre de femelles 2+, 3+, et 4+ a tendance à diminuer, par contre, le nombre d'indéterminés augmentent. Le nombre d'individus hermaphrodites reste constant au cours du temps. Très peu d'individus ont pondu (moins de 1%).

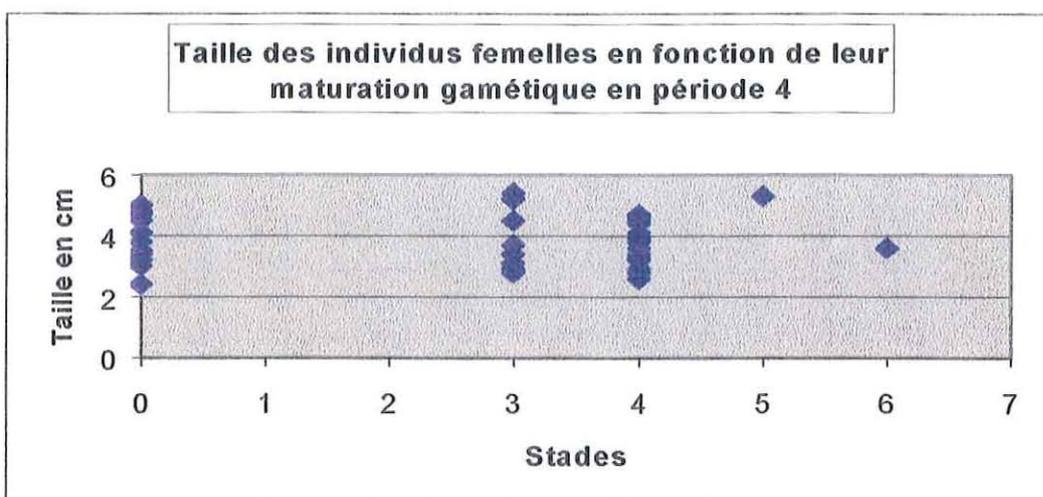
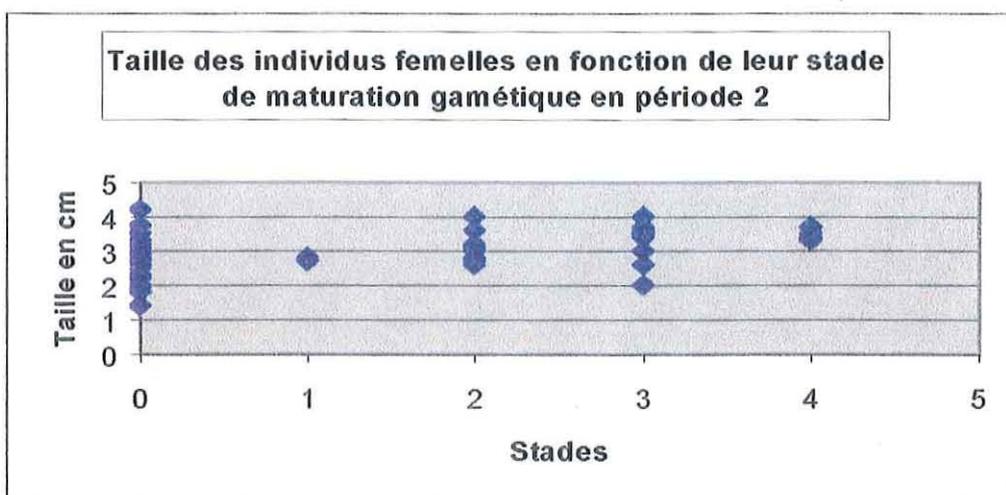


De même, le nombre de mâle diminue au mois de juillet et le nombre d'indéterminés augmentent. Le nombre d'hermaphrodite reste constant et il y a très peu de ponte (moins d'1%).

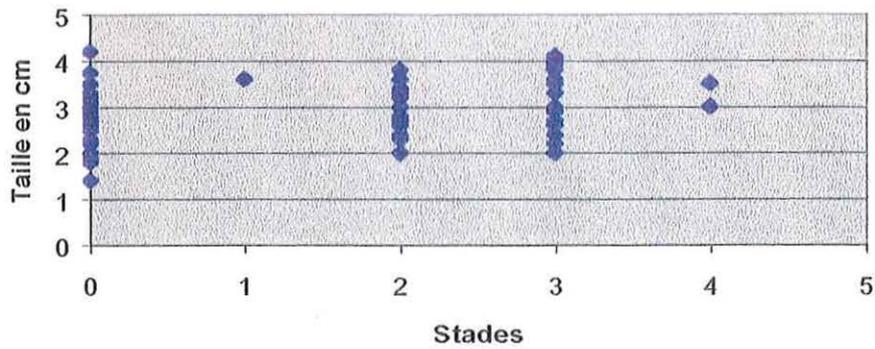
### III.4.2. Rapport entre la taille et le sexe des individus

Les critères utilisés sont :

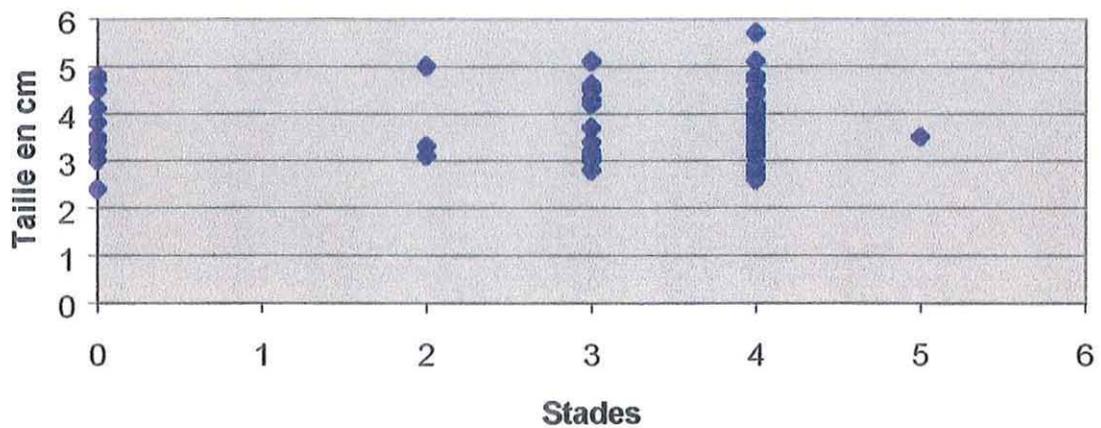
- 0 → IND 1+
- 1 → Fem ou Mâle 1+
- 2 → Fem ou Mâle 2+
- 3 → Fem ou Mâle 3+
- 4 → Fem ou Mâle 4+
- 5 → A PONDU



Taille des individus mâles en fonction de leur stade de maturation gamétique en période 2



Taille des individus mâles en fonction de leur stade de maturation gonadique en période 4



Commentaire sur les 4 graphes précédents :

Il n'y a pas de liens évidents entre les tailles des individus et la maturation gamétique.

## **IV) DISCUSSION-CONCLUSION**

### **IV.1) Plan d'échantillonnage**

Les ostréiculteurs choisis pour cette étude habitent tous à Fouras ou sa région, le naissain en poche est donc certainement beaucoup plus surveillé que celui d'autres professionnels bretons par exemple, ce qui entraîne un biais et peut avoir un impact sur une extrapolation éventuelle. D'autre part, les conditions environnementales de Fouras n'est pas tout à fait les mêmes que celles d'autres sites de captages comme Arcachon par exemple.

Aussi, une imprécision peut être augmentée par les variabilités intra et inter préleveurs car 4 personnes ont participé à l'échantillonnage.

### **IV.2 ) La mortalité**

Les moyennes de mortalité du naissain augmente régulièrement de fin mai à mi-août, il existe donc des conditions défavorables à la survie du naissain durant les périodes estivales, ce qui correspond aux résultats obtenus par toutes les études antérieures. La moyenne des mortalités, suivant les critères, varie entre 15 et 37 % de fin mai à fin août. Les mortalités semblent démarrer de fin mai à fin juillet, ce qui correspond aux résultats observés en 1998.

