



**Résumés  
des  
Actions MOREST  
2004**

**MORTalités ESTivales  
de l'huître creuse  
*Crassostrea gigas***

# S O M M A I R E

<i>Poster résumant les principaux résultats Morest (2001-2004)</i> .....	3
<i>Poster résumant les outils de prévision et de gestion du risque en préparation (2005)</i> .....	4
<i>Résumé des actions 2004</i> .....	5
<i>Ifremer - DRV/RA/Laboratoire Conchylicole de Normandie (LERN) Port-en-Bessin</i> .....	12
<i>Université de Caen - UMR/PE2M</i> .....	33
<i>Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M (Microbiologie) Brest</i> .....	44
<i>Coll. DEL/ARCACHON</i> .....	50
<i>Coll. CREMA</i> .....	67
<i>Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR - équipe RSA - Plouzané</i> .....	71
<i>Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR équipe IHP - Plouzané</i> .....	76
<i>MNHN - Muséum National d'Histoire Naturelle, Station de Biologie Marine - Concarneau</i> .....	88
<i>Ifremer - DRV/RA/Laboratoire Conchylicole de Bretagne LCB - La Trinité-sur-Mer</i> .....	91
<i>Ifremer - DEL (Ecotoxicologie) - Nantes</i> .....	106
<i>Ifremer - DRV/RA - Laboratoire Conchylicole Pays de Loire (LCPL) Bouin</i> .....	120
<i>Ifremer - DRV/RA Laboratoire Conchylicole de Poitou Charentes (L.C.P.C) - La Tremblade</i> .....	125
<i>Ifremer - DRV/RA Laboratoire de Génétique et Pathologie - équipe Génétique La Tremblade</i> .....	132
<i>Ifremer - DRV/RA Laboratoire de Génétique et Pathologie - Equipe Pathologie - La Tremblade</i> .....	136
<i>Université de la Rochelle - LBEM (Laboratoire de Biologie et Environnement Marins)</i> .....	145
<i>Laboratoire CREMA L'Houmeau (UMR 010 CNRS-IFREMER)</i> .....	152
<i>Ifremer - Laboratoire GPIA-UMR5171 - Montpellier</i> .....	163
<i>SYSAAF : Syndicat des sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français - Rennes</i> .....	167
<i>CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole) Le Château d'Oléron</i> .....	173
<i>Annexe 1 - Tableau récapitulatif des actions 2004</i> .....	179
<i>Annexe 2 - Adresses des laboratoires</i> .....	182



# Morest

## Mortalités estivales des huîtres creuses

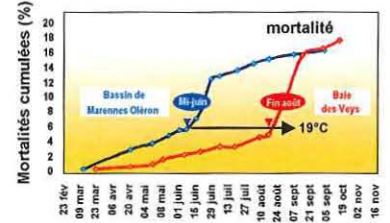
### C'est l'interaction de plusieurs facteurs de risques qui conduit aux mortalités estivales

➔ 19°C, la température de l'eau ouvre la «fenêtre du risque»

Température

La mortalité survient au delà d'une température seuil de 19°C :

- quel que soit le site géographique,
- quelle que soit la température maximum au delà de ce seuil



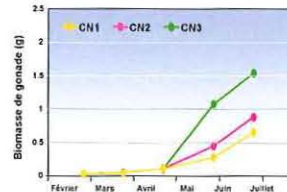
➔ La reproduction est le deuxième facteur de risque

➔ L'abondance de la nourriture augmente l'intensité de reproduction

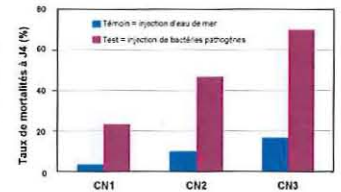
➔ La sensibilité aux infections de pathogènes augmente alors...

Reproduction  
Nourriture  
Pathogènes

Trois conditions croissantes de nourriture (CN1, CN2, CN3) induisent trois intensités de reproduction ...



..qui affaiblissent les défenses immunitaires des huîtres.

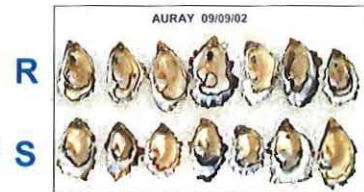


➔ La stratégie de reproduction est inscrite dans les gènes

Génétique

Il existe dans la nature des huîtres Résistantes (R) ou Sensibles (S) aux mortalités estivales :

- les «S» investissent plus dans la reproduction que les «R»,
- elles pondent plus difficilement, prolongeant ainsi la période de risque.



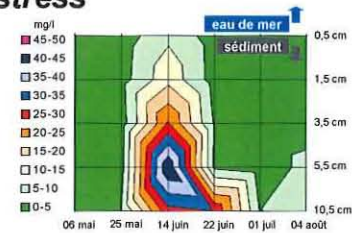
En septembre, les «R» ont déjà pondu, contrairement aux «S».

➔ Le sédiment est à l'origine d'un stress

Sédiment

La mortalité augmente avec la proximité du sédiment :

- l'ammonium et les sulfures produits par la transformation de la matière organique enfouie, diffusent dans l'eau vers 19°C et provoqueraient un stress important.



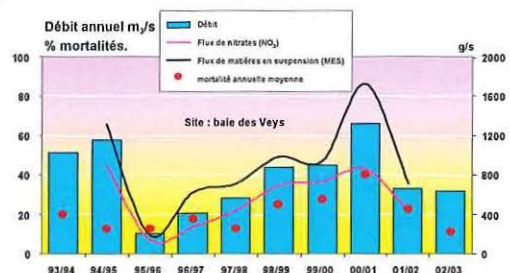
Représentation graphique d'un «epic d'ammonium» dans une carotte sédimentaire à la surface du sédiment, vers la mi-juin, dans le sud du Bassin de Marennes Oléron.

➔ Les bassins versants présentent un risque

Bassins versants

Les bassins versants drainent :

- des sels nutritifs qui favorisent l'abondance nutritive,
- de la matière organique qui peut s'accumuler dans le sédiment,
- d'autres molécules potentielles, sources de stress.



En Baie des Veys, la mortalité estivale est bien associée aux apports des rivières, en relation avec les années pluvieuses.

Aucun des facteurs évoqués ci-dessus n'induit à lui seul les mortalités estivales. Leur combinaison (interaction) est à l'origine des épisodes de mortalités estivales.

La connaissance de ces «cocktails de risques», propres à chaque bassin ostréicole, permet aujourd'hui d'envisager une gestion de ce risque.

www.ifremer.fr



Ifremer



# Morest

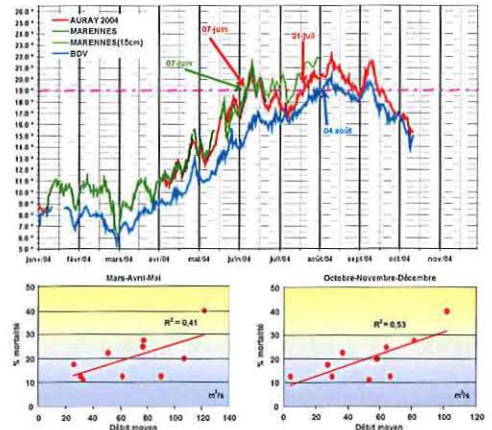
## Mortalités estivales des huîtres creuses

En 2005, les équipes «Morest» tirent les conclusions sur les interactions et préparent des propositions pour une gestion des risques.



3 axes

Prédire  
Analyser  
Gérer } le risque



www.ifremer.fr

Prédire le risque

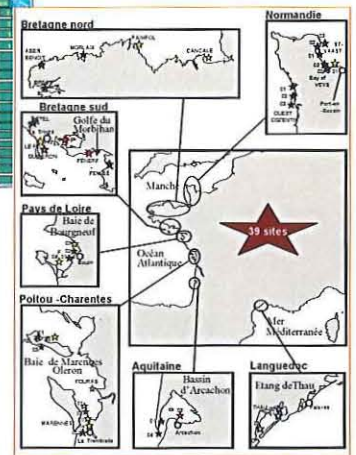
La date est fixée par la courbe de température de l'eau de mer chaque année et dans chaque site.

L'intensité dépend beaucoup de la pluviométrie et des apports des bassins versants : validation à faire à partir de la météo.

Analyser le risque

Dans chaque site ostréicole avec son bassin versant :

- établir une grille d'évaluation des risques en tenant compte de tous les facteurs de risque connus et hiérarchisés,
- faire une étude de la typologie des bassins de production à partir de cette grille,
- compléter les mesures là où c'est nécessaire (stations de mesures MAREL estran).



Gérer le risque

### Utiliser le schéma d'interaction



Les mortalités sont la conséquence d'interactions complexes entre l'huître, l'environnement et des pathogènes opportunistes. Ces interactions commencent à être connues. On peut envisager de les prévenir

#### Court terme :

- préservier les cheptels de l'effet thermique ou trophique,
- éloigner du sédiment, éviter les stress,
- adapter les parcours zootechniques (cycles d'élevage),
- éliminer précocement le captage le plus sensible,
- utiliser des huîtres stériles triploïdes.

#### Long terme :

- centre de sélection génétique,
- gestion des apports des bassins versants.

Les solutions seront à étudier au cas par cas selon la typologie des bassins et les risques identifiés. Un partenariat étroit avec la profession devra être engagé afin de pouvoir intégrer les critères d'économie et de faisabilité technique sur quelques sites pilotes à définir ensemble (dans les trois ans à venir) .

A plus long terme, sur un plan technique, il est possible d'envisager un programme de sélection de souches et sur un plan politique, la gestion rationnelle des apports des bassins versants devra mieux prendre en considération leurs impacts sur les écosystèmes conchylicoles.



ifremer

## Résumé des actions 2004

Le Défi Morest s'intéresse aux mortalités estivales des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2001. Il vient d'achever sa quatrième année de travaux par les journées Morest qui se sont tenues dans les locaux du Conseil Régional de Basse Normandie, à son invitation. Elles ont rassemblé 110 personnes contribuant activement à ce projet, tant du côté scientifique (15 laboratoires, 8 disciplines, 6 organismes de recherche) que de celui des structures régionales ou départementales, des structures de transfert de la recherche vers la profession des professionnels représentés par les différentes Sections Régionales Conchylicoles et le Syndicat des écoseurs/nurseurs de coquillages.

Avant d'entamer la dernière année du défi en 2005, le bilan provisoire qui vient d'être fait a permis des avancées importantes pour clarifier la majeure partie des interactions déjà soulignées entre l'environnement, les pathogènes opportunistes et l'huître qui seraient à l'origine de ces mortalités estivales.

### La climatologie et l'environnement

Les années précédentes, quatre résultats concernant l'effet du climat et de l'environnement ont été avancés :

- la température de la mer à partir de 19°C qui constitue une fenêtre de risque indispensable mais pas suffisante pour observer des mortalités,
- les apports annuels d'eau douce issus des bassins versants qui peuvent expliquer pour partie les mortalités sur le site de la Baie des Veys,
- la richesse en phytoplancton qui amplifie le risque,
- la proximité du sédiment (Marennes et Auray).

En 2004, le couplage des séries historiques de mortalités (REMORA, MOREST) avec les bases de données environnementales (REPHY, METEO-FRANCE) a permis de généraliser ces résultats en identifiant et en hiérarchisant à grande échelle géographique les facteurs environnementaux intervenant dans les processus de mortalités.

A l'échelle pluriannuelle d'observation, il se confirme que la température représente un facteur majeur dans le déclenchement des mortalités dès lors que la température des masses d'eau atteint le seuil de 19°. Les apports d'eau douce et la chlorophylle "a" (indicateur de niveau trophique) sont souvent deux facteurs de risque dont l'effet est clairement mis en évidence en Baie des Veys et dans une moindre mesure dans le bassin de Marennes Oléron.

Enfin, le compartiment sédimentaire se révèle aujourd'hui comme un facteur de risque vis à vis de la survie des huîtres sur les trois sites ateliers.

Ces études permettent de dégager les premiers éléments d'une typologie des écosystèmes conchylicoles par rapport à ces risques.

Enfin, la différence de climat entre le nord et le sud est associée à une différence dans les classes d'âge touchées. Ainsi, les mortalités sont généralement observées sur les huîtres dès la première année, d'Arcachon à la Bretagne Sud car elles atteignent le stade critique du cycle reproducteur dès le premier printemps, alors que ce stade n'est observé principalement que sur des huîtres de deux ans dans les écosystèmes plus au nord (Bretagne Nord et Normandie) au moment des 19°C.

**Pour comprendre ces effets climatiques, plusieurs questions ont été étudiées :**

### **Pourquoi un seuil de température critique à partir de 19°C ?**

**La température** n'est pas à elle seule responsable des mortalités ; elle doit être associée à d'autres facteurs de risque. A titre d'exemple, pendant la canicule de 2003, le taux de mortalité était en moyenne faible alors que le seuil de 19°C a été largement dépassé.

Cependant, la température de 19°C est un facteur déterminant dans la date d'apparition du risque de mortalités. Cette température peut servir désormais dans la prédiction du risque.

**Le seuil de 19°C** pourrait correspondre d'après les résultats actuels à la conjonction de plusieurs phénomènes contrôlés par la biologie en association avec la température :

- **La reproduction** : les mortalités estivales surviennent en pleine période de reproduction. La mise en place printanière de la gamétogenèse se traduit par un épuisement des réserves glucidiques. On confirme ainsi à 19°C une accélération de l'utilisation des réserves d'autant plus grande que la demande énergétique augmente avec la température. Rappelons que l'intensité de la reproduction dépend elle même de la disponibilité en nourriture à l'automne et au printemps, ce qui explique la diversité des situations selon les écosystèmes.
- **L'assimilation est perturbée** : parallèlement à cette utilisation des réserves, l'huître puise aussi son énergie de la nourriture présente dans le milieu pour soutenir la croissance gonadique. Cependant, en toute fin de gamétogenèse, un faisceau convergent de paramètres physiologiques montre que le flux d'assimilation baisse fortement malgré un métabolisme exacerbé par l'élévation de température et la gamétogenèse. On confirme qu'à 19°C, cette baisse de l'efficacité d'assimilation est maximum, en association avec une baisse d'activité des enzymes digestives et une réduction possible de la prise alimentaire (qui reste à confirmer).

Cette situation engendre donc en période estivale, et à partir de 19°C, un bilan énergétique négatif, qui est généralement associé aux mortalités. Par contre, des mortalités surviennent parfois quand le bilan énergétique est encore positif. Le seuil critique d'énergie minimum doit donc encore être précisé au regard du coût de la reproduction. Ce déficit pour l'instant n'explique pas tout et une combinaison avec d'autres paramètres semble parfois nécessaire.

- **L'effet de l'émersion en été combiné à la proximité du sédiment** : la période de température de 19°C de l'eau de mer correspond aussi à de fortes températures de l'air en été qui affectent les huîtres pendant la marée basse. Leur température peut excéder alors les 30°C. Des études sur la composition ionique de l'hémolymphe des huîtres montrent alors une forte accélération des processus de maintien du pH cellulaire qui a tendance à baisser par dissolution du CO<sub>2</sub> respiratoire dans leur hémolymphe (sang). Si les huîtres semblent cependant tout à fait capables de faire cette régulation, malgré la température et l'émersion, des perturbations de cette régulation sont observées quand elles sont proches du sédiment. L'absence de régulation du pH cellulaire pourrait être fatale pour la survie cellulaire.

- **Les bactéries pathogènes opportunistes** : parmi les autres phénomènes associés à la température de 19°C, on trouve globalement des conditions optimales de développement des deux grands groupes de *Vibrios*, souvent associés aux mortalités estivales à partir de cette température.
- **La décomposition dans le sédiment** : de même, à partir de ce seuil thermique, on observe le maximum d'activité des bactéries associées à la reminéralisation anaérobie de la matière organique sédimentaire et qui produisent des composés comme l'H<sub>2</sub>S et l'ammonium.

En conclusion, la conjonction à partir de 19°C d'huîtres en situation de limite énergétique avec la prolifération de *Vibrios* parfois pathogènes et celle de bactéries produisant dans le sédiment des composés pouvant être parfois toxiques est actuellement à l'étude, et paraît une hypothèse plausible.

## **Le déséquilibre énergétique associé à la reproduction et à la température a-t-il des conséquences pour l'immunité des huîtres ?**

Si la reproduction affecte le bilan énergétique quand la température monte, on observe aussi qu'elle affecte fortement le nombre d'hémocytes circulant. La comparaison d'huîtres triploïdes et diploïdes sur le terrain confirme cette observation puisque les huîtres triploïdes ont des paramètres hématocytaires nettement supérieurs à ceux des huîtres diploïdes pendant la période de reproduction. Par ailleurs, leur activité de défense semble réduite (par exemple la phagocytose). L'hypothèse avancée serait que les hémocytes n'auraient pas seulement un rôle de défense, mais aussi un rôle de transport. Ils seraient ainsi très mobilisés pendant la reproduction par le transport des nutriments pour la gamétogenèse (ceci reste à valider). Ce phénomène est d'autant plus accentué que la nourriture est abondante. En effet, il en résulte alors un effort de reproduction plus important. *A contrario*, l'activité de défense des hémocytes augmente à nouveau généralement après la ponte pendant l'été. Enfin, le risque de mortalités paraît s'éloigner quand la ponte s'est produite.

Néanmoins, même si l'affaiblissement de l'état énergétique et/ou la reproduction contribuent à la diminution des paramètres hématocytaires, les travaux montrent que d'autres facteurs environnementaux tels que la température, la présence de pathogènes, de polluants, et la quantité et qualité de la ressource trophique agissent aussi directement ou indirectement sur les paramètres hématocytaires en plus de l'impact de la reproduction.

En conclusion : de fortes interactions existent entre la fonction hématocytaire et le cycle reproducteur des huîtres. Cependant tout le système de défense ne résulte pas uniquement des activités des hémocytes. Aussi, d'autres travaux en biologie moléculaire ont été engagés pour analyser plus globalement la réponse immunitaire des huîtres aux infections. Les premiers résultats devraient se développer à partir de 2005, car ce domaine de recherche est encore très peu couvert pour les huîtres.

## Quels sont les effets des stress environnementaux et/ou contaminations ?

Les conditions de température au dessus de 19°C et une intensité forte de reproduction ne sont pas suffisantes pour observer des mortalités. Un stress paraît nécessaire comme nous l'avons montré les années antérieures. Deux stress font l'objet d'études ciblées : le sédiment et les herbicides.

**Effet du sédiment** : mis en évidence à Marennes, puis à Auray, dans deux systèmes vaseux, cet effet existe aussi en eau profonde en Baie de Quiberon et a été démontré cette année en Baie des Veys (deux systèmes sablon-vaseux). Il affecte la survie des huîtres placées à 15cm du sédiment par rapport à 70cm, ou à plat sur le sédiment. Il se traduit pas une réduction du métabolisme de l'huître, une perte de biomasse, un blocage de la régulation du pH cellulaire. Il constitue un stress pouvant provoquer des pontes totales ou partielles.

En 2004, les analyses montrent encore la coïncidence entre la transformation intense de la matière organique accumulée dans ou sur le sédiment, la température critique et la période de risque majeur pendant laquelle les valeurs d'H<sub>2</sub>S ou d'NH<sub>4</sub><sup>+</sup> rencontrées peuvent varier d'un facteur 100 d'un site à l'autre. Les maxima suivent la température de 19°C et la progression thermique sud-nord (Marennes, Auray, Baie des Veys) et estran-eau profonde (Auray, Quiberon). En Baie des Veys on montre que la présence de bio-dépôts (excrétion des huîtres) contribue aussi à cette variabilité entre le dessous des tables et hors des tables. En 2004, les mesures de flux de ces substances vers la surface ont été faibles. Depuis 2 ans, les apports annuels des rivières ont été en dessous de la moyenne corrélativement à une baisse des mortalités. Une partie au moins de l'effet constaté à grande échelle des apports d'eau douce, sur l'intensité des mortalités, serait sans doute à imputer aux apports d'engrais et de matière organique qui en résultent. Ces apports terrestres peuvent en effet contribuer, soit directement à augmenter le stock sédimentaire de matière organique, soit indirectement, *via* l'apport d'engrais, à augmenter la production de micro-algues, la nutrition des huîtres, l'effort de reproduction et la production associée d'excréments.

**Les effets des herbicides** : les concentrations d'herbicides les plus élevées sur le bassin de Marennes Oléron sont observables ponctuellement dans les eaux mi-juin en 2003 et 2004 à Mus de Loup. Ces concentrations notamment très élevées en glyphosate en 2004, permettent de maintenir la question de la toxicité ponctuelle de ces composés dans le bassin de Marennes. En Baie des Veys, comme à Marennes, les modèles de dispersion des eaux douces permettent d'estimer les dilutions des apports fluviaux au niveau des parcs. A ce jour, les résultats semblent montrer une forte dilution, ce qui tendrait à exclure un effet aigu de longue durée des composés toxiques des eaux douces. Par contre, les herbicides présents dans les eaux au moment de la gamétogenèse, constituent néanmoins une des sources de stress capables d'interagir sur l'affaiblissement des huîtres les semaines précédant les mortalités. Ainsi, séparément, l'hypoxie ou le mélange d'herbicides (aux concentrations du milieu naturel) ont des effets limités. Par contre, la combinaison de conditions hypoxiques et du mélange d'herbicides augmente le stress et perturbe le système immunitaire. Cette situation de stress demande, de la part des huîtres, un effort d'adaptation supplémentaire dont on cherche à évaluer le coût et qui pourrait entrer en compétition avec l'énergie allouée pour la gamétogenèse.

## Les huîtres sélectionnées Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale sur l'estran. Pourquoi cette résistance ?

La survie estivale de *Crassostrea gigas* sur l'estran dépend fortement de ses caractéristiques génétiques. Cette observation a permis de réaliser une sélection divergente sur ce caractère et d'obtenir des familles qualifiées Résistantes (R) et Sensibles (S) à la mortalité estivale. Ces familles répertoriées constituent un matériel de choix pour répondre à la question : « Pourquoi les



"R" survivent-elles plus que les "S" ? » et ainsi permettre de rechercher les bases d'une meilleure survie estivale. Les mesures effectuées sur ces familles montrent que la gamétogenèse des huîtres "S" est généralement plus importante que celle des "R" et que les "S" réalisent des pontes partielles en opposition à la ponte totale des "R". Aucune conséquence significative n'a été enregistrée sur le bilan énergétique de l'animal réalisé à partir des stocks d'énergie disponibles. Cependant, les flux d'énergie apparaissent gérés différemment entre "R" et "S" durant cette période de gamétogenèse active (printemps-été).

Ainsi, des groupes de gènes différentiellement régulés entre les "R" et "S" et qui sont principalement impliqués dans le métabolisme énergétique suggéreraient une capacité de réponse à la demande énergétique et à la disponibilité trophique du milieu, supérieure pour les "R" comparées aux "S" qui ne réagissent pas. Certains paramètres des cellules hématocytaires, impliquées dans la défense, apparaissent significativement différents entre "R" et "S", surtout en condition stressante, mais leur relation avec un meilleur système immunitaire apparaît complexe. L'explication d'une meilleure survie due à une différence d'intensité de reproduction ou du statut énergétique ou par une amélioration des paramètres hématocytaires n'est donc vraisemblablement que partielle. Par contre, ces différences intrinsèques, observées entre les huîtres "R" et "S", pourraient les « placer » dans un état physiologique différent et faire que les huîtres "R" et "S" ne seraient pas égales face à un stress en période printemps-été. Des résultats tendent à montrer que les huîtres "R" seraient capables de s'adapter aux variations stressantes de l'environnement pour ainsi « privilégier la survie » alors que les "S" ne moduleraient pas forcément leur physiologie (reproduction, gestion d'énergie...) face à un stress. Ces travaux moléculaires vont s'amplifier dans les années à venir pour mieux cerner, grâce à ce modèle biologique, les caractères hautement corrélés au caractère sélectionné résistance/sensibilité, et les gènes associés qui constituent peut être la clé de la résistance des huîtres "R".

## **Qui sont les pathogènes candidats ? Faut-il toujours un pathogène ? Comment les pathogènes arrivent-ils à infecter les huîtres (effet hôte, effet virulence et effet environnement) ?**

**Qui sont les pathogènes candidats ?** : l'examen des huîtres en cours de mortalités en période estivale par différentes techniques (histologie, bactériologie, biologie moléculaire) indique la présence d'agents pathogènes. Ainsi des souches de bactéries pathogènes du genre *Vibrio* (*V. aestuarianus* et *V. splendidus*) pathogènes sont isolées dans au moins 40% des cas. Par ailleurs, l'herpès virus OsHV-1 est fréquemment retrouvé chez des huîtres de moins d'un an présentant des mortalités lors de montées de température au cours de la période estivale. Cependant, un même et unique pathogène n'est pas systématiquement détecté lors de phénomènes de mortalités estivales et les infections observées restent, de plus, limitées dans le temps et dans l'espace.

**Faut-il toujours un pathogène ?** : dans un certain nombre de cas, aucun pathogène n'a pu être mis en évidence. En considérant que cette absence de détection ne correspond pas à une limite technique, ceci laisse penser que l'hypothèse d'une mort physiologique engendrée par le déséquilibre énergétique et/ou cellulaire ne peut être rejetée. Des travaux complémentaires sont en cours sur le plan moléculaire tant au niveau physiologique qu'au niveau de la détection des infections.

**Les facteurs environnementaux et les candidats** : les agents pathogènes identifiés se développent sous l'influence de facteurs environnementaux qui leurs sont favorables (matières organiques, température) et de la physiologie de l'animal, (affaiblissement des huîtres par la maturation et par des conditions stressantes). Ainsi, chez *V. aestuarianus* une métallo-protéase apparaît comme l'un des facteurs de virulence essentiels. Cette virulence, qui est réprimée *in vitro* en présence de sucres, pourrait être activée quand l'huître est à son niveau minimum de réserves en sucres. L'effet de différentes conditions d'environnement sur l'expression de la virulence des pathogènes est à l'étude, ainsi que leurs modalités d'infection. Des bactéries capables d'émettre une fluorescence ont été produites dans ce but.

**Modalités d'infection** : le rôle des gamètes (pontes) et du sédiment sur le développement d'infections bactériennes est en cours d'évaluation. En effet, il est possible que des conditions

particulières de l'environnement favorisent le développement de bactéries possédant un pouvoir pathogène important. Par exemple, certaines bactéries semblent capables d'utiliser les spermatozoïdes relargués au moment de pontes comme substrat.

Pour l'instant, plusieurs observations peuvent être rapprochées : des pontes partielles sont observées principalement chez les huîtres "S" très matures dans la nature comme en expérimentation. Ces pontes peuvent être déclenchées sous l'effet de stress, ce qui a été observé près du sédiment pour les "S". Un enrichissement en *vibrios* dans la cavité palléale a été observé après ces petites pontes. Enfin, les huîtres "S" présentent aussi alors une activation très significative de la réponse immunitaire au niveau de la production de radicaux libres à la même période (environ 15 jours avant la mortalité). Cet ensemble d'observations suggère un mécanisme d'infection associé aux pontes partielles qui reste à valider.

Dans les installations expérimentales sans sédiment des mortalités se déclenchent aussi parfois dans le créneau de risque thermique et trophique, pouvant laisser penser que les bactéries sont déjà présentes soit dans les huîtres, soit dans les installations et profitent de ces pontes partielles qui ont été enregistrées et affectent plus les huîtres "S" que les "R". L'utilisation d'antibiotiques en milieu contrôlé devrait permettre de mieux cerner l'implication d'agents bactériens dans certains phénomènes de mortalités.

Par ailleurs, des connaissances importantes ont été acquises à partir du séquençage du génome de bactéries associées à des épisodes de mortalités chez l'huître. Ces études montrent que ces bactéries possèdent de nombreux facteurs de virulence et une grande capacité à les échanger avec d'autres bactéries, ce qui est à rapprocher de leur apparente plasticité.