En moyenne, il n'y a pas de mortalité supérieure à 20 % en 15 jours, il n'y a donc pas eu de mortalités anormales sur Fouras en 99, ceci ne favorise pas l'étude en cours. Les mortalités sont supérieures par rapport à celles de 1998

Les résultats de la concession 3 sont relativement atypiques : les poches de cette concession comptait en effet énormément de débris, ce qui ne favorisait pas des estimations précises e mortalité.

Cette étude a permis de mieux comprendre l'interprétation des critères de mortalité :

le critère de mortalité 1 correspond aux huîtres mortes mais encore avec les deux valves attachées, elle semble prendre en compte la mortalité récente, en effet, la moyenne a tendance à baisser fin août, alors que les 2 autres moyennes continuent d'augmenter. On peut imaginer que les 2 valves se séparent, ce qui fait chuter la moyenne.

Les mortalités 2 et 3 se stabilisent à partir de début août, ces critères semblent être de la mortalité cumulée et traduit le fait que les mortalités réelles s'arrêtent après début août

Cependant, lors du comptage de mortalité au laboratoire, le nombre important d'huîtres peut entraîner des erreurs d'estimation, de plus, il est possible d'omettre des mortes lorsque les 2 valves sont encore collées par la vase.

Des erreurs peuvent aussi intervenir lors de la saisie informatique des données, car il n'y a pas eu de contrôle de la saisie.

Ces résultats renforcent ceux qui ont été obtenus les années précédentes, il semble intéressant de garder les critères 2 et 3 de mortalité.

### **IV.3 ) La technique de PCR**

Le lot positif a été obtenu début juillet, le taux de mortalité étant plus important que celui de la 1<sup>ère</sup> période analysée (début juin) où aucun virus n'a été détecté. Ce résultat correspond à celui de 1998, les 3 lots positifs détectés avaient été obtenus au début de l'augmentation des taux de mortalité. Cependant, la détection du virus en 1998 semble moins importante en 1999.

L'analyse des périodes suivantes en PCR est nécessaire pour estimer l'évolution du taux de prévalence au cours de l'été 99.

Le seuil de détection d'ADN viral, le risque de contamination ou l'inhibition de l'amplification par des facteurs inhibiteurs, représentent les limites de la technique. Pour y palier, un témoin positif d'ADN viral (2500 copies) est utilisé pour vérifier si l'amplification a lieu, de même des témoins négatifs contrôlent les contaminations inter puits.

Les facteurs inhibiteurs peuvent empêcher l'obtention d'un résultat positif, chez les échantillons contenant de l'ADN viral, alors que le témoin positif sera bien positif. Les facteurs d'inhibition peuvent être un excès d'ADN viral, les particules de glande digestive ou de gonade. Aucune extraction d'ADN n'est réalisée au cours du protocole.

Il serait possible d'utiliser un témoin interne pour rendre compte de l'inhibition.

Le principe du témoin interne, est de réaliser une PCR avec 4 amorces, qui par paires vont initier la réplication de deux fragment d'ADN viral de taille différente.

Ainsi lors du dépôt des échantillons dans les eppendorfs, les 4 amorces (2 pour une PCR classique) ainsi qu'un type de fragment d'ADN viral sont ajoutés.

Si après migration il n'y a pas de bande correspondant au fragment introduit, alors la réaction a été inhibée. Si elle est seule, les lots sont tous négatifs, si il y a 2 bandes et que les témoins n'indiquent pas de contamination, alors le lot à 2 bande est positif.

La technique a ses limites, et le problème majeur est la contamination, favorisée par les nombreux facteurs d'expérience (manipulateur, matériels...).

D'autre part, on ne sait si l'ADN viral amplifié est sous forme latente ou active, si le virus possède bien tous les éléments structuraux nécessaires à sa virulence.

Par ailleurs, aucune information n'est aujourd'hui connue quant au seuil à partir duquel le virus est considéré comme dangereux pour l'animal.

D'autre part, la détection même en très faible quantité d'un virus de type Herpès sur le site de Fouras au cours de la saison estivale 1999, conforte l'infection diagnostiquée 4 ans auparavant. Il existerait alors un réservoir naturel de virus.

### **IV.4 ) La maturation gamétique**

L'observation n'est pas toujours aisée, les stades indéterminés sont certainement un peu surévalués, d'ailleurs un seul stade "a pondu" a été signalé début juillet (période 4) alors que de nombreux individus sont matures dès le début du mois de juin (période 2). Des émissions de gamètes dans l'eau ont démarré début juillet mais les plus grosses pontes ont lieu plus tard dans l'été.

En général, l'évolution du stade gamétique n'est pas en relation avec une augmentation de la taille des animaux. Les tailles sont, en effet, pratiquement semblables en fonction des différents stades de maturation gamétique. Il faudrait prendre en compte le poids des animaux en fonction de leur statut gamétique pour comparer les résultats.

Il n'y a pas d'augmentation de la maturation entre début juin et début juillet.

## **IV.5 ) Les analyses biochimiques**

Entre début juin et début juillet, le taux de glycogène diminue pour la plupart des lots analysés, ce qui correspond à une utilisation accrue des réserves énergétiques. Ce glycogène a pu servir à de la croissance somatique ou des tissus gonadiques.

Les résultats de la maturation gonadique ne semble pas renforcer la 2<sup>ème</sup> hypothèse, la vérification du taux des lipides permettrait de confirmer que le glycogène n'a pas été transformé en tissu gonadique. En effet, plutôt que le stade « différenciation », il faudrait plutôt s'intéresser à la part relative des tissus gamétiques par rapport au reste des tissus, ce que nous donnerait l'estimation du taux de lipides.

Au cours du temps, le poids sec et la longueur du naissain augmentent, il faudrait comparer ces résultats avec une courbe standard de croissance du naissain pour vérifier si cette croissance suit un rythme régulier et normal.

## CONCLUSION

Lors de cette étude, un bon indicateur de mortalité devait être utilisé pour estimer de façon correcte les mortalités du site de Fouras. Les trois critères qui ont donc été pris en compte donnent des résultats complémentaires, ainsi, nous pouvons dire que ces 3 critères sont indispensables à une estimation correcte des mortalités.

En 1999, il y a eu absence de fortes mortalités sur le site de Fouras, ce qui n'a pas permis d'étudier ce type de mortalité mais correspond à une bonne nouvelle pour les producteurs. La détection d'un virus de type Herpès au démarrage des mortalités début juillet correspond bien aux résultats antérieurs malgré un faible taux de détection.

Chez le naissain, comme chez l'adulte, il y a une baisse du glycogène entre début juin et début juillet.

Pour la maturation gamétique, les critères ont pu être réutilisés une deuxième fois, les résultats montrent qu'il existe des différences entre périodes même si seulement 4 lots ont été pris en compte. Pour la prochaine étude, plus de lots devraient être utilisés pour cette même expérience.

Ainsi, pour améliorer les résultats dans l'avenir, il faudrait explorer davantage ce qui se passe dans le temps, travailler sur un nombre plus grand d'individus en biochimie et, enfin, rajouter un indicateur lipidique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Andrieu P.Y., 1995.** Les Systèmes d'Information Géographique et l'Aménagement du littoral : domaines d'application, méthodologie d'implantation. *Mém. Ens. Milit. Sup. 2<sup>ème</sup> degré*. P. 26 et annexes.
- Arzul I., 1998-1999.** Etude de la diversité des virus de type *Herpès* infectant les mollusques bivalves marins. Rapport annuel de thèse.
- Barber B.J., Carnegie R.B. and Davis C.V., 1996.** Effects of timing of seed deployment on growth and mortality of oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease (JOD). *Departement of animal, Vetenary and Aquatic Sciences, University of Maine*. 4 : 1-22.
- Boucher C., 1978.** Huîtres, moules, coquillages de France. Comité interprofessionnel de la conchyliculture.
- Brey T. and Gage J.D., 1995.** Interactions of growth and mortality in benthic invertebrate populations : Empirical evidence for a mortality-growth continuum. *A. W. Inst. Pol. Mar. Res ; D. Mar. Lab.* 1080.
- 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
- Davis C.V. and Barber B.J, 1994.** Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, *Crassostrea virginica*, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. *Journal of Shellfish Research*. Vol.13, 1, 137-142.
- Gabbot P.A., 1975.** Storage cycles in Marine bivalve molluscs : a hypothesis concerning the relationships between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium, Oban, Scotland*. H. Barnes Editor. Aberdeen University Press : pp. 191-211.
- Garcia-Blanco M.A., Cullen B.R.,1991.** Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science*, 254 : 815-820.
- Gosselin L.A., Qian P.Y., 1997.** Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146 : 265-282.
- Grizel H. and Heral M., 1991.** Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47 : 399-403.

**Grizel H., 1997.** Programme sur *l'herpès-virus* et sur les mortalités estivales pour 1997.

**Hunt H.L., Scheibling R.E., 1997.** Role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. *Depart. Of Biol.* 155 :269-301.

**Hine P.M., Wesley B., Hay B.E., 1992.** Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12 : 135-142.

**Jenicek M. et Cléroux R., 1987.** Epidémiologie -Principes, techniques, application- *Edisem inc.*

**Larzul D., 1989.** La PCR : principes et applications. *Immunoannual. Biol. Spec.* 16 : 19-28.

**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 mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Rapport de thèse

**Le Deuff R-M. and Renault T., 1998.** Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology*, 80, 1317-1322.

**Lee M., Taylor G.T., Bricej V.M., Ford S.E., and Zahn S., 1996.** Evaluation of *Vibrio* spp. And microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*. Vol.15, 2, 319-329.

**Lodato M.I., 1997.** Mortalité estivale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (bassin de Marennes-Oléron) : étude des pratiques culturales et des caractéristiques biologiques et spatiales des élevages. Rapport de thèse.

**Lubet P., 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission de gamètes chez les mytilidés et les pectinidés (Mollusques bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 23 (4) : 412-434.

**Maurer D., Comps M. & His E., 1986.** Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*, 15, 309-317.

**Nicolas J-L., Comps M. & Cochenec N., 1992.** *Herpes-like* virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12 (1), 11-13.

**Renault T., 1997.** La traque des chercheurs. L'ostréiculteur français. Mars-avril 1997. 105 : 33-34.

**Renault T., Cochenec N., Le Deuff R-M. & Chollet B., 1994.** *Herpes-like* virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bul Eur Ass Pathol* 14. 64-66.

**Renault T., Le Deuff R-M., Cochenec N. & Maffart P., 1994.** Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue Med. Vet.*, 145,10 : 735-742.

**Renault T., Le Deuff R-M., Cochenec N., Chollet B. & Maffart P., 1995.** Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res*, 26, 539-543.

**Renault T., Le Deuff R-M., Lipart C., Chollet B. & Haffner P., 1997.** Programme *Herpès virus* - Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade, mars 1996-février 1997, pp 60.

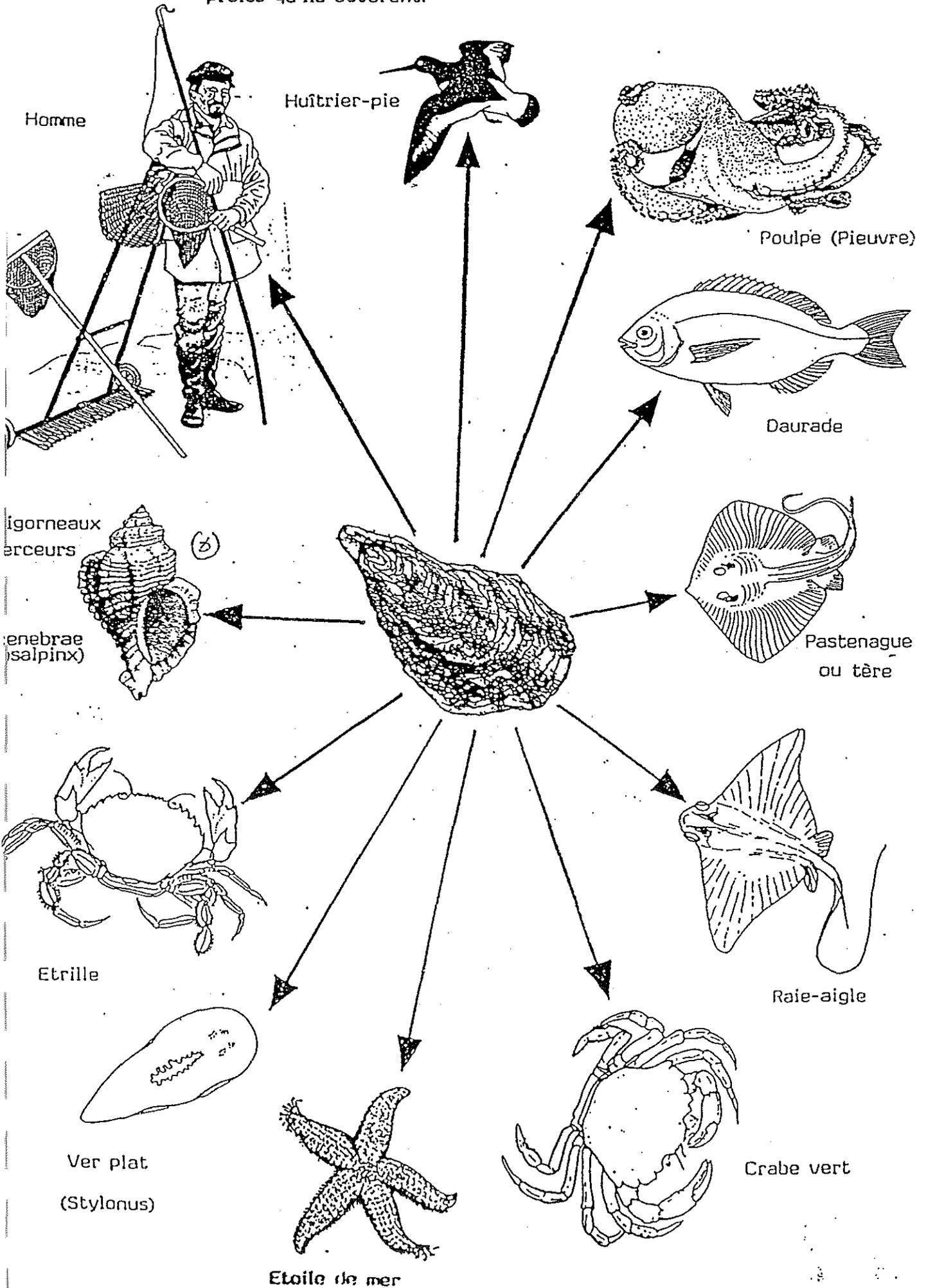
**Scherrer, 1984.** Biostatistique. Gaëtan Morin Editeur. 850 p.

**Soletchnik P., Razet D., Geairon P., Faury N & Gouletquer P., 1997.** Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat. Living Resour.* 10 : 177-185.