## Construction d'un schéma d'interactions

Dans une seconde partie du travail réalisé au cours de ces trois jours, l'ensemble de ces observations a été rassemblé pour construire un schéma traduisant toutes les interactions connues à ce jour entre l'huître, l'environnement et les pathogènes au cours des mortalités estivales. Le schéma d'interaction élaboré les années précédentes a été réactualisé et les différentes sorties de crise qui permettent d'empêcher ces interactions ont été passées en revue.

Elles concernent la prévision annuelle du risque et, en conséquence, les possibilités à court terme et à long terme de déclencher des moyens de lutte pour chaque secteur exploité.

## Sorties de crise

**Prévision du risque** : un des points importants confirmé en 2004 est la possibilité d'aller vers une prévision annuelle des mortalités en intensité et en calendrier, à partir des données météorologiques. Bien entendu, la fiabilité de cette prévision devra se conforter avec les années par l'extension des observations sur les différents sites.

**Sur le court terme** plusieurs possibilités zootechniques pour prévenir les mortalités pourraient alors être étudiées selon la typologie des sites :

- éloigner les poches du sédiment semble assez facile à mettre en œuvre,
- l'évitement de zones trop riches ou trop chaudes en été quand l'alerte est donnée demande des solutions visant à déplacer les cheptels qui sont évaluées en faisabilité technique et devront l'être au niveau économique,
- le maintien des huîtres en première année dans des environnements favorables aux survies de 1<sup>ère</sup> année comme sur certains sites du nord (stockage en zone "froide"), ou par un positionnement sur des parcs hauts, ou par bridage de pousse, réduit également les mortalités en 2<sup>ème</sup> année après transfert dans les sites du sud,
- des purges des cheptels à une taille de 10mm permettant d'éliminer les individus de type sensible, sont envisageables,
- la poursuite des travaux pour produire des huîtres triploïdes résistantes est prévue.

**Sur le long terme** pour assurer la durabilité des exploitations :

- la mise en place d'une structure collective de sélection des huîtres résistantes est aussi en réflexion avec la profession,
- de même, la définition de normes acceptables de la qualité des eaux douces pour la conchyliculture apparaît possible aujourd'hui, si elle peut être relayée dans le cadre de la mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau.

## Prospective

- 2005 sera une année de synthèse des travaux et de compléments d'analyses. Ce sera aussi une année de concertation pour réaliser à titre expérimental et avec la profession, une analyse de risque sur des bassins où celle-ci souhaiterait commencer à tester diverses options de sortie de crise.

- Pour le court terme, il faudra prévoir ensuite un plan de 3 ans pour réaliser ce transfert et le valider dans ses diverses solutions avec la profession.

- Sur le long terme, le centre de sélection pourrait se mettre en place sur une durée de 6 ans, avec une mise à disposition progressive d'huîtres résistantes. Enfin des discussions avec les services compétents de l'Etat peuvent être envisagées concernant la définition progressive de normes de qualité des eaux douces et des eaux marines acceptables pour réduire les risques de mortalités des huîtres.

# Ifremer - DRV/RA/Laboratoire Conchylicole de Normandie (LERN) Port-en-Bessin

Responsable laboratoire : Ronan LE GOFF  
Correspondant local MOREST : Michel ROPERT

Adresse : IFREMER Port En Bessin  
Av du Gal De Gaulle – BP 32  
14 520 PORT-EN-BESSIN

## Introduction

Depuis 2001, le Laboratoire Environnement-Ressources de Normandie (Port-en-Bessin) est en charge de la gestion et de la coordination de l'ensemble des actions de terrain sur le site atelier de la Baie des Veys. A ce titre, ses actions s'inscrivent dans les différentes Work Packages suivants :

WP2 : Caractérisation *in situ* des mortalités estivales  
WP4 : Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales  
WP 5 : Synergie MOREST-REPAMO-REMORA  
WP 6 : Caractérisation de l'environnement  
WP 7 : Gestion et communication.

## Résultats par WP, tâches et sous-tâches WP

La présentation des protocoles et des objectifs de chacune des actions détaillées ici a déjà fait l'objet d'une description détaillée dans le cadre des "fiches laboratoires" au début de l'année 2004. Ces éléments ne seront que rappelés pour laisser place aux détails des résultats.

### WP 2 - Caractérisation *in situ* des mortalités estivales

*Tâche 2.1.5 - Maintien des performances "R" et "S" au cours du second été en Baie des Veys*

#### Rappel

En Baie des Veys, seul le maintien des performances "R" avait été testé au cours de l'été 2002 (Degremont *et al.*, 2002 ; Boudry *et al.*, 2004; Degremont *et al.*, 2003).

En 2004, il a été proposé, sur le site de la Baie des Veys, de renouveler cette expérimentation sur les deux souches "R" et "S" issues de la génération produite en 2003 (G3) âgées de 18 mois. Quatre cheptels de références ont servi de support à cette action. Ils sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Détail descriptif des cheptels utilisés dans le cadre de la tâche 2.1.5. de MOREST au cours de l'été 2004 en baie des Veys.

<b>18 mois</b> (G2)	<b>"Résistante"</b> (R)	Ayant exprimé des mortalités au cours de l'été 2003 en BDV (M)	<b>G3R-03</b>	
		Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (IM)	<b>G3R-04</b>	
	<b>"Sensible"</b> (S)	Ayant exprimé des mortalités au cours de l'été 2003 en BDV (M)	<b>G3S-03</b>	
		Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (IM)	<b>G3S-04</b>	
	<b>TEMOIN</b>	Diploïdes d'origine professionnelle (issues de télécapture ayant connu l'été 2003 en BDV)		<b>Lot F (de SUMO)</b>

## Résultats

Les cheptels ont été mis en place sur le terrain en Baie des Veys au début du mois de mars 2004. La survie a été suivie lors de visites intermédiaires au cours de l'été dans le cadre de la Tâche 2.2.9.(DYNABDV). Le bilan final (Boudry, 2004), effectué au mois d'octobre, a permis d'obtenir les résultats suivants (Tableau 2) :

Tableau 2 : Mortalité cumulée des cheptels "R" et "S" suivis dans le cadre de la tâche 2.1.5. (Survie en seconde année) de MOREST 2004 en Baie des Veys.

Historique 2003	RESISTANTES		SENSIBLES		DIPLOÏDES
	Avec mortalités	Sans mortalités	Avec mortalités	Sans mortalités	Sans mortalités
CODIFICATION	G3R03	G3R04	G3S03	G3S04	Lot F (Sumo)
Mortalité cumulée (Mars-Octobre 2004)	18.71 %	12.05 %	38.64 %	31.48 %	7.12 %

Que ce soit chez les huîtres "R" ou "S", on observe une très légère amélioration de la survie en seconde année pour les lots préservés de toute mortalité en 1<sup>ère</sup> année (G3R04 & G3S04). La différence est cependant très faible et nous rappellerons que les années 2003 et 2004 se sont globalement caractérisées par des niveaux de mortalité très bas par comparaison à ceux observés au cours des premières années du programme (2001-2002). D'autre part, les résultats obtenus sur le cheptel diploïde témoin (Lot F de SUMO) posent question quand à la représentativité de ces résultats.

Dans ce contexte particulier (faibles mortalités en général, excellente survie du lot Témoin) l'analyse de ses résultats et leur conclusion se doivent d'être prudentes.

## Références Séminaires MOREST

Degrémont, L., P. Boudry, E. Bedier, M. Ropert et P. Soletchnik (2002). Caractérisation in situ des mortalités estivales. Bases génétiques: Seconde génération, (TOP-CARES) Suivi en 2002 des familles sélectionnées en 2001. - Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 nov 2001. <http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP2-1Topcares.pdf>

Boudry, P. (2004). Présentation - Le point sur la survie en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années. (Thème 5: Effet génétique "R" et "S"). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen [http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH5\\_presentation\\_PB.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH5_presentation_PB.pdf)

## *Tâche 2.2.1 - Analyse des mortalités en relation avec l'environnement sur 3 sites ateliers de Morest*

### **Rappel**

L'objectif initial de cette tâche était de préciser la relation mortalité et environnement (hydro, météo) sur les 3 sites atelier de Morest et sur la base des données acquises entre 2001 et 2003 (Soletchnik & Ropert, 2002).

### **Résultats**

En cours d'année, la réflexion menée au sein des trois laboratoires côtiers impliqués dans cette tâche a évolué. En s'appuyant sur les bases de données institutionnelles disponibles (REMORA et REPHY) la problématique des mortalités ostréicoles a été étudiée plus largement. Ce travail, qui a fait appel à de nombreux contributeurs, s'est concrétisé lors du séminaire annuel qui s'est tenu à Caen du 24 au 26 novembre 2004 au travers de l'ensemble du Thème 1 (Soletchnik *et al.*, 2004) qui se proposait d'aborder la "Caractérisation des mortalités et influence des facteurs hydrologiques et météorologiques". Une synthèse de l'ensemble des résultats de ce thème est proposé dans le rapport annuel 2004 des résultats Morest.

### **Références Séminaire MOREST**

- Soletchnik, P. et M. Ropert (2002). Première approche de comparaison entre les deux sites ostréicoles de la Baie des Veys (Normandie) et de Marennes-Oléron (Charentes-Maritimes) de 1997 à 2002. - Séminaire Morest 2002, Brest, 13-15 nov 2002.  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP6\\_Babela.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf1102/M02WP6_Babela.pdf)
- Soletchnik, P., M. Ropert, C. Garcia, P. G. Fleury, K. Grangeré, S. Lefebvre, J. Mazurié et E. Bédier (2004). Introduction (Thème 1: Caractérisation des mortalités et influence des facteurs hydro et météo: Aspects climatiques comparaison d'écosystèmes, modélisation.). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH1\\_01\\_Intro\\_PS.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH1_01_Intro_PS.pdf)

## *Tâche 2.2.5 - SUMO : Suivi de la dynamique spatio-temporelle des mortalités ostréicoles en Baie Des Veys*

### **Rappel**

Depuis l'origine du programme Morest, en étroite collaboration avec l'UMR PEMM de l'Université de Caen, un réseau de 6 stations de veille a été développé en Baie des Veys avec pour objectif de **SUIVRE** la dynamique spatiale et temporelle des **MORTALITÉS** (SUMO) à travers différents cheptels mis en élevage au mois de mars et suivis pendant tout leur cycle d'élevage (Ropert *et al.*, 2003).

## Résultats

La tendance pressentie en 2003, vis-à-vis d'une amélioration progressive de la survie depuis 2000-2001 s'est confirmée en 2004.

Tableau 3 : Détail des taux de mortalités cumulés sur les 6 points de suivi et les 3 populations étudiées dans le cadre de MOREST en Baie des Veys entre les mois de mai et octobre 2004, en référence aux chiffres observés sur les mêmes classes d'âge au cours des étés précédents

	Pop D	Pop E	Pop F
12/10/2004	NAISSAIN 2002	NAISSAIN 2002	NAISSAIN 2003
Date mise à l'eau	mars-02	mars-03	mars-04
Age en mois	35	35	25
Période considérée (mois)	4,9 mois		
POINT N° 1	4.0 %	6.3 %	7.8 %
POINT N° 2	14.3 %	16.1 %	8.7 %
POINT N° 3	4.0 %	8.8 %	6.8 %
POINT N° 4	13.7 %	26.6 %	6.8 %
POINT N° 5	5.6 %	10.9 %	8.4 %
POINT N° 6	6.0 %	1.5 %	6.8 %
<b>Moyenne</b>	<b>7.9 %</b>	<b>11.5 %</b>	<b>7.5 %</b>
Moyenne 2003	7.1% - (08/10/03)		8.9% (08/10/03)
Moyenne 2002	18.6% - (07/10/02)		15.6% (07/10/02)
Moyenne 2001	31.2% - (01/10/01)		44.2% (01/10/01)

Entre mai et octobre 2004 (5 mois), les pertes constatées sur les cheptels adultes (35 et 18 mois) ne dépassent pas 11,5%. Il s'agit des meilleurs résultats de survie observés en Baie des Veys depuis au moins 5 ans. La majeure partie de ces pertes ont été enregistrées à partir de la première quinzaine du mois d'août alors que la température des masses d'eau atteignait le seuil de 19°C et que les cheptels s'apprétaient à pondre (Figure 1) (Mazurié *et al.*, 2004; Ropert *et al.*, 2004)

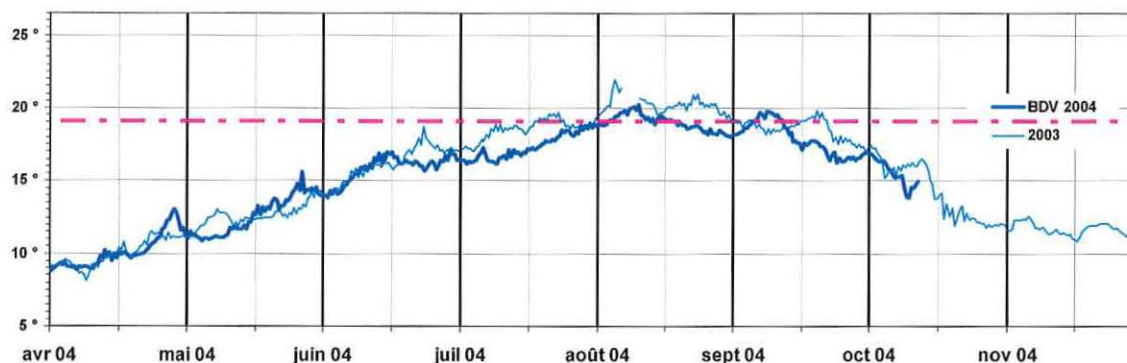


Figure 1 : Profils thermiques des masses d'eau en Baie des Veys (Température Moyenne à PM±1h) au cours des été 2004 (trait gras) et 2003 (trait fin).