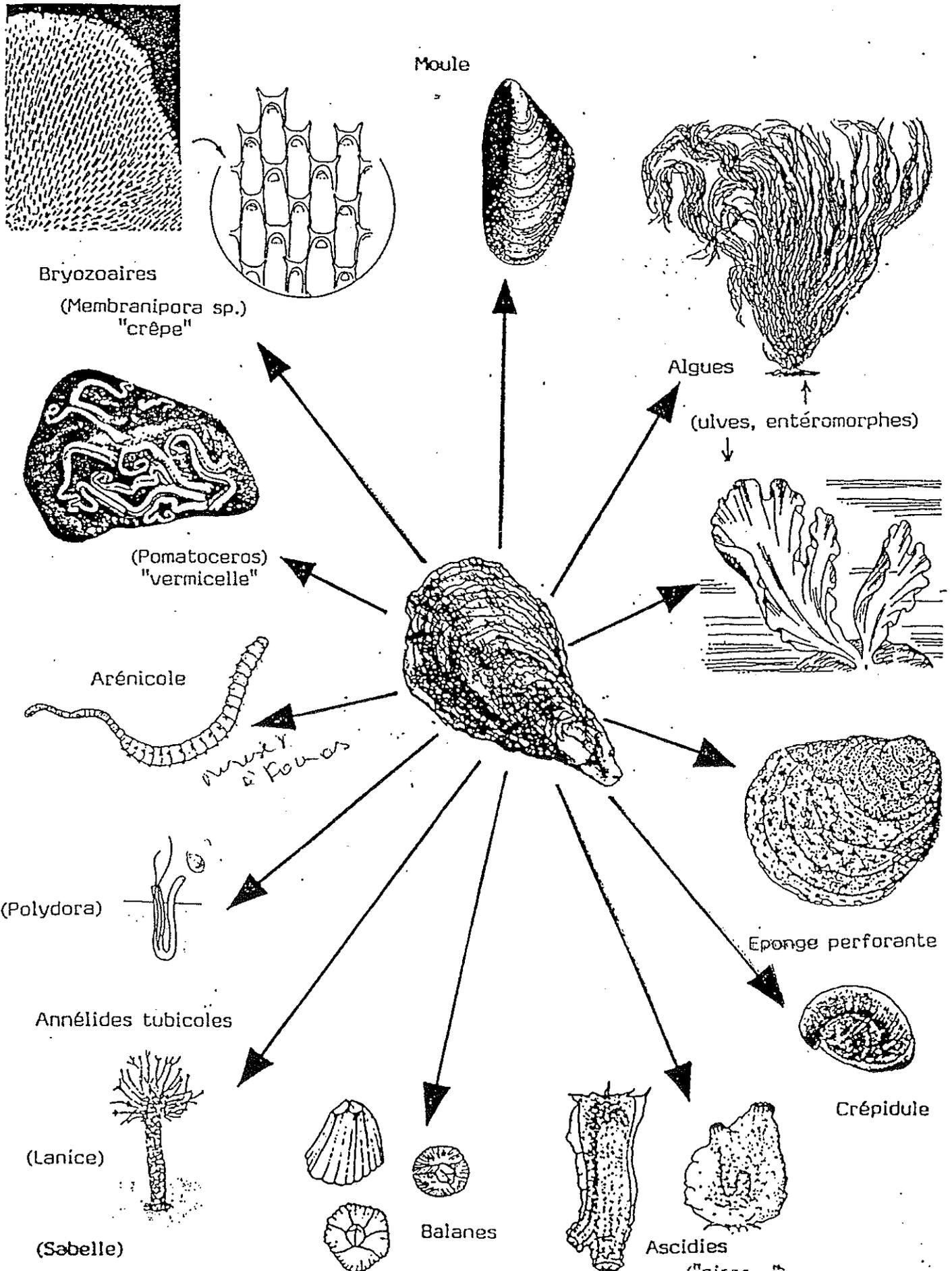
**Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P., Gouletquer P., 1999.** Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat. Living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

**Sornin J.M., Feuillet M., Héral M., Deslous-Paoli J.M., 1983.** Effet des biodépôts de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) sur l'accumulation de matières organiques dans les parcs du bassin de Marennes-Oléron. *J.moll. Stud., Suppl.* 12A, 185-197.

Ce sont des êtres vivants qui provoquent directement la mort de leurs proies qu'ils dévorent.

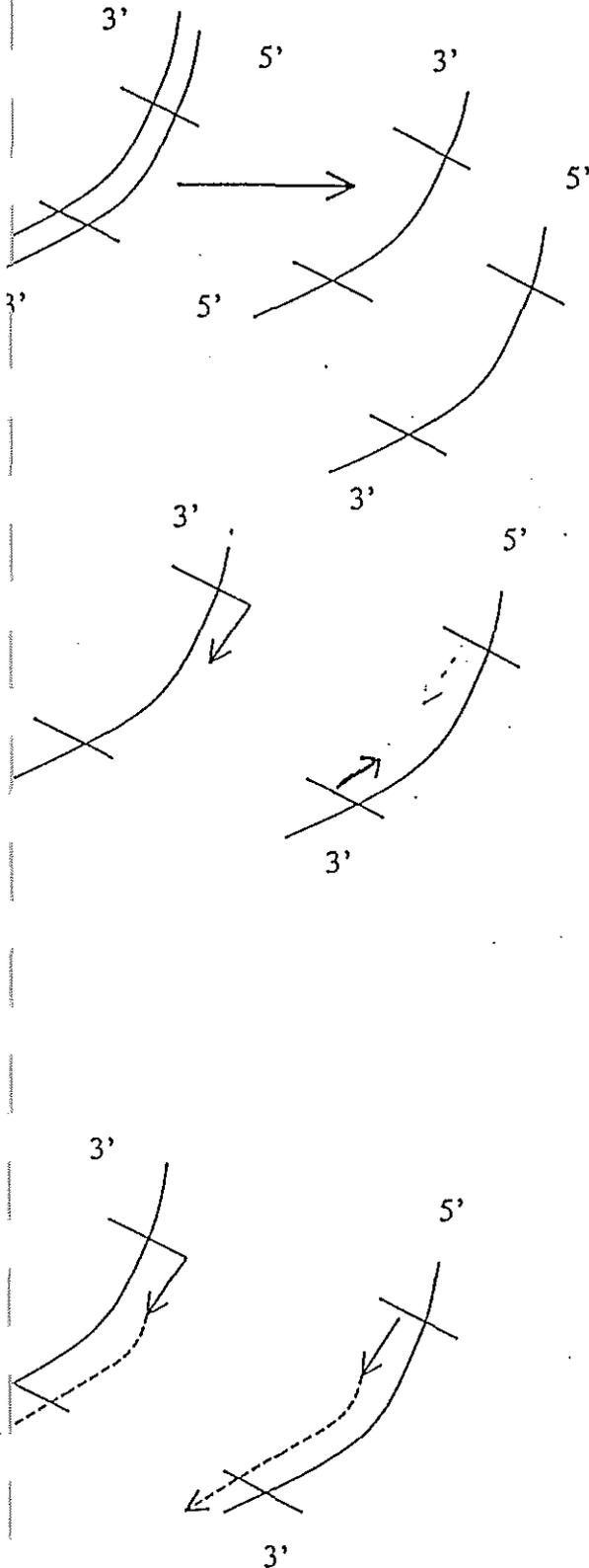


Ce sont des êtres vivants qui occasionnent des inconvénients souvent légers, mais parfois graves pouvant entraîner la disparition d'une fraction d'une population d'huîtres.



# Annexe 3

## description de l'amplification par la réaction de PCR.



### ① Dénaturation

Elle est réalisée à 94°C pendant une minute. Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN sont séparés. De l'ADN simple brin est alors obtenu, qui servira de matrice pour l'amplification suivante.