## Références Séminaire MOREST

Mazurié, J., E. Bédier, P. G. Fleury, P. Soletchnik, M. Ropert, K. Costil, D. Maurer et I. Auby (2004). Le risque reproduction: Analyses à partir des observations de terrain. (Thème 1: Caractérisation des mortalités et influence des facteurs hydro et météo: Aspects climatiques comparaison d'écosystèmes, modélisation.). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH1\\_06\\_RisqRepro\\_JM.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH1_06_RisqRepro_JM.pdf)

Ropert, M., P. Soletchnik, E. Bédier, F. Rauflet, J. F. Bouget et P. Geairon (2004). Le risque thermique: Caractérisation des environnements thermique des 3 sites ateliers de Morest en lien avec les mortalités observées sur le terrain. (Thème 1: Caractérisation des mortalités et influence des facteurs hydro et météo: Aspects climatiques comparaison d'écosystèmes, modélisation.). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen [http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH1\\_05\\_RisqTherm\\_MR.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH1_05_RisqTherm_MR.pdf)

### Tâche 2.2.9 - Effet sédiment, interaction avec les mortalités (DYNABDV)

#### Rappel

Ce projet résulte directement de deux résultats obtenus dans Morest au cours des années précédentes. D'une part, sur le site atelier de Marennes-Oléron, l'hypothèse de l'existence d'un "stress environnemental aigu" est associée à la brutalité du signal de mortalité observé sur des élevages réalisés à 15 cm du sol. Parmi les explications possibles, la piste d'une toxicité d'origine chimique du sédiment associée à un changement qualitatif de régime alimentaire (phytoplancton – phytobenthos) semblent les plus pertinentes (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b). D'autre part, en Baie des Veys, la réactualisation de la cartographie sédimentaire de la zone conchylicole a permis de faire ressortir une forte tendance à l'envasement sur le secteur de Géfosse, le plus sensible du bassin en terme d'expression de la mortalité (Sylvand *et al.*, 2003). En 2004, il était proposé de tester, sur le secteur de Géfosse en Baie des Veys, l'éventuelle existence d'un "stress environnemental aigu" de même nature qu'en Charente-Maritime à travers le suivi de cheptels placés à 15 cm du sédiment comparés à un témoin situé à plus de 50 cm (pratique culturale normale pour ce secteur).

Les cheptels utilisés dans le cadre de cette expérimentation sont les mêmes que ceux utilisés dans le cadre de la tâche 2.1.5.(ci-dessus) auxquels sont adjoints des huîtres triploïdes (Tableau 4).

**Tableau 4** : Détail descriptif des cheptels utilisés dans le cadre de la tâche 2.2.9. de Morest au cours de l'été 2004 en baie des Veys.

<b>18 mois</b> (G2)	<b>"Résistante"</b> (R)	Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (04)	<b>G3R-04</b>
	<b>"Sensible"</b> (S)	Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (04)	<b>G3S-04</b>
	<b>"Triploïdes"</b> (T)	Indemnes de mortalités (abritées de la BDV au cours de l'été 2003) (04)	<b>G3T-04</b>
	<b>TEMOIN</b>	Diploïdes d'origine professionnelle (issues de télécaptage ayant connu l'été 2003 en BDV)	<b>Lot F (de SUMO)</b>



## Résultats

Les cheptels ont été mis en place sur le terrain en Baie des Veys au début du mois de mars 2004. la survie a été suivie lors de visites intermédiaires au cours de l'été dans le cadre de la Tâche 2.2.9.(DYNABDV). Le bilan final, effectué au mois de novembre a permis d'obtenir les résultats suivants (Tableau 5):

<i>Historique 2003</i>		RESISTANTES	SENSIBLES	TRIPLOÏDES	DIPLOÏDES
		<i>Sans Mortalités</i>	<i>Sans Mortalités</i>	<i>Sans Mortalités</i>	<i>Sans mortalités</i>
CODIFICATION		G3R04	G3S04	G3T04	Lot F (Sumo)
Conditions d'élevage	70 cm	12.05 %	31.48 %	48.84 %	7.12 %
	15 cm	40.96 % (×3.4)	56.56 % (×1.8)	59.51 % (×1.2)	24.73 % (×3.5)

Tableau 5 : Mortalités cumulées sur la période mars-novembre 2004 des cheptels placés à 70 cm et à 15 cm du sédiment. (Entre parenthèse : coefficient multiplicateur associé à un élevage à proximité du sédiment)

Quelque soit la nature du cheptel suivi, les mortalités observées à proximité du sédiment sont systématiquement plus fortes que celles observées à 70 cm. Cette augmentation représente un facteur 3,5 pour les cheptels de type "R" et "témoin diploïde" contre respectivement 1,8 et 1,2 pour les cheptels "S" et "Triploïdes". Cette différence est à mettre en relations avec la plus grande sensibilité apparente des lots "S" et "Triploïdes" placés à 70 cm.

Comme précisé précédemment (tache 2.1.5) les pertes très importantes constatées sur le lot "Triploïde" soulèvent des question quant à la représentativité de ce lot, et ces résultats sont donc pour l'instant à évaluer avec précaution (Boudry, 2004)..

## Références Séminaire MOREST

Boudry, P. (2004). Présentation - Le point sur la survie en 1ère et 2ème années. (Thème 5: Effet génétique "R" et "S"). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH5\\_presentation\\_PB.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH5_presentation_PB.pdf)

Soletchnik, P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMique des MORTalités estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003) - Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03\\_W12.htm](http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm)

## WP 4 : Sorties de crise

### Tâche 4.3.3 - Réduire les mortalités d'adultes : Transferts entre la Baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin

#### Rappel

Sur la base de l'hypothèse d'un lien entre la ressource trophique, l'effort de reproduction et l'ampleur des mortalités, il a été proposé, depuis 2002, d'écarter de la Baie des Veys des cheptels identifiés "à risque" pendant la période de forte disponibilité trophique (avril/juin) en les plaçant temporairement sur un site moins riche (St-Germain-sur-Ay, Côte Ouest Cotentin). Les résultats sont apparus très pertinents en terme de réduction de mortalité (diminution de 90 % par rapport à un témoin maintenu en Baie des Veys) (Ropert & Blin, 2003). Ils ont également permis de mettre en évidence l'existence d'une période à risque antérieure à celle d'expression de la mortalité, venant corroborer les observations réalisées à Marennes-Oléron dans le cadre de DYNAMOR (Soletchnik *et al.*, 2003a; Soletchnik *et al.*, 2003b).

Au cours de l'été 2003, l'expérimentation a été renouvelée dans le but d'évaluer l'impact de ces transferts en terme de croissance et de qualité. Les résultats, contre toute attente, ont pu mettre en évidence le caractère positif de ces transferts en terme de rendement biologique d'élevage (10 à 30 % de gain de poids de poche) et l'absence d'effet négatif en terme de croissance individuelle si les huîtres sont replacées en Baie des Veys avant le mois d'août (Ropert & Blin, 2003)

Au cours de l'été 2004, il était prévu de renouveler l'expérience en intégrant la dimension spatiale du problème posée par l'occupation sur estran des cheptels durant leur transfert. La solution proposée consistant à réaliser des permutations de cheptels entre les deux écosystèmes. Cette démarche avait un double objectif : 1) vérifier la reproductibilité des résultats ; 2) évaluer l'impact d'un séjour temporaire en Baie des Veys, durant la même période, pour les cheptels de la Côte ouest Cotentin.

#### Résultats

Cette permutation a été réalisée dès le début du bloom phytoplanctonique en Baie des Veys (mars). Les huîtres (15 poches) ont alors été transférées sur la Côte Ouest pendant qu'un lot de taille équivalente de Côte Ouest était déplacé vers la Baie des Veys. Au cours de cette période, le même nombre de poches a été maintenu sur les deux écosystèmes pour servir de Témoin. A la fin du mois de juillet (fin de la période à risque en 2002 et 2003), les deux cheptels testés ont été ramenés sur leur site d'élevage initial. Pendant toute la durée de l'expérimentation, un suivi de l'indice de condition (Indice de Walne & Mann, utilisé comme indicateur de la dynamique de reproduction) a été effectué selon une fréquence mensuelle à bimensuelle adaptée aux 2 écosystèmes.

Un bilan final (mortalité/croissance/rendement) a été effectué à la mi-novembre, lorsque le suivi de la mortalité en Baie des Veys (SUMO, Tâche 2.2.5) a confirmé la fin de l'expression de la mortalité estivale sur ce bassin.

Les résultats obtenus sur les lots "Témoins", maintenus dans leur écosystème respectif tout au long de l'expérimentation, sont conformes à ceux observés habituellement (REMORA/REMONOR). La Baie des Veys se distingue de la Côte Ouest Cotentin par de meilleurs résultats de rendement et des mortalités plus importantes. Cependant avec une mortalité cumulée inférieure à 9%, l'année 2004 en Baie des Veys se révèle comme une année exceptionnelle en terme de survie depuis au moins 1999 (Cf SUMO, Tâche 2.2.5.).

Sur le plan de la mortalité (Figure 2a), que ce soit pour le lot transféré de la Baie des Veys (22%) ou celui de la Côte Ouest (12 %), les niveaux de mortalité observés en fin d'expérimentation sont nettement significatifs en regard de ceux des "témoins". Pour les deux cheptels, cette mortalité s'est exprimée principalement durant la seconde phase des transferts, après retour dans leur écosystème respectif (en particulier pour le cheptel de la Baie des Veys pour lequel plus de 90 % de la mortalité totale s'exprime entre le mois d'août et d'octobre).

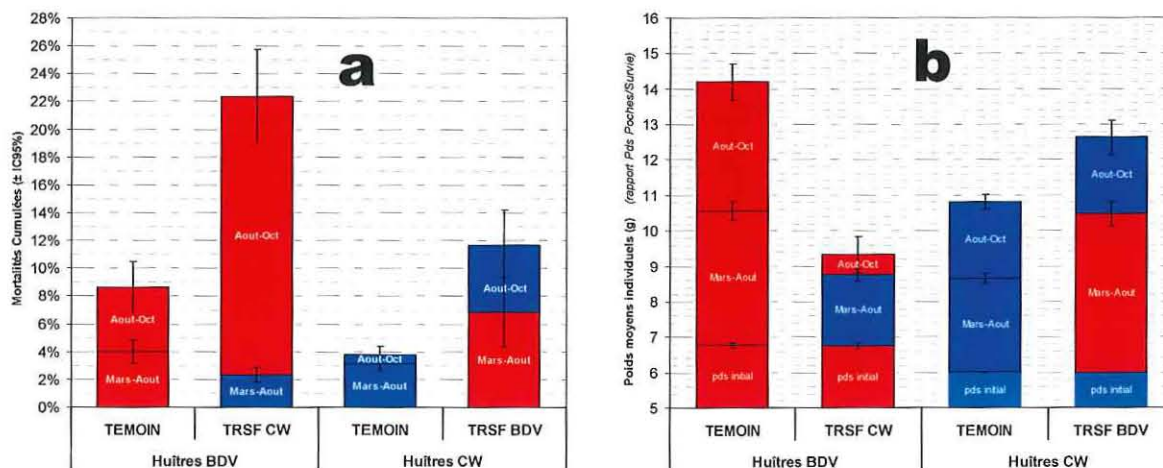


Figure 2 : Résultats détaillés des mortalités cumulées (a) et des rendements (b) observés lors des transferts réalisés au cours de l'été 2004

Cette mortalité, qui s'est exprimée après le retour en Baie des Veys, conduit naturellement à une perte de rendement pour les huîtres de la Baie des Veys (Figure 2b). Dans le même temps, pour le cheptel issu de la Côte Ouest, malgré l'induction d'une mortalité liée au séjour en Baie des Veys, on observe une amélioration du rendement en fin d'expérimentation témoignant, pour ces cheptels d'un bilan globalement positif du séjour temporaire en Baie des Veys. Ce résultat montre, pour ces cheptels, que le gain de croissance lié au séjour printanier des huîtres en Baie des Veys non seulement compense la mortalité induite, mais profite aux cheptels en améliorant les rendements.

## Discussion et interprétation

Les résultats obtenus en 2004 semblent en contradiction avec ceux observés depuis 2002 dans le cadre des expérimentations de même nature. Cependant, il importe de replacer ces résultats dans le contexte environnemental et zootechnique propre à l'année 2004:

En premier lieu, il s'agit d'une année pour laquelle les niveaux moyens de mortalité de référence observés sur le terrain sont faibles. En conséquence le facteur zootechnique, introduit par les transferts, s'est révélé de manière prépondérante par rapports aux facteurs habituels identifiés dans le modèle "mortalités estivales".

D'autre part, les analyses complémentaires effectuées sur les essais réalisés en 2002 et 2003 confirment l'importance de la dynamique maturation/ponte dans les résultats observés.

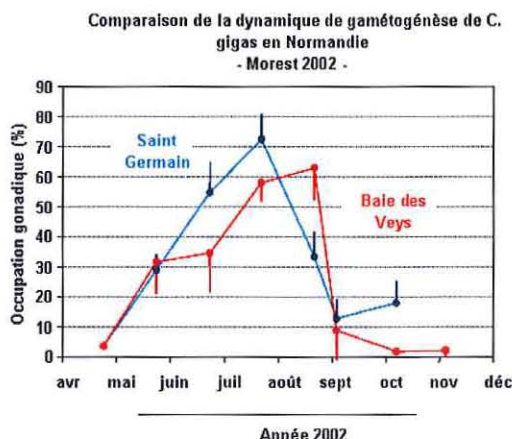


Figure 3 : Résultats d'histologie quantitative (pourcentage d'occupation gonadique) réalisés sur les cheptels utilisés dans le cadre des transferts effectués en 2002 entre St Germain sur Ay (Côte Ouest Cotentin) et la Baie des Veys.

Les expérimentations réalisées en 2002 avaient fait ressortir qu'en retardant l'introduction des cheptels issus de la Côte Ouest Cotentin vers la Baie des Veys au delà de la mi-juillet, la sensibilité des huîtres aux mortalités estivales (août/septembre) était sensiblement réduite; Les résultats avaient en outre permis de mettre en évidence une diminution des mortalités de l'ordre de 90% en référence à un témoin maintenu en Baie des Veys tout au long de la période de test.

A cette occasion, des prélèvements avaient été réalisés en vue d'évaluer la dynamique de reproduction caractérisant chaque bassin par histologie quantitative. Le principe repose sur la détermination du pourcentage d'occupation de la gonade au sein de la masse gonado-somatique de l'animal. Les résultats, illustrent le développement progressif de la gonade (gamétogénèse) et la ponte (Figure 3). Ils permettent en outre d'observer, au cours du mois de juin, une stabilisation de la maturation des huîtres de la Baie des Veys qui à partir de cette date vont accuser un retard par rapport aux cheptels de la côte Ouest. La ponte intervient à St-Germain à compter de la mi-juillet alors que ce n'est que fin août que cette même ponte intervient en Baie des Veys.

Dans la mesure où c'est à partir de la mi-juillet (i.e. après la ponte) que les cheptels réintroduits en Baie des Veys présentent une sensibilité moindre, on peut en déduire que c'est le caractère finalisé de la ponte qui explique cette insensibilité apparente des huîtres issues de la Côte Ouest. Ce résultat corrobore tout à fait l'hypothèse d'une sensibilité des cheptels exacerbée par les processus de maturation/ponte, à l'image des cheptels de la Baie des Veys qui vont exprimer la mortalité à la fin du mois d'août au moment de la ponte. Les huîtres de St-Germain introduites après la ponte n'ont plus de raison d'exprimer de sensibilité sur le terrain.

En 2004, dans le cadre des permutations de cheptels, la dynamique de la maturation n'a pu faire l'objet d'un suivi en histologie quantitative. Toutefois, des échantillons ont été régulièrement prélevés sur les 2 écosystèmes afin de pouvoir appréhender la dynamique reproductive à travers l'indice Walne & Mann qui, indépendamment de l'âge de l'animal, offre un indicateur à peu près équivalent au pourcentage d'occupation gonadique.

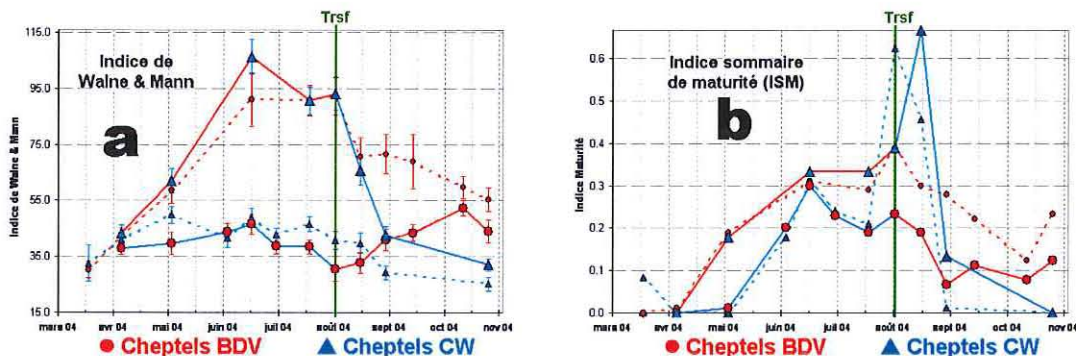


Figure 4 : Évolution de (a) l'Indice de Walne & Mann et de (b) l'indice sommaire de maturité (ISM) pour les 2 cheptels utilisés dans le cadre des transferts 2004. (Bleu : Cheptels Côte Ouest (lot CW) ; Rouge : Cheptels Baie des Veys (Lot BDV); Trait discontinu : "Témoins" ; Trait continu, "lots transférés")

Les résultats (Figure 4) montrent que les cheptels placés en Baie des Veys pendant la période de transfert (témoin et lot CW transféré entre mars et août) présentent une dynamique de maturation plus importante comparée aux cheptels placés sur la Côte Ouest Cotentin (Témoin et Lot BDV transféré). La chute de l'indice de Walne & Mann durant le mois d'août suggère que la ponte a eu lieu après le retour des cheptels sur leur bassin d'origine. Pour les deux cheptels, cette ponte "post-transfert" s'accompagne d'une mortalité significative vis à vis des "témoins" en place (Figure 4a). Sur la côte Ouest, l'effort de maturation développé par l'huître est moindre (Figure 4a). L'indice sommaire de maturité "ISM" (état visuel de maturation, Figure 4b) permet une meilleure perception de la cinétique de maturation sur ce bassin. La chute de l'ISM au cours du mois d'août montre que pour ce bassin aussi la ponte a lieu au mois d'août, soit avec environ 1 mois de retard comparée aux années 2002 et 2003 (Figure 3) (Ropert & Blin, 2003).

Cette particularité est importante à prendre en considération dans l'analyse des résultats 2004. En effet, pour le bassin de la Côte Ouest, cette année présente un caractère atypique par rapport aux précédentes du fait du retard temporel de la ponte. Contrairement aux années précédentes, les cheptels écartés de la baie des Veys entre mars et août ont donc été rapatriés en Baie des Veys juste avant la ponte, au moment où la demande énergétique pour l'animal est la plus forte (sensibilité maximum). A ce stade de maturation, le facteur zootechnique lié au transfert lui-même est très certainement à l'origine des pertes constatées juste après les transferts.

En conclusion, il ressort de cette nouvelle année de travail la nécessité absolue de lier étroitement la zootechnie des transferts à un suivi très étroit de la dynamique de maturation sur le site d'accueil. Cette précaution est indispensable pour évaluer le risque associé au retour des cheptels sur leurs sites d'origine. Le facteur de risque principal étant à rattacher à la ponte, la date de retour des cheptels ne doit être définie qu'une fois que la ponte a été clairement identifiée sur le site d'accueil.

## Références Séminaire MOREST

Ropert, M. et J.L. Blin (2003). Transferts de cheptels entre la Baie des Veys et la Côte Ouest Cotentin - Tâche 4.4.1 "réduire l'intensité de la reproduction pendant la phase critique" du WP4. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle.  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03\\_WP4\\_transferts.PDF](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP4_transferts.PDF)

Soletchnik, P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003). Etude pluridisciplinaire de la DYNAMIQUE des MORTALITÉS estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron (DYNAMOR-2003a) - Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03\\_W12.htm](http://w3.ifremer.fr/morest/pages/M03_W12.htm)  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03\\_WP2\\_Dynamorconcl.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP2_Dynamorconcl.pdf)

Soletchnik, P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.

## Tâche 4.5 - Veille et alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques

### Rappel

Les travaux et suivis de terrain des 3 dernières années (Ropert *et al.*, 2003 ; Soletchnik *et al.*, 2003; Soletchnik & Ropert, 2002 ; Misko, 2003; Misko *et al.*, 2003) mettent en évidence le caractère déterminant de la dynamique thermique et des apports d'eau douce dans les processus de mortalités estivales.

Tout au long de l'année 2004, la température a été mesurée en continu sur les trois sites ateliers au moyen de sondes automatiques. Comme les années précédentes, c'est le paramètre "Température moyenne des masses d'eau ( $\pm 1$  h autour de la Pleine Mer)" qui a été retenu. A chaque mise à jour des données, les résultats ont fait l'objet d'une diffusion à l'ensemble des partenaires du programme.

### Résultats

#### 1) Température

A l'échelle saisonnière, les variations thermiques des 3 sites ateliers présentent une grande synchronisation (Figure 5). Il est toutefois possible, sur de courtes périodes, d'observer des divergences ponctuelles entre les sites de la façade atlantique (BMO & Auray) et de la façade Manche (BDV). C'est en particulier le cas à 3 reprises au cours du printemps : 2<sup>nd</sup> quinzaine du mois de mars et du mois mai ainsi que la 1<sup>ère</sup> quinzaine du mois de juin. Au cours de ces périodes, les masses d'eau de la façade atlantique présentent des chutes de température pouvant atteindre 2°C alors que dans le même temps en Manche, la température est stable.

**Globalement l'évolution de la température des masses est à mettre en relation avec l'évolution saisonnière des températures atmosphériques dont les tendances sont homogènes au niveau national. Les différences ponctuelles observées entre les façades Manche et Atlantique sont quant à elles à mettre en relation avec des modifications au sein même des masses d'eau (remontées d'eau froide du plateau continental en Atlantique) dont l'effet ne va pas se faire ressentir en Manche.**

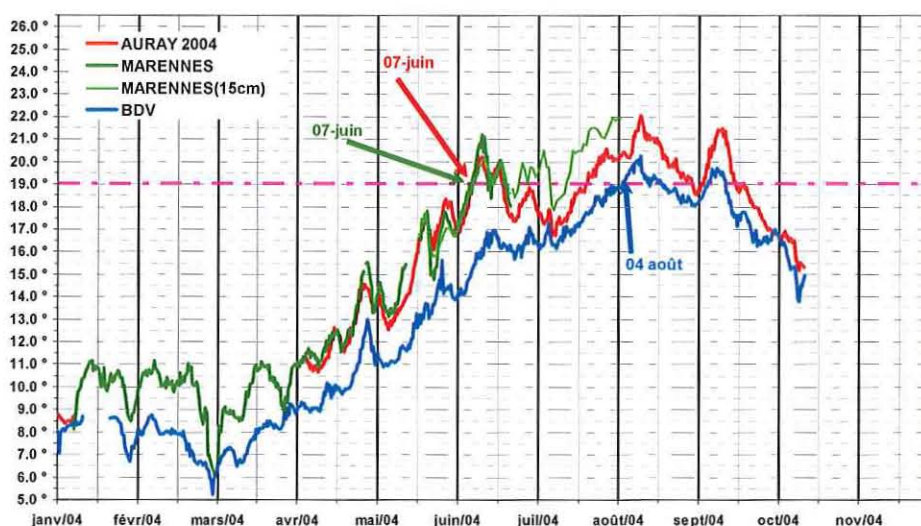


Figure 5 : profil thermique des 3 sites ateliers de MOREST en 2004 (Température moyenne des masses d'eau ( $\pm 1$  h PM)). Les flèches identifient les dates auxquelles les températures ont atteint le seuil des 19°C.

L'année 2004 a également été l'occasion de réaliser une synthèse pluriannuelle des profils thermiques dans le cadre du Thème 1 présentée lors du séminaire annuel (Ropert *et al.*, 2004).

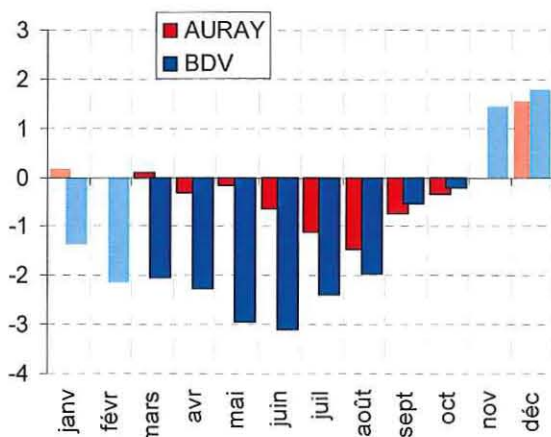


Figure 6 : Écarts thermiques moyens mensuels de la Baie des Veys et de la Rivière d'Auray en référence au bassin de Marennes-Oléron sur la période 2000-2004 (les mois hivernaux (nov-fév) sont à relativiser du fait de l'absence fréquente d'enregistrement sur cette période)

La Figure 6 présente, pour la période 2000 – 2004 les écarts thermiques moyens mensuels observés en référence au Bassin de Marennes-Oléron. Elle met en évidence les particularités des dynamiques thermiques de chaque site atelier.

Dès le début du printemps, la Baie des Veys se distingue de Marennes-Oléron par un écart thermique qui atteint 3°C au mois de juin. Cette écart se réduit ensuite pour devenir négligeable en octobre.

Sur la Rivière d'Auray, les écarts sont beaucoup plus faibles et n'apparaissent de manière significative qu'à partir du mois de juin pour atteindre environ 1,5°C en août.

la Baie des Veys se distingue par des masses d'eau plus froides. À partir du mois de juillet, le site de la rivière d'Auray commence à s'écarter de Marennes-Oléron pour se rapprocher du profil de la Baie des Veys et le rejoindre courant août.

Ces résultats font ressortir l'inertie thermique qui caractérise la période printanière sur les trois sites ateliers. Jusqu'au mois de juin, Marennes Oléron et la Rivière d'Auray présentent de grandes similitudes alors que

**Sur le plan thermique, la Rivière d'Auray se caractérise donc comme un site intermédiaire entre les deux extrêmes que sont Marennes-Oléron (le plus chaud) et Baie des Veys (le plus froid). La dynamique d'élévation de la température de la Rivière d'Auray est comparable à celle de Marennes-Oléron jusqu'en juin, puis s'en écarte, pour devenir similaire à celle de la Baie des Veys à partir du mois d'août.**

La mise en perspective de l'ensemble des caractéristiques thermiques des 3 sites ateliers de Morest avec les suivis des mortalités ostréicoles sur le terrain a permis de confirmer l'importance que la température revêt dans l'apparition du signal de mortalités (Tableau 6).

	BDV		Auray		BMO	
	T° début de mortalités	T° max Estivale	T° début de mortalités	T° max Estivale	T° début de mortalités	T° max Estivale
2000	18.9 °C	19.3 °C			19.5 °C	22.2 °C
2001	18.7 °C	20.2 °C			18.6 °C	23.5 °C
2002	18.2 °C	19.8 °C	18.6 °C	20.4 °C	19.9 °C	21.3 °C
2003	19.5 °C	21.7 °C	19.3 °C	24.2 °C	19.6 °C	25.8 °C
2004	18.8 °C	20.1 °C	18.9 °C	21.8 °C	18.9 °C	22.0 °C
moyenne	18.8 °C		18.9 °C		19.3 °C	

Tableau 6 : Récapitulatif, pour les 3 sites ateliers, des températures constatées au déclenchement des mortalités sur le terrain entre 2000 et 2004 (en regard des températures maximums observées au cours de l'été pour les mêmes sites ateliers)

Alors que les températures maximales atteintes sur les 3 sites ateliers présentent de grandes différences d'une année sur l'autre, il est remarquable de constater la grande homogénéité thermique qui existe au moment du constat des premiers signaux de mortalités ostréicoles. Quelque soit le site atelier considéré, le déclenchement des premières mortalités coïncide avec une température des masses d'eau comprise entre 18,8 °C (Baie des Veys) et 19,3°C (Marennes-Oléron) (Figure 5 & Tableau 6). Une telle similitude, indépendante des différences spatiales et temporelles des profils thermiques, confirme d'une part que la température n'a pas de rôle explicatif direct (la température ne tue pas les huîtres) mais qu'elle constitue un facteur prépondérant dans le déclenchement des mortalités dès lors que les masses d'eau atteignent une température proche de 19°C (effet seuil).