### ② L'hybridation

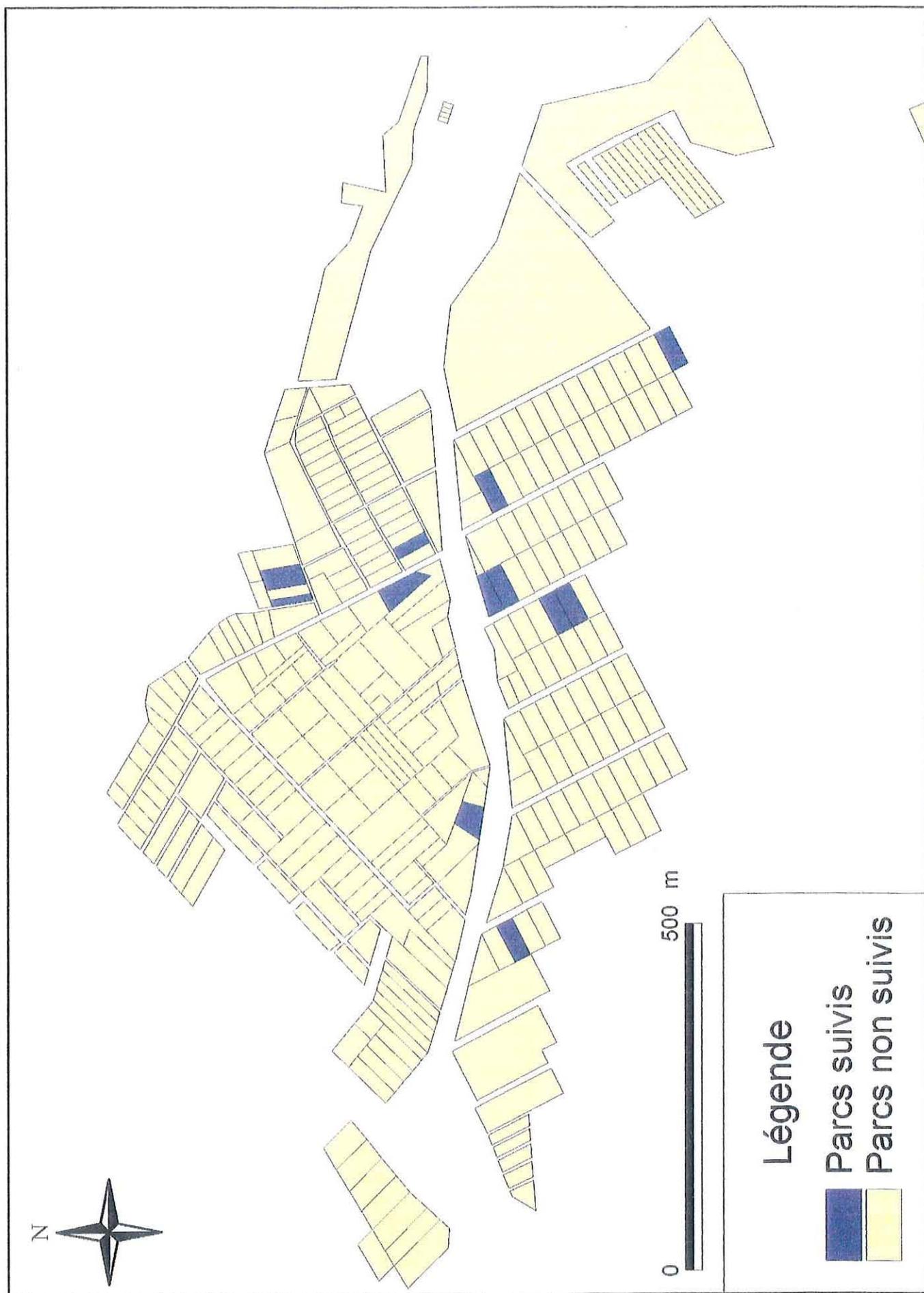
Elle est réalisée à la température choisie pendant une minute. Le choix de la température se fait selon une formule empirique :  $T_m (^{\circ}\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$  avec  $T_m = \% \text{GC}$ . A cette température, les amorces qui servent de point de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice de part et d'autre de la séquence cible d'amplification. Les amorces sont ajoutées en grande quantité au milieu réactionnel. De plus, les amorces étant de petite taille, leur cinétique d'hybridation sur les brins d'ADN matrice est beaucoup plus rapide que celle des brins matrices entre eux. La température d'hybridation est déterminée par la séquence des amorces.

### ③ L'élongation

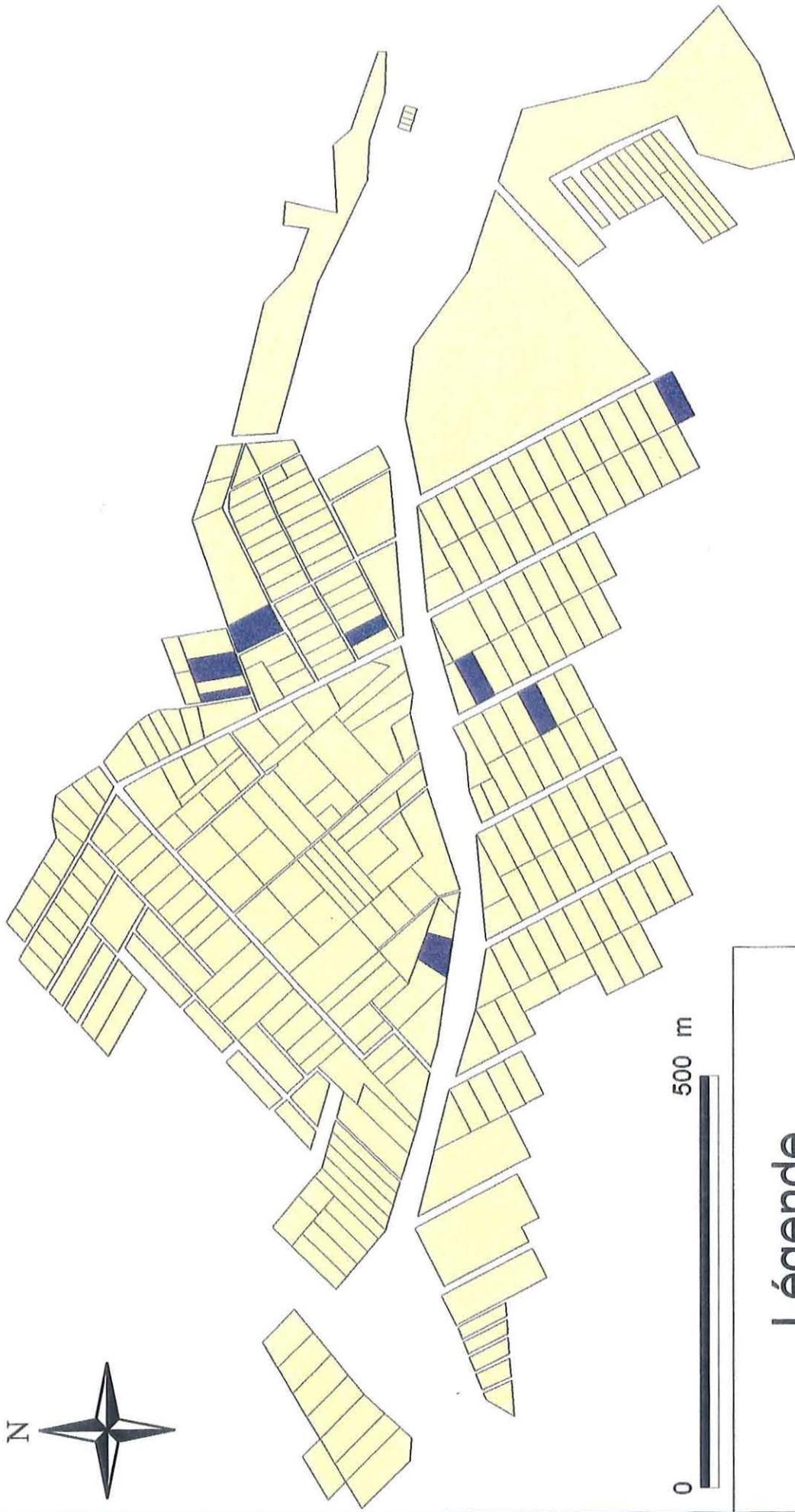
Elle est réalisée à 72°C pendant une minute, c'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermoresistante (Taq polymérase), qui reste stable à des températures pouvant aller jusqu'à 95°C. L'enzyme polymérise à partir des extrémités 3' des amorces. Elle prend pour matrice le brin d'ADN sur lequel est hybridée l'amorce, et polymérise un brin d'ADN de séquence complémentaire.

A la fin des 30 cycles, le nombre de copies de la séquence cible est de l'ordre de  $2^{30}$ .

# Les sites suivis en 1998



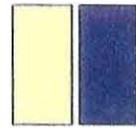
# Les sites suivis en 1999



## Légende

Parcs non suivis

Parcs suivis



## Annexe 5

### Composition du fixateur Davidson.

- Eau de mer 1200 mL.
- Alcool à 95 ° 1200 mL.
- Formol 300 mL.
- Glycerol 400 mL.
- Acide acétique cristallisable 10 %.

# Annexe 6

## La réalisation de coupes histologiques :

Elle permet l'observation de structures tissulaires et cellulaires.