Deux hypothèses sont actuellement envisagées pour expliciter ce résultat. La première, reposant sur des travaux existants réalisés sur l'ormeau (*Haliotis*) (Hahn, 1994) suggère un effet cumulatif de la température au cours du cycle de maturation de l'huître. La seconde envisage un effet direct du seuil thermique de 19°C sur l'animal (au niveau intrinsèque : immunitaire, physiologique.etc) ou sur l'environnement (seuil de virulence pour des pathogènes...etc).

## 2) Pluviométrie

Jusqu'à présent, la Baie des Veys s'est révélée comme le seul des 3 écosystèmes pour lequel une corrélation directe entre l'influence de l'eau douce et les niveaux de mortalités pouvait être mise évidence (Ropert, 2001; Ropert & Kopp, 2000; Ropert *et al.*, 2003; Soletchnik *et al.*, 2004). La nature de cette relation est encore en cours d'étude, cependant depuis 1999 le bilan pluviométrique hivernal (entre octobre et mai) semble corrélé de manière positive avec les niveaux de mortalités de l'été suivant.

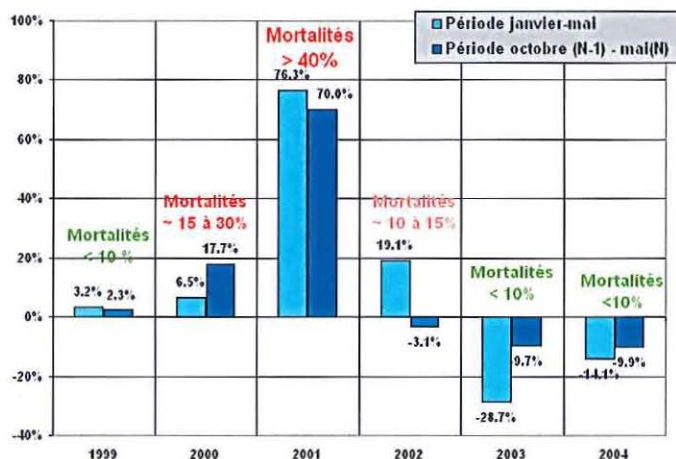


Figure 7 : Excédent pluviométrique hivernal (en référence au cumul moyen calculé sur 20 ans (1983-2003)) observé en Baie des Veys depuis 1999 (Sources : Météo-France).

Les années où le bilan pluviométrique hivernal fait ressortir un déficit hydrique hivernal se caractérise par des niveaux de mortalités faibles comparé aux années plus humides que la normale.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les possibilités d'anticiper le risque de mortalité à travers les suivis environnementaux ciblés sur la température des masses d'eau et la pluviométrie locale. Le but serait à terme de pouvoir évaluer le risque par anticipation afin d'orienter et/ou de préconiser des actions de nature zootechnique destinées à essayer d'en limiter les effets.

## Références Séminaire Morest

- Hahn, K. (1994). Gametogenic cycle of the Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*) during conditioning with effective accumulative temperature. *Aquaculture* **122** (2-3): 227-236.
- Ropert, M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.
- Soletchnik, P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, J.-L. Seugnet, S. Robert, S. Taillade et A. Doner (2003b). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV-RA/LCPC/2003-06. 36 p.
- Misko, P. (2003). Etude des apports terrifiènes en Baie des Veys (Volet environnement de Morest) Institut Universitaire Européen de la Mer /Ifremer-DEL-SRB. R.INT. DEL/SR/03. 10/ Brest. 78 p.
- Misko P., C. Bacher, J.F. Samain et M. Ropert (2003). Lien entre les apports des bassins versants en Baie des Veys et les mortalités estivales survenues entre 1993 et 2002. - Tâche 6.1.2. et 6.3.3. du WP6: Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle. [http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03\\_WP6\\_Misko.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP6_Misko.pdf)



## WP 6 - Environnement

### Sous-Tâche 6.2.5 - Première approche de la production de biodépôts en BDV

#### Rappel

Dans le contexte de la mise en évidence de l' "effet sédiment" (Bédier *et al.*, 2004) et de la tendance, propre à la Baie des Veys (Sylvand *et al.*, 2003), d'une augmentation lente et progressive de l'envasement de ce bassin, la question se pose du rôle joué par la biodéposition dans ces processus. Les travaux menés au début des années 1980 (Sornin, 1981) montrent que la biodéposition issue des biomasses conchylicoles en élevage peut modifier les propriétés et les caractéristiques du sédiment des zones d'élevage.

En 2004, il a été proposé en Baie des Veys, de fournir une première estimation *in situ* de la production de biodépôts sur la base des travaux de Sornin (1981). L'objectif principal consistait avant tout à valider une méthodologie adaptée qui permette de quantifier facilement cette activité.

#### Résultats



Figure 8 - Collecteurs à biodépôts (BDV 2004)

Le principe repose sur l'utilisation d'un collecteur placé durant 24 heures (2 cycles de marée) directement sur le terrain sous une poche ostréicole contenant une population de 50 huîtres. A proximité, et dans les mêmes conditions, un second collecteur accueillant une poche ostréicole contenant le même nombre de coquilles d'huîtres vides (50) est destiné à servir de témoin de sédimentation pendant la même période.

Par différence entre les deux collecteurs, il est possible d'estimer la quantité de biodépôts produits par les huîtres pendant les 24 heures de la mesure.

Au cours des 6 essais réalisés au cours de l'année 2004, les conditions climatiques et hydrodynamiques étaient comparables (vents de secteurs ouest à sud-ouest entre 5 et 8 m/s). Les mesures de juin, début août et fin octobre ont été réalisées durant des périodes sèches (pluviométrie cumulée des 5 jours précédents comprise entre 3 et 5 mm) alors que les mesures de fin juillet, fin août et début septembre l'ont été après une activité pluviométrique plus importante (entre 10 et 25 mm de pluie tombés au cours des 5 jours précédents)

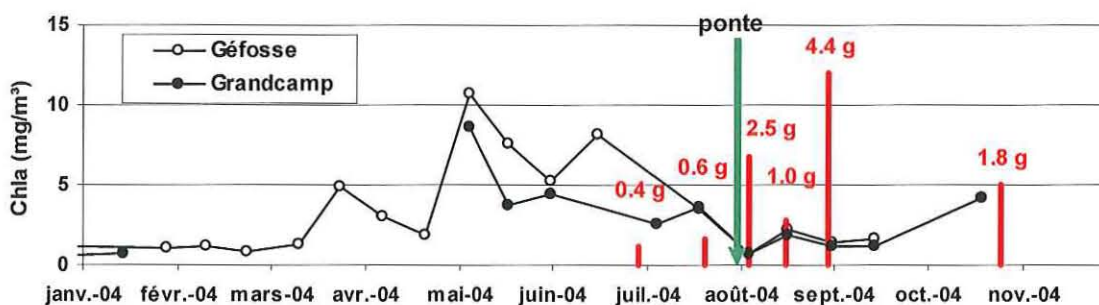


Figure 9 : périodes de mesure de la production des biodépôts (traits verticaux rouges) et quantités mesurées (g/ind./24h) en regard des niveaux de chlorophylle "a" (courbes noires) et de la période de ponte des cheptels en élevage au cours de l'été 2004.

Les résultats font ressortir une forte variabilité dans les quantités de biodépôts produits avant et après les premiers jours du mois d'août (Figure 9).

Les conditions climatiques décrites ci-dessus excluent une influence de l'hydrodynamisme local pour expliquer ces différences qui ne peuvent donc s'interpréter que par une modification comportementale de l'huître. L'activité de biodéposition est à relier directement à l'activité de filtration de l'animal. Nos résultats suggèrent donc qu'avant le 5 août, cette activité de filtration est faible en regard de celle observée par la suite.

Les observations de terrain ont permis d'identifier les premiers jours d'août comme la période de déclenchement de la ponte pour la plupart des cheptels élevés en Baie des Veys au cours de l'été 2004.

La synchronisation de l'augmentation brutale de l'activité de filtration intervenant simultanément au déclenchement de la ponte soulève des questions qui viennent corroborer les observations réalisées en laboratoire. En effet ces dernières mettent en évidence un déséquilibre physiologique auquel l'huître doit faire face en fin de période de maturation sexuelle (pouvant conduire à un bilan énergétique déficitaire). L'arrêt (ou la forte diminution) de l'activité de filtration, observée sur le terrain dans les jours précédents la ponte, se traduit, par voie de conséquence, par un arrêt (ou une forte diminution) de l'activité de nutrition. Une telle particularité en période de fin de maturation où la demande énergétique est maximum pourrait contribuer fortement à la fragilisation des cheptels, voire aux déséquilibres énergétiques constatés en milieu contrôlé.

Il ne s'agit là que d'une hypothèse qui devra cependant être étudiée plus finement au cours de l'année 2005.

## Références Séminaire MOREST

Bédier, E., P. G. Fleury, A. Langlade, J. Haure, A. Le Roux, M. Ropert, F. Rauflet et P. Soletchnik (2004). Le risque sédimentaire. (Thème 1: Caractérisation des mortalités et influence des facteurs hydro et météo: Aspects climatiques comparaison d'écosystèmes, modélisation.). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH1\\_Risq\\_Sedim\\_EB.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH1_Risq_Sedim_EB.pdf)

Sornin, J. M. (1981). Processus sédimentaires et biodéposition liés à différents modes de conchyliculture. Baie de Cancale, Anse de l'Aiguillon et Bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doct. 3<sup>ème</sup> cycle. Univ. de Nantes, Sédimentologie marine; 188 p.

Sylvand, B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Ropert (2003). Nouvelle cartographie sédimentaire de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en baie des Veys (Baie de Seine occidentale, Manche orientale). GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 14 p.

### *Sous-Tâche 6.2.6 - Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en BDV : Biocénoses associées et tendances évolutives*

#### **Rappel**

Cette tâche a été initiée au cours de l'année 2003 à travers la réactualisation de la couverture sédimentaire de la Baie des veys (Sylvand *et al.*, 2003). A l'occasion des campagnes d'échantillonnage du sédiment, des prélèvements ont été réalisés en vue d'analyser la composition des peuplements macrozoobenthiques associés à l'activité conchylicole de la Baie des Veys. Le traitement et l'analyse de ces échantillons étaient programmés en 2004.

## Résultats

L'ensemble des résultats ont fait l'objet de deux rapports (Sylvand *et al.*, 2004, 2003) disponibles au Laboratoire Environnement Ressource de Normandie. Seules les conclusions sont présentées dans ce rapport.

Tableau 7 : Comparaison des résultats de l'échantillonnage macrozoobenthique réalisé en Baie des Veys (station commune aux campagnes d'échantillonnage de 1992, 1997 et 2003)

STATION F 13	1992	1996	2003	biotope	remarque	tendance	caractère dominant
<i>Hamothoe lunulata</i>	25			marin			marin
<i>Cumopsis goodsiri</i>	25			marin			
<i>Urothoe grimaldii</i>	100			marin			
<i>Carcinus maenas</i>	75	20		ubiquiste		→	ubiquiste/marin
<i>Eteone longa</i>	25	20		ubiquiste		→	
<i>Nephtys hombergii</i>	50	30		ubiquiste		→	
<i>Eulalia sanguinea</i>	175	10		marin		→	
<i>Scoloplos arminger</i>	25	60		marin		→	
<i>Cerastoderma edule</i>		20		ubiquiste			ubiquiste/marin
<i>Crangon crangon</i>		10		ubiquiste			
<i>Phyllodoce laminosa</i>		10		marin			
<i>Venerupis pullastra</i>		30		marin			
<i>Hediste (Nereis) diversicolor</i>		20	30	estuarien			TT
<i>Abra alba</i>			10	marin			
<i>Capitella capitata</i>			10	ubiquiste	matière organique		
<i>Audouinia tentaculata</i>			40	marin	matière organique		
<i>Nemerte sp.</i>			10	?			
<i>Exogone gemmifera</i>	250		20	marin		→	
<i>Gammarus duebeni</i>	25		20	estuarien		→	marin
<i>Lumbrineris tetraura</i>	25		10	marin		→	
<i>Arenicola marina</i>	25	10	10	ubiquiste		→	
<i>Glycera convoluta</i>	25	10	160	ubiquiste		→	tous milieux
<i>Heteromastus filiformis</i>	100	60	40	estuarien		→	
<i>Lanice conchilega (panaches)</i>	3240	2700	2830	marin		→	
<i>Notomastus latericeus</i>	150	750	1090	marin	matière organique	→	
<i>Pholoë synphtalmica</i>	25	10	20	marin		→	
<i>Phyllodoce mucosa</i>	200	160	70	ubiquiste		→	
<i>Tubificoides benedeni</i>	125	120	50	estuarien		→	
N.Sp. déterminées	19	18	15			→	
TOTAL INDIVIDUS.m <sup>-2</sup>	4690	4050	4420			→	

espèces totales	27	
espèces disparaissant en 2003	8	29,6%
espèces nouvelles 1997 ou 2003	5	18,5%
espèces constantes	8	29,6%
espèces communes 1992 et 2003	3	11,1%
espèces fugaces 1997	4	14,8%

Rappelons que les résultats de la campagne 2003 d'échantillonnage de **sédiments** ont fait apparaître une indiscutable progression des teneurs en vases depuis 1998, lesquelles sont devenues, au centre du site étudié, coalescentes (Sylvand *et al.*, 2003).

Le site conchylicole de Grandcamp-Maisy se trouve maintenant cerné par des dépôts de sables fins, montrant ainsi un gradient hydrodynamique décroissant depuis l'extérieur des parcs vers le centre. Cette situation, déjà observée sur d'autres sites par Sornin (1981), était prévue dans le modèle graphique prédictif d'évolution de la baie (Sylvand, 1995), qui annonçait un enfermement de la zone conchylicole propice au développement de l'envasement central. De précédentes études topographiques locales associent certaines zones d'ensablement à une élévation du substrat (Ropert *et al.*, 2003).

Corrélativement, en ce qui concerne la **macrofaune benthique** associée, l'apparition de caractères estuariens se confirme au travers de l'espèce *Hediste diversicolor*, qui affectionne également de fortes teneurs en vases dans les sédiments. Les deux autres espèces estuariennes de substrat envasé, présentes sur le site dès 1992 mais absentes avant, se comporteraient comme des précurseurs des modifications environnementales locales, tandis que *H. diversicolor* serait une confirmation de ce caractère.

Le long du profil d'échantillonnage du sud (sous influence estuarienne) vers le nord (influence marine), les résultats montrent nettement une perturbation forte de la répartition des espèces macrozoobenthiques à mesure que cette ligne approche du centre de la zone conchylicole, et l'apparition, ou le renforcement d'effectifs, d'espèces inféodées à la matière organique pose le problème d'un enrichissement local en matière organique.

## Références Séminaire MOREST

Roport, M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Sornin, J. M. (1981). Processus sédimentaires et biodéposition liés à différents modes de conchyliculture. Baie de Cancale, Anse de l'Aiguillon et Bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doct. 3<sup>ème</sup> cycle. Univ. de Nantes, Sédimentologie marine; 188 p.

Sylvand, B. (1995). La Baie des Veys, 1972 - 1992: structure et évolution à long terme d'un écosystème benthique intertidal de substrat meuble sous influence estuarienne. Thèse de Doct. d'Etat, ès Sciences Naturelles. Univ. de Caen, Biologie; 409 p.

Sylvand, B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Roport (2004). Evolution récente du macrozoobenthose de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en Baie des Veys (Baie de seine occidentale, Manche orientale) GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 13 p.

Sylvand, B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Roport (2003). Nouvelle cartographie sédimentaire de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en baie des Veys (Baie de Seine occidentale, Manche orientale). GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 14 p.

### *Sous-Tâche 6.2.7 - Complément à la cartographie sédimentaire de 2003 en BDV : Bilan topographique et tendances évolutives*

#### **Rappel**

Depuis 1995 l'Ifremer de Port-en-Bessin est à l'initiative du suivi topographique de la zone conchylicole de la Baie des Veys. L'objectif est d'être en mesure de suivre et quantifier les exhaussements des fonds qui caractérisent ce bassin en vue 1) de pouvoir en tenir compte dans le cadre des réaménagements du schéma des structures et 2) d'améliorer les connaissances relatives au "risque sédimentaire" dans le cadre de MOREST en Baie des Veys.

#### **Résultats**

Quatre campagnes de levé topographique ont été réalisées depuis 1996 par le GRESARC (Univ. Caen). Ce travail consiste en un levé d'un semis d'environ 7 000 à 10 500 points selon les campagnes au moyen d'un DGPS RS4400 TRIMBLE de précision centimétrique sur une surface couvrant l'ensemble des parcs conchylicoles (~380 Ha). Le semis de points est ensuite utilisé pour développer un modèle numérique de terrain (MNT) d'une maille de 20m (interpolation par krigeage). Par superposition entre les MNT des différentes campagnes, il est alors possible d'évaluer quantitativement les bilans sédimentaires (érosion, accrétion) et les surfaces concernées.

Entre 1999 et 2000, à l'initiative de la profession, des extractions de sédiments (~60 000 m<sup>3</sup>) ont été réalisées. Le bilan sédimentaire réalisé en 2003 intègre donc cet aménagement.

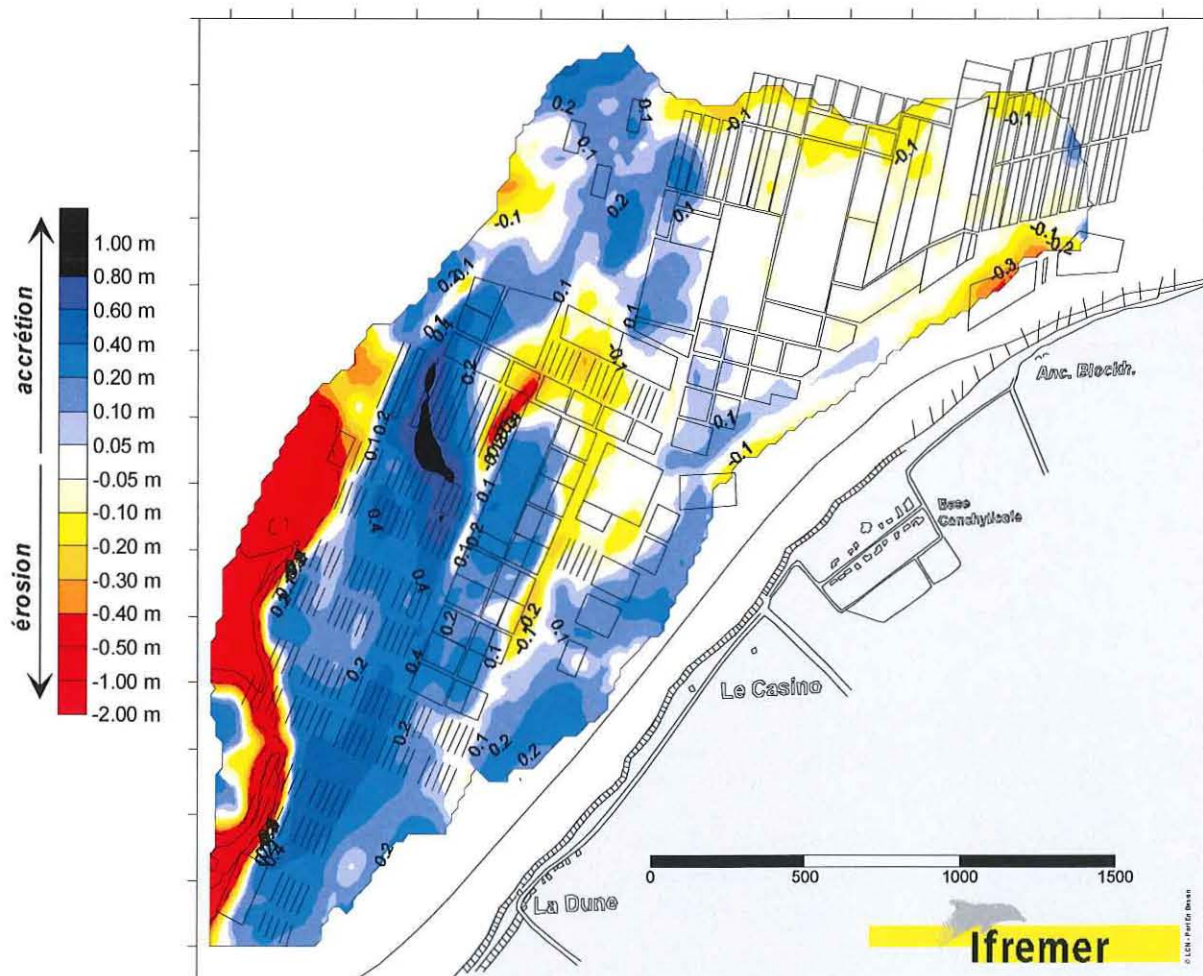


Figure 10 : Bilan sédimentaire obtenu par différence entre les levés topographiques réalisés en 1996 et 2003 par le GRESARC (Univ Caen) sur la zone conchylicole de la Baie des Veys.

Le bilan topographique réalisé entre 1995 et 2003 (Figure 10) est globalement positif de plus de 40 000 m<sup>3</sup>. **Le volume érodé** représente à lui seul 275 000 m<sup>3</sup>. Plus de 80 % du sédiment érodé (227 000 m<sup>3</sup>) l'a été par un déplacement du chenal d'Isigny qui longe le flanc Est des parcs. Cette érosion n'a pas de caractère pérenne dans la mesure où lorsque le chenal d'Isigny s'éloignera de la zone conchylicole, elle se comblera naturellement. Les 20% de sédiment érodé restant (48 000 m<sup>3</sup>) se répartissent entre la zone centrale (chantier d'extraction de sédiment en 1999 et 2000) et la zone nord (Grandcamp) qui repose sur un platier rocheux légèrement recouvert de sédiments très mobile. **Le phénomène d'accrétion** est quant à lui beaucoup plus préoccupant car il possède un caractère pérenne. Plus de **170 ha (75% de la surface)** sont concernés par cette élévation du sédiment. Globalement cet exhaussement progressif touche l'ensemble de la zone sud des parcs (Géfosse). Plus de **310 000 m<sup>3</sup>** de sable se sont accumulés entre 1996 et 2003 conduisant à une **élévation moyenne des fonds de l'ordre de 20 cm en 7 ans**. Le secteur le plus touché présente quant à lui une élévation supérieure à 1 m sur la même période. L'ensemble des résultats n'étant pas encore totalement traités, une synthèse plus exhaustive sera proposée courant 2005

*Sous-Tâche 6.3.1 - Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle des apports d'eau douce en Baie des Veys (Grangeré, 2004)*

**Rappel**

Cette tâche s'inscrit dans la suite du travail développé sur le lien entre les apports d'eau douce et les mortalités (Misko, 2003; Misko *et al.*, 2003). Son objectif, en s'appuyant le code de calcul Mars-2D était de simuler le devenir des apports des bassins versants en Baie des Veys (Denis & Lagadeuc, 2002), et leur impact potentiel pour la conchyliculture. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un stage de DEA co-encadré par DEL-EC (C. Bacher) et LER/N (P. Riou).

**Résultats (Grangeré, 2004)**

Afin d'étudier l'influence des apports provenant des bassins versants sur les concessions ostréicoles de la Baie des Veys, différentes simulations ont été réalisées à l'aide d'un modèle hydrodynamique en 2 Dimensions Horizontales (MARS 2D). Préalablement à son utilisation, une validation de ce modèle a été réalisée à partir de données de courants mesurées *in situ* à l'aide d'un courantomètre ADCP et de données de hauteur d'eau obtenues par l'intermédiaire du SHOM. Les résultats ont montré une assez bonne concordance entre les courants et hauteurs d'eau simulées par le modèle et les données

Par la suite, différents scénarii étudiant l'influence de variations des conditions aux limites (débit des rivières, vitesse et direction du vent) sur la répartition des masses d'eau en baie ont été réalisés. Les critères retenus sont :

Débits (Misko, 2003)	Vitesse de vent	Direction de vents
✓ Q50, débit moyen mensuel le plus probable	✓ 5 m.s <sup>-1</sup> , vent moyen en baie des Veys	✓ nord-ouest et sud-ouest, vents dominants en baie
✓ Q90, débit dépassé dans 10 % des cas	✓ 10 m.s <sup>-1</sup> , vent dépassé dans 10 % des cas	✓ nord-est, fort vent hivernal
✓ Crue	✓ 7 m.s <sup>-1</sup> , vent intermédiaire	
Ces 3 simulations ont été réalisées sans conditions de vent.	Ces différentes simulations ont été réalisées avec un débit des différentes rivières fixé au Q 90 et un vent d'orientation nord-ouest.	Pour ces simulations le débit a été fixé au Q 90 et la vitesse du vent à 7 m.s <sup>-1</sup>

Afin d'étudier l'influence respective des apports provenant des deux chenaux (Isigny et Carentan) sur les concessions ostréicoles de la baie, deux traceurs conservatifs ont été injectés dans chacun des chenaux.

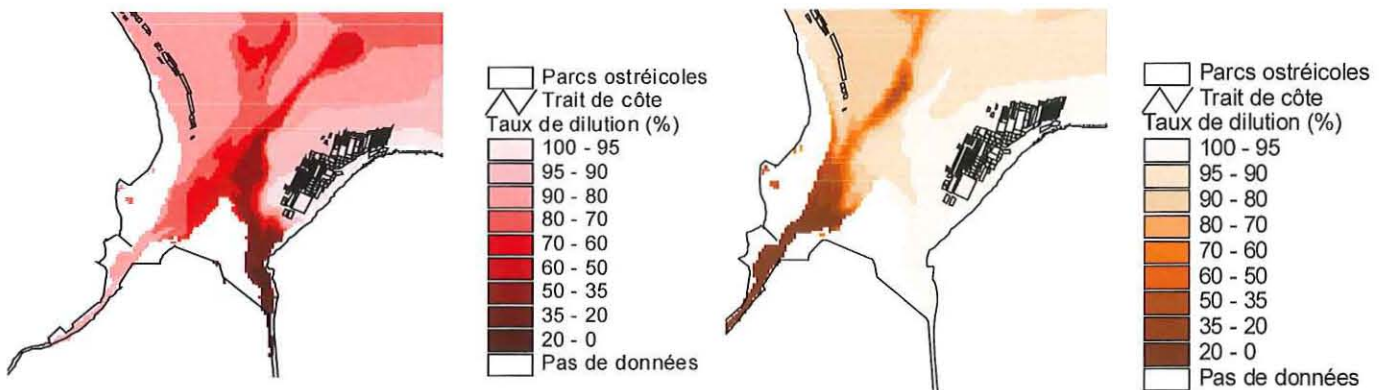


Figure 11 : Zone d'influence des panaches de rivière provenant (de gauche à droite) des chenaux d'Isigny et de Carentan en Baie des Veys (utilisation de traceurs conservatif) (conditions : Q50 sans vent).

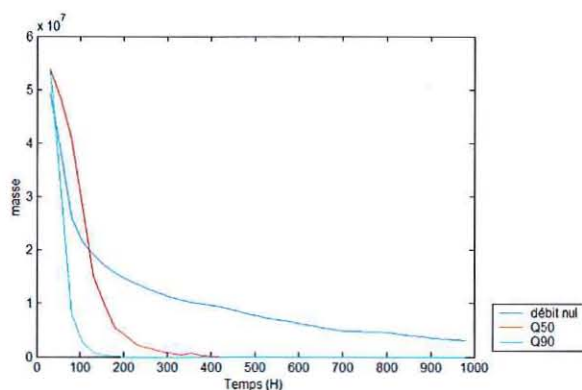
Les deux cartes présentées à la figure 1 illustrent les variations du taux de dilution des traceurs rejetés dans les chenaux. Les zones d'influence des rivières misent en évidence sur ces cartes sont représentatives des différentes simulations réalisées.

Les résultats montrent que les taux de dilution observés sur la zone des parcs (quel que soit le traceur) sont relativement forts, ce qui indique une influence directe assez faible des apports par les rivières sur ces concessions ostréicoles.

Dans la dernière partie de ce travail, une estimation du temps de résidence de l'ensemble de la baie a été réalisée pour différentes conditions de débit des rivières (débit nul, Q 50 et Q 90).