Pour cela les échantillons subissent quatre étapes :

- ↳ Fixation des tissus
- ↳ Inclusion
- ↳ Confection des coupes
- ↳ Coloration et montage des lames

### ⊙ Fixation

Son but est d'immobiliser les structures en conservant une morphologie la plus proche possible de celle à l'état *in vivo*, et empêche 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 (annexe x), qui sont respectivement une solution tamponnée et une solution salée de formol. De par 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 nos huîtres, permet la récupération des échantillons pour la MET.

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

### ⊙ inclusion à la paraffine

Elle nécessite 4 opérations successives, dont les 3 premières dans un automate à inclusion, sous vide, et qui sont :

- ↳ Déshydratation des pièces :

Par un traitement à l'éthanol de concentration croissante, cette étape est obligatoire car la paraffine n'est pas miscible dans 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 des moules métalliques 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.

### ⌚ **Confection des coupes**

Les coupes d'épaisseur 2 microns sont effectués à l'aide d'un 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 une nuit en étuve à 60°C, pour permettre une bonne adhésion de la coupe sur la lame.

### ⌚ **Préparation à la coloration et montage**

Pour préparer la coloration à l'hémalum-éosine les lames doivent être déparaffinées par des bains de xylène, qui sera chassé par des bains d'alcool, puis l'échantillon sera réhydraté par des bains d'eau avant de subir les bains de colorants.

Les lames sont ensuite montées à l'aide d'un milieu (Eukitt) entre lame et lamelle. Ce milieu est miscible au solvant et assure une conservation durable.

# Annexe 7

## Coloration à l'hémalun-éosine

### Réactifs:

#### Hémalun:

▪ Hématoxyline	4g.
▪ Alcool à 95°	200 mL.
▪ Potassium aluminium sulfate	11 g.
▪ Eau distillée	200 mL.
▪ Glycerol	200 mL.
▪ Acide acétique	20 mL.
▪ Iodate de potassium	0,8 g (ou $Kmno_3$ ; 4,07 g).

Dissoudre séparément l'hématoxyline dans l'alcool, l'alun de potassium dans l'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajouter les autres constituants dans l'ordre énuméré.

#### Eosine:

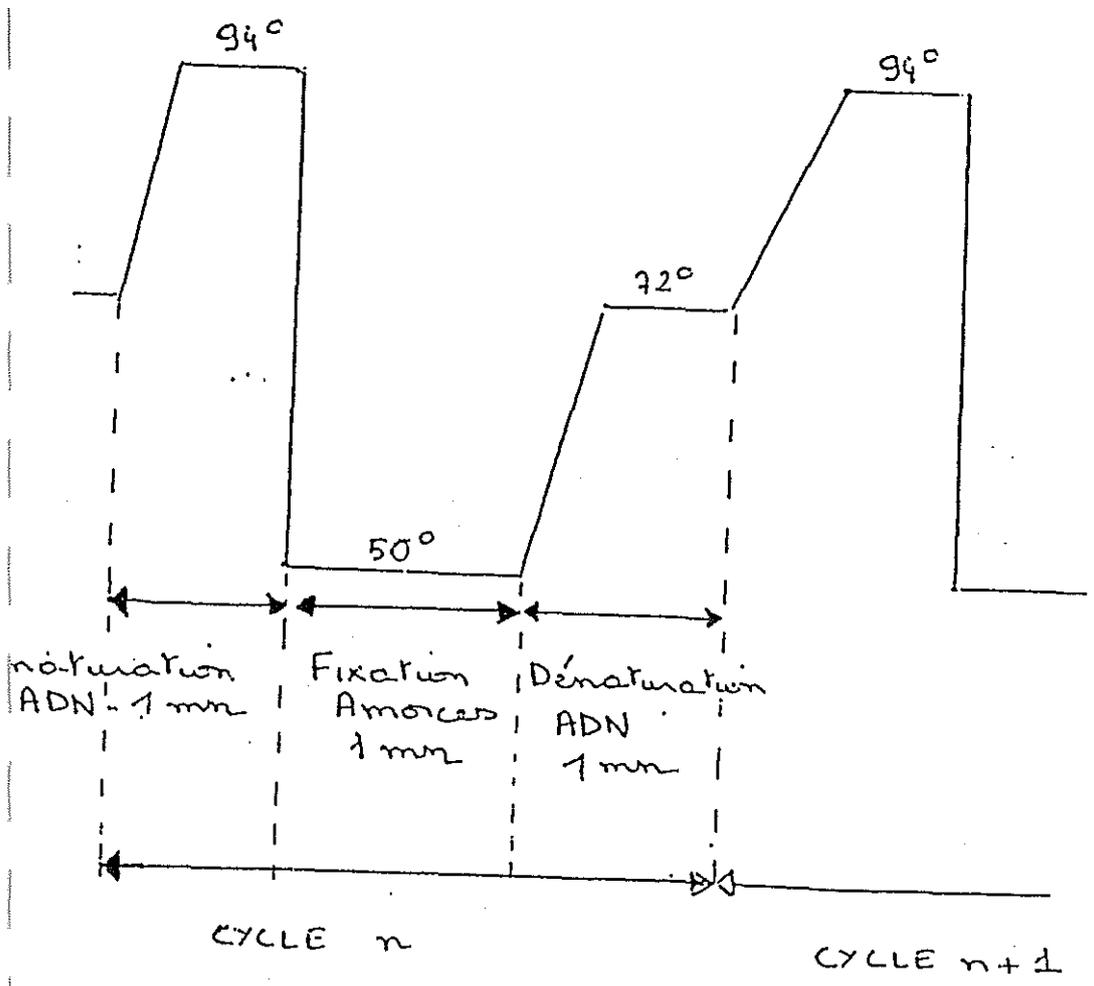
▪ Eosine	2,5 g.
▪ Eau courante	250 mL.

### Protocole:

▪ Déparaffinage	2 bains de 30 min. de Xylène minimum. 2 bains d'alcool de 15 min.
▪ Réhydratation	5 min dans de l'eau en circulation.
▪ Hémalun	1 bain d'1 à 2 min.
▪ Rincer à l'eau courante	5 min.
▪ Eosine	3 min. 30 s.
▪ Ethanol absolu	3 bains de 1 min.
▪ Xylène	2 bains de 10 min.
▪ Montage des lames.	

CYCLE DE LA PCR

Annexe 8



# Annexe 9

## Protocole de PCR pour la recherche d'ADN de virus de type herpès chez le naissain d'huître, avec les amorces OHV3 et OHV4.

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

- Échantillons égouttés, congelés dans leur coquille à  $-20^{\circ}\text{C}$ , en sacs plastiques, le plus rapidement possible après le prélèvement.
- Conservation de 3 mois maximum au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant analyse en PCR.
- Mettre des gants.
- Ouverture des animaux encore congelés : 30 individus par lot en utilisant une lame de scalpel neuve pour chaque lot.
- Décongélation des animaux dans leur coquille après ouverture.
- Séchage sur papier absorbant jusqu'à ce qu'aucune trace d'humidité ne soit visible.
- Confection des pools de 5 individus en sachets Minigrippe.
- Recongélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  des pools d'animaux.

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

- Mettre des gants.
- Sortir les sachets Minigrippe du congélateur et placer sur glace.
- La technique utilisée est fonction de la catégorie de poids des animaux :
  - ↳ Animaux  $\leq$  T12 :
    - Broyage en tube Eppendorf de 1,5 ml
    - Tarer les Eppendorfs au fur et à mesure.
    - Ouvrir le sac et récupérer les animaux à la pipette Pasteur.
    - Additionner 2X ml d'eau distillée pour un poids de X g.
    - Broyer au piston Pellet jusqu'à obtention d'un broyat homogène.
  - ↳ Animaux  $>$  T12 :
    - Broyage au maillet directement dans les sacs sans ajout d'eau.
    - Changer de papier absorbant, mis sous les sacs, pour chaque pool.
    - Lavage du maillet après chaque pool.
    - Récupérer l'ensemble des tissus broyés avec une lame de scalpel.
    - Couper un coin du sac avec une lame de scalpel.
    - Récupérer 0,5 g de broyat dans un tube Eppendorf de 1,5 ml
    - Changer de lame de scalpel entre chaque sac.

Remarque: les tubes Eppendorfs sont à conserver sur la glace durant cette étape de préparation des broyats.

### c) Préparation des surnageants de broyats (salle de préparation des échantillons).

- Addition d'eau bidistillée
- ↳ Animaux ≤ T12, déjà réalisée.
- ↳ Animaux > T12, ajouter 2X ml D'eau pour X g de tissus.  
Après addition d'eau vortexer les tubes et les conserver sur la glace.
- Traitement au bain-marie bouillant pendant 10 min.
- Mise sur glace.
- Vortexer.
- Centrifugation 10 000 trs/min pendant 5 min 4 °
- Récupération du surnageant de broyat, le volume est fonction de la catégorie de taille des animaux :
- ↳ Animaux ≤ T12 : récupération d'un volume de surnageant égal à 1/5<sup>ème</sup> du volume d'eau bidistillée ajoutée pour réaliser le broyat et dilution immédiate au 1/10<sup>ème</sup>.
- ↳ Animaux > T12 : récupération de 100 µL. De surnageant de broyat dilués immédiatement dans 900 µL d'eau bidistillée.
- Vortexer les dilutions de surnageant.
- Congélation immédiate à -80°C.

Remarque: réaliser les analyses PCR dans les 8 jours suivant la congélation.

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

- Mettre des gants
  - Décongélation des échantillons sur la paillasse, puis les conserver sur un portoir, sur la glace, dans la salle des thermocycleurs.
  - Retirer les gants
  - Passer dans la pièce de préparation du milieu réactionnel.
  - Remettre des gants.
  - Préparer les tubes pour la PCR, les fermer et les identifier. Les mettre sur un portoir dans la glace.
  - Décongeler les réactifs (Tampon 10X, MgCl<sub>2</sub>, nucléotides, amorces), dans les mains.
  - Préparer le mélange réactionnel dans un Eppendorf. Préparation pour un tube (à multiplier par n tubes):
- |                     |          |   |
|---------------------|----------|---|
| ↳ H <sub>2</sub> O  | 31,5 µL. | → |
| ↳ Tampon 10X        | 5 µL.    |   |
| ↳ dNTPs             | 5µL.     |   |
| ↳ MgCl <sub>2</sub> | 5 µL.    |   |
| ↳ Amorce 1          | 1µL.     |   |
| ↳ Amorce 2          | 1 µL.    |   |
| ↳ Taq               | 0,5µL.   |   |
- Distribuer le mélange réactionnel préparé (49 µL/ tube) avec le même cône à filtre dans les Eppendorfs. Laisser les tubes ouverts sur la glace.
  - Passer les tubes contenant le mélange réactionnel dans la pièce où se trouvent le thermocycleur et les échantillons.
  - Mettre en route le thermocycleur afin de préchauffer le couvercle.
  - Distribuer 1 µL. d'échantillon et des différents témoins dans les tubes contenant les 49 µL. de mélange réactionnel, les fermer. Les échantillons sont vortexés avant le prélèvement.
  - Les tubes sont vortexés et centrifugés (centrifugeuse de paillasse).
  - Placer les tubes dans le thermocycleur.

- Mettre en route le programme de PCR choisi.

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

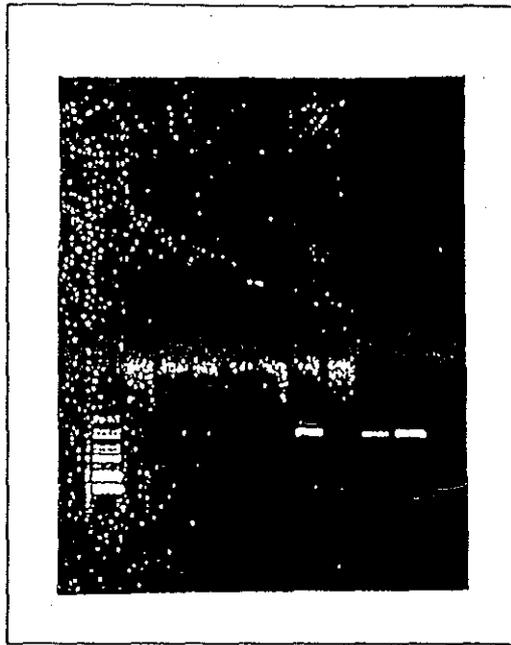
- Récupération des tubes de PCR et les placer au réfrigérateur.
- Couler un gel d'agarose 1% contenant du BET.
- Déposer des gouttes (2 $\mu$ L.) de tampon de dépôt sur un parafilm.
- Ajouter 10  $\mu$ L. d'échantillon par goutte de tampon de dépôt.
- Mélanger l'échantillon et reprendre la totalité de la goutte.
- Déposer le volume total par puits.
- Migration à 150 volts.
- Lecture à la table UV.

Remarques:

Les témoins négatifs sont réalisés à partir d'eau bidistillée, afin 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. L'un comporte 2500 copies et l'autre,  $5 \cdot 10^7$ . Ils permettent de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la PCR.

# Annexe 10

Electrophorèse sur gel d'agarose 1%.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 : marqueur de taille.

2 : témoin négatif (tube d'eau).

3 à 7 : échantillons

8 : témoin négatif

9 : témoin positif (2500 copies).

10 : témoin positif ( $5 \cdot 10^7$  copies).

Les échantillons déposés dans les puits 4 et 7 sont positifs.

# Annexe 11

## Méthodes d'analyse des SUCRES TOTAUX ET GLYCOGENE

### Méthode de Dubois et al 1956

#### PRINCIPE

En 1951, Dubois a déclaré après expérimentation, que "le phénol en présence d'acide sulfurique concentré peut être utilisé pour déterminer par colorimétrie des micro-quantités d'oses et leurs dérivés, d'osides et de polyholosides présents dans l'eau de mer". Cette méthode est simple, rapide, et donne des résultats reproductibles. Les réactifs sont bons marchés et stables. De plus, la coloration brune-orangée est également très stable.

Par cette méthode, nous avons dosé les oses et dérivés qui ont un maximum d'absorption à 490  $\mu\text{m}$  tel que : D xylose (furfural), D mannose, D fructose, D glucose, D galactose, D galacturonique, D manurone, 2 desoxy d ribose, le saccharose, le maltose, le lactose et le raffinose.

#### MATERIEL

- Tube en verre 100 x12 mm : 1 par analyse
- Tube en polypropylène 93x15 mm : 1 par analyse
- Produits chimiques:
  - \* TCA à 15%: 3cc par analyse et gamme étalon (30 cc environ)
  - \* Ethanol absolu : 4 cc par analyse
  - \* H<sub>2</sub>O : 0.5 cc par analyse
  - \* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 5 cc par analyse
  - \* Phénol à 5% : 1 cc par analyse

#### PREPARATION

- Peser 5 à 10 mg de chair lyophilisée dans un tube en verre de 100x12 mm
- Ajouter 3 cc de TCA: Acide Trichloracétique à 15%
- Homogénéiser à l'aide d'une spatule (rincer entre chaque tube)
- Laisser extraire 1 heure à 4°C
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Centrifuger à 2000 tr/mn pendant 10 mn

#### SUCRES TOTAUX

- Pipeter 0.5 cc du surnageant dans un tube en polypropylène de 10 cc

#### GLYCOGENE

- Pipeter 0.5 cc du surnageant dans un tube en polypropylène de 10 cc
- Ajouter 4 cc d'Ethanol absolu pour précipiter le glycogène
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn pendant 10 mn
- Jeter le surnageant
- Ajouter 0.5 cc de H<sub>2</sub>O bouillante
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique

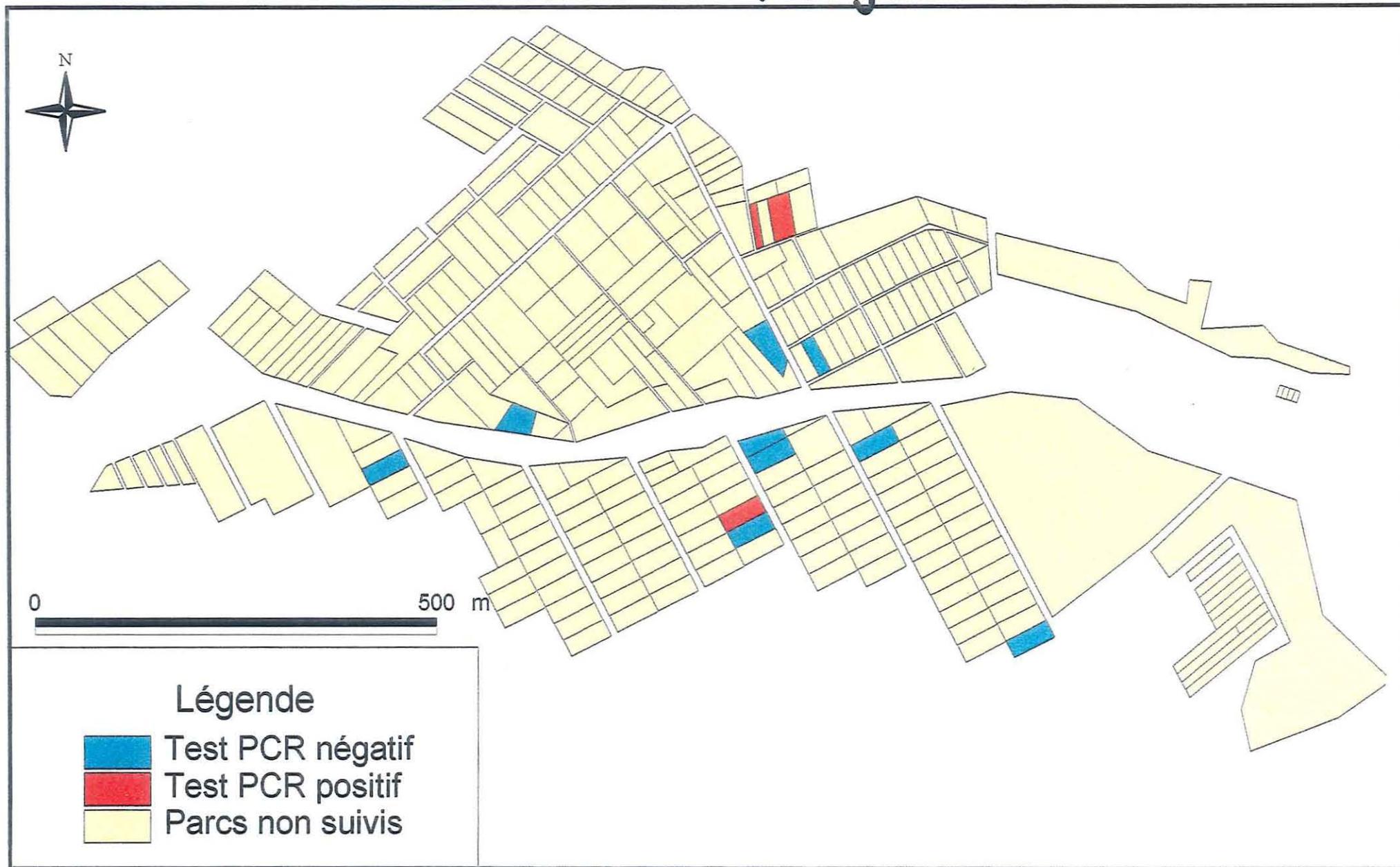
#### ETALON

- Faire une gamme-étalon de 0 à 500  $\mu\text{g/ml}$  dans le TCA à 15% à partir de **Glucose** concentré à 100 mg/dl

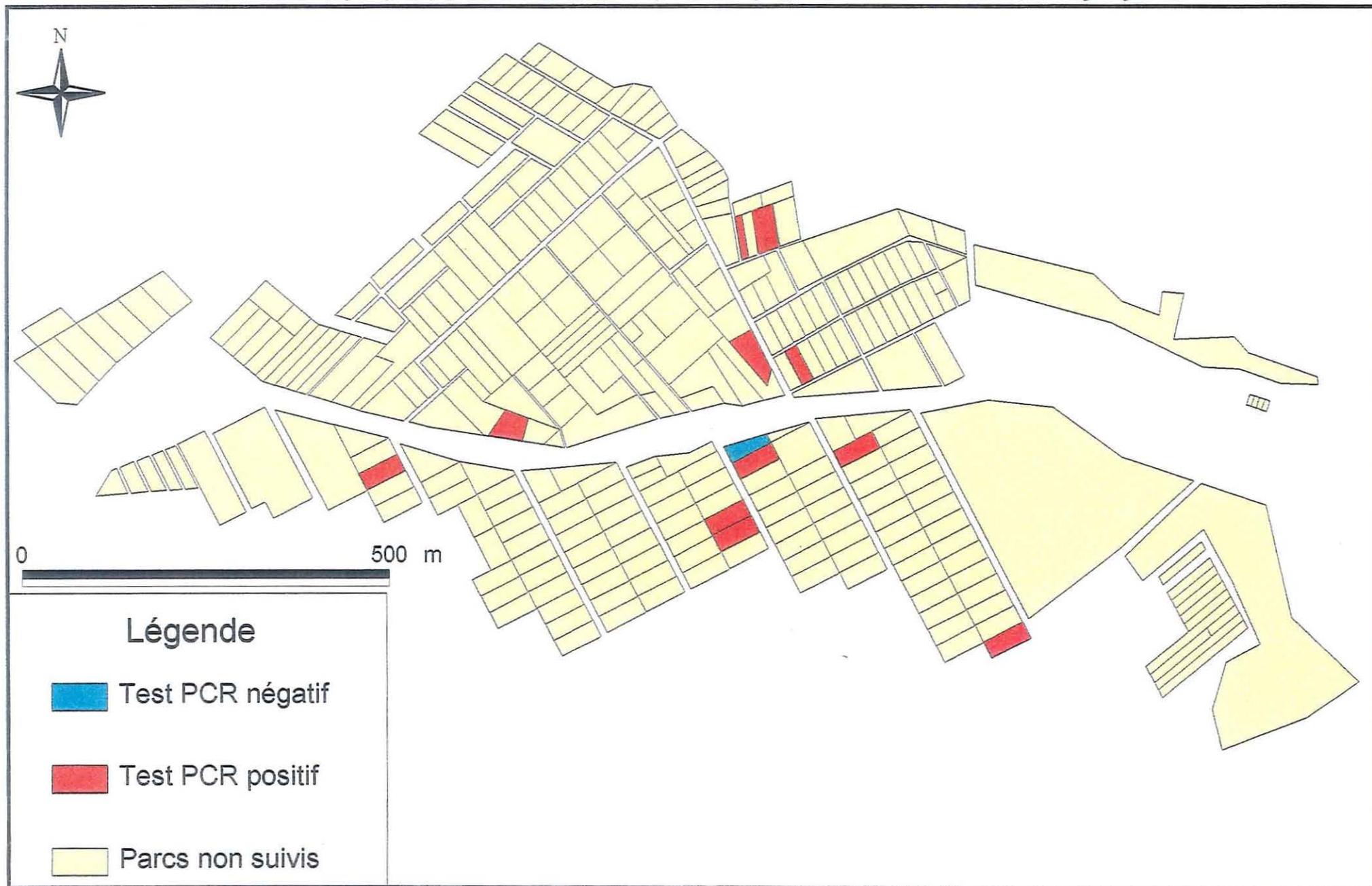
## DOSAGE

- Ajouter 1 cc de phénol à 5%
- Attendre 40 mn à température ambiante
- Ajouter 5 cc de  $H_2SO_4$
- Attendre 10 mn
- Homogénéiser à l'aide de l'agitateur mécanique
- Lire à 490 nm (cuve de 10 mm).

# Résultats PCR fin juin 1998



# Résultats des tests PCR en 1998



# Résultats des tests PCR début juillet 1999