Pour cela, au début de la simulation un traceur a été introduit dans l'ensemble de la baie, de telle manière que la concentration initiale de celui-ci soit égale à  $1 \mu\text{g.m}^{-3}$  dans chacune des mailles. Au cours de la simulation, ce traceur est transporté suivant des processus d'advection-diffusion. La masse totale restant dans le système est calculée à chaque pas de temps en faisant la somme sur l'ensemble des mailles de la concentration du traceur multipliée par le volume d'eau.

Les résultats sont représentés sur la figure 2 qui illustre la variation au cours du temps de la masse totale de traceur restant dans le système, pour les différentes simulations.



Le temps de résidence moyen d'une particule dans la baie calculé à partir de la figure 2 est de 6,8 jours en absence de débit, de 4,6 jours pour un débit correspondant au Q 50 et de 2,5 jours pour un débit de Q 90. Ces résultats indiquent que globalement le temps de résidence des masses d'eau est assez faible dans la baie, et que l'augmentation du débit favorise le renouvellement des masses d'eau.

Figure 12 : Courbe de disparition de la masse au cours du temps pour un débit nul, un débit égal au Q50 et au Q90.

## Références Séminaire MOREST

Denis, V. et Y. Lagadeuc (2002). Suivi de la qualité des eaux de la Baie des Veys. Inventaire et analyse des données hydrologiques de la Baie des Veys et de son bassin versant. Partie 1: Données marines. Partie 2: Données " rivières " uniquement. Université de Caen - LBBM. Rapport Laboratoire biologie Biotechnologie Marines pour l'Agence de l'eau Seine-Normandie et le Minist. Aménagt. Territ. Environ. (MATE). 60 p.

Grangeré, K. (2004). Simulation de l'influence des apports des bassins versants sur les concessions ostréicoles de la Baie des Veys (Baie de Seine Occidentale). Rapp. DEA. Université de Liège, Modélisation de l'Environnement Marin; 64 p.

Misko, P. (2003). Etude des apports terrihènes en Baie des Veys (Volet environnement de Morest) Institut Universitaire Européen de la Mer / Ifremer-DEL-SRB. R.INT.DEL/SR/03.10/Brest. 78 p.

Misko, P., C. Bacher, J. F. Samain et M. Ropert (2003). Lien entre les apports des bassins versants en Baie des Veys et les mortalités estivales survenues entre 1993 et 2002. - Tâche 6.1.2. et 6.3.3. du WP6: Caractérisation de l'environnement. Séminaire Morest 2003, 26-27-28 novembre 2003. La Rochelle. [http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03\\_WP6\\_Misko.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf3/M03_WP6_Misko.pdf)

## WP7 - Gestion de données

### Tâche 7.1 - Gestion de données

#### Rappel

La contribution du LERN a cette tâche s'intègre dans un objectif à large échelle de conception, réalisation et administration d'un outil en réseau de gestion de données en vue de standardiser la saisie des données communes à plusieurs équipes et d'en faciliter les exploitations. Cette tâche représente une étape d'un projet plus général de "Système d'Information Aquacole" ou SIA, Morest offrant l'opportunité d'aborder la question de façon concrète. Les données communes ont été celles obtenues sur les lots mis en tests sur les différents sites ateliers (données de croissance, survie des lots et mesures physiologiques).

L'année 2004 devait permettre le test en direct des deux outils, base de données et module de saisie, lors des essais terrains, avec, dans la mesure du possible un effet rétroactif sur les données antérieures.

#### Résultats

En 2004, le transfert vers les labos côtiers d'une application Excel (MSAISIE, développée en Visual Basic) standardisant la saisie des données biologiques et permettant leur transfert et archivage vers une Base de Données Access (MOLLUSCQ) a pu être réalisé (Martin *et al.*, 2004)

Pour le LERN, il a permis la saisie, après validation de l'ensemble des données biologiques acquises sur le terrain en 2004 ainsi qu'une partie des données antérieures. Au total près de 45 000 mesures individuelles sont actuellement archivées sous MOLLUSCQ, en attente de leur future intégration dans Quadrigé<sup>2</sup>.

#### Références Séminaire MOREST

Martin, A. G., P. G. Fleury, M. Ropert, P. Soletchnik, F. Rauflet, A. Langlade, F. D'Amico, J.-C. Masson et G. Checinski (2004). Le risque de perdre les données. (La gestion des données de terrain: état des lieux.). Séminaire Morest 2004, 24-26 novembre 2004, Caen  
[http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04\\_TH1\\_11\\_Molluscq\\_AGM.pdf](http://w3.ifremer.fr/morest/pdf04/MO04_TH1_11_Molluscq_AGM.pdf)

## Bibliographie

Boudry, P., L. Degremont, E. Bedier et J. F. Samain (2004). Selective breeding to improve resistance against summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Results after 3 generations. *Journal of Shellfish Research* **23** (1): 281-282.

Degremont, L., P. Boudry, P. Soletchnik, E. Bedier, M. Ropert, A. Huvet, J. Moal et J. F. Samain (2003). Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. *Journal of Shellfish Research* **22** (1): 327.

Grangeré, K. (2004). Simulation de l'influence des apports des bassins versant sur les concessions ostréicoles de la Baie des Veys (Baie de Seine Occidentale). Rapp. DEA. Université de Liège, Modélisation de l'Environnement Marin; 64 p.

Ropert, M., C. Simonne, V. Hugonnet, E. Le Gagneur et J. Kopp (2003). Contribution du Laboratoire Conchylicole de Normandie au Défi Morest en 2002. Ifremer. DRV/RA/RST/LCN/2003-11. 65 p.

Sylvand, B., C. Marion, A. Lecouturier et M. Ropert (2004). Evolution récente du macrozoobenthose de la zone conchylicole de Grandcamp-Maisy en Baie des Veys (Baie de Seine occidentale, Manche orientale) GEMEL. Programme Morest WP6 - contrat 02 6 522 053. 13 p.



## Université de Caen - UMR/PE2M

---

Responsable : Michel Mathieu

Adresse :

Laboratoire Biologie et Biotechnologies Marines - Université de Caen  
14032-CAEN Cédex France

## Volet histologie de la reproduction

---

Responsable : K.Costil

### WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

#### Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités de R et S *versus* triplos

*Sous-tâche - 2.2.2 : **BERAY** : Suite du traitement des données et acquisition de données complémentaires sur la reproduction de "R" et "S" (naissain et huîtres de 2<sup>ème</sup> année) en Baie des Veys*

*et Sous-tâche - 2.2.7. **DYNAMAURAY** : Suivi intensif pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes-sédiment à Auray*

Il n'a pas été possible, en 2004, de comparer l'effort de reproduction de deux classes d'âge (naissain et « 18 mois » de pools "R" et "S") comme il était initialement prévu faute de naissain adéquat. Nous nous sommes donc focalisés sur les huîtres de 18 mois que nous avons étudiées non seulement en Baie des Veys (BDV) mais aussi à Auray, selon un plan d'échantillonnage comprenant non pas 4 mais 7 échantillons (Tableau I).

Dates d'étude	17 juin, 30 juin, 19 juillet, 2 août 16 août, 30 août, 26 septembre
Nombre d'huîtres par échantillon	20
Nombre total d'huîtres étudiées dans chaque site (BDV et Auray)	280 "R" et 280 "S"
Techniques utilisées	Biométrie + "histologie quantitative"

## Résultats

### Comparaison des deux écosystèmes.

Les meilleures performances de croissance (pondérale) des huîtres placées en BDV comparées à celles d'Auray sont confirmées en 2004 (Figure 1). En moyenne, le poids frais de chair atteint au maximum 8,24 g ( $\pm 3,49$ ) pour les "R" de la BDV le 16 août, *versus* 5,86 g ( $\pm 2,20$ ) pour les "R" d'Auray, le 2 août.

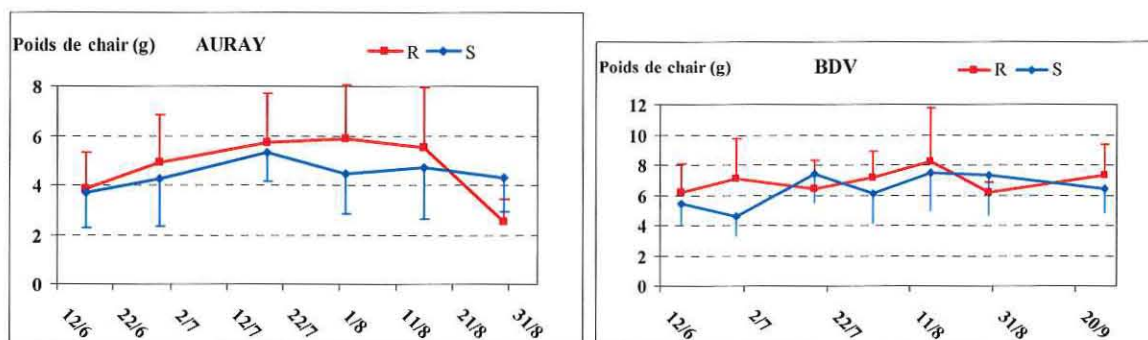


Figure 1. Poids de chair (en g) des huîtres R et S, en Baie des Veys et à Auray.

Du point de vue de la reproduction, la relative précocité des huîtres placées à Auray est également confirmée puisqu'à la mi-juin, la gonade occupe de l'ordre de 60% de la surface totale à Auray contre seulement 49 % en Baie des Veys (Figure 2). Cette précocité dans la maturation s'accompagne aussi par une ponte plus précoce à Auray puisque celle-ci intervient entre la mi-juillet et le début du mois d'août (S) ou au cours de la première quinzaine d'août (R) alors qu'elle survient dans la deuxième quinzaine d'août en Baie des Veys.

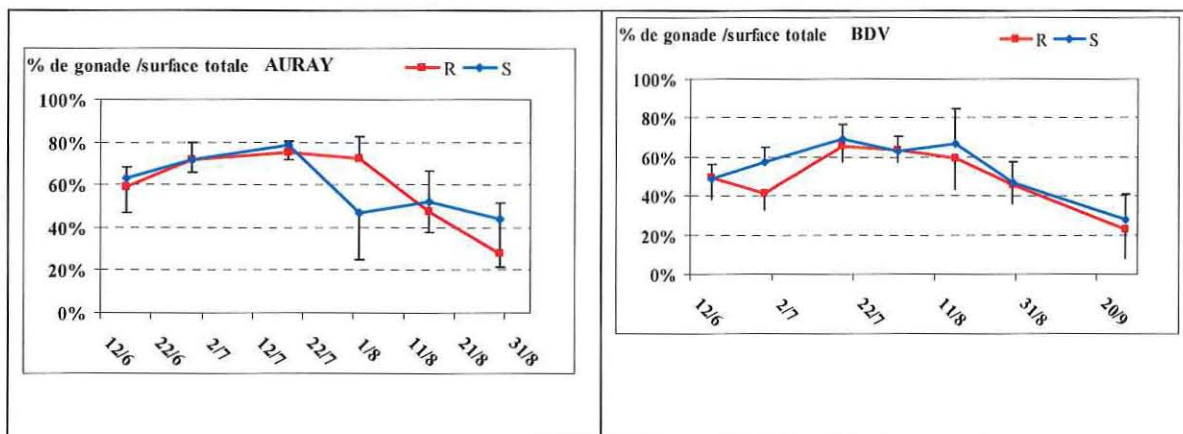


Figure 2. Proportion de gonade (en %) des pools d'huîtres "R" et "S" en Baie des Veys et à Auray.

## **Comparaison des huîtres "R" et "S" en Baie des Veys**

Les huîtres de la Baie des Veys ne présentent pas de différence significative entre les "R" et les "S", tant pour le poids des animaux que pour le pourcentage d'occupation par la gonade, à la seule exception du 30 juin 2004 (Figures 1 et 2). En effet, à cette date, les huîtres "R" se distinguent par un poids significativement plus lourd et, en revanche, un pourcentage de gonade plus faible. Il est difficile d'interpréter un tel résultat, d'autant que le poids des huîtres à la fin-juin se révèle inférieur par rapport à celui de la mi-juin. Il est donc possible que l'échantillonnage des huîtres "R" au 30 juin ne soit pas satisfaisant, malgré le soin apporté à cette étape de notre travail.

## **Comparaison des huîtres "R" et "S" à Auray**

La maturation des huîtres élevées à Auray ne diffère pas significativement en fonction du caractère "R" ou "S" et l'effort de reproduction de ces deux types est similaire (Figures 1 et 2). En revanche, le poids des animaux et la proportion de gonade s'avèrent significativement différents au début et à la fin du mois d'août, en période de ponte. En effet, les huîtres "R" pondent plus tardivement (en août) et plus "massivement" (passage de 72 % de gonade à 28 % en un mois) ; les huîtres "S" délaient plus précocement (avant le début du mois d'août) mais de façon plus progressive (passage de 79 % à 47 % puis 52 % en un mois).

## **Conclusions**

Pour les huîtres placées en Baie des Veys, la proportion de gonade a tendance à être plus importante chez les individus "S" mais de façon non significative en 2004, alors qu'en 2003, la surface gonadique (et la masse corporelle) des huîtres "S" étaient significativement supérieures à celles du pool "R" (sauf en septembre où les huîtres "R" conservaient davantage de gamètes résiduels).

A Auray en 2004, des différences significatives entre les "R" et les "S" sont enregistrées au moment de la ponte uniquement avec une régression de la surface gonadique plus précoce mais aussi moins marquée chez les "S" par rapport aux "R". Ce dernier résultat était une tendance en 2003 et un fait significatif en 2002 (Top Flop). En revanche, l'effort de reproduction supérieur pour les huîtres S observé en 2002 n'a pas été à nouveau observé en 2003 et 2004.

La différenciation du caractère "R" ou "S" apparaît donc s'exprimer différemment en fonction non seulement des écosystèmes mais aussi des années. Si l'hypothèse d'un effort de reproduction supérieur pour les huîtres sensibles ne peut être totalement écartée, il convient également de bien considérer la dynamique de la période de ponte (et/ou résorption) qui semble tout aussi cruciale pour la survie ou non des huîtres.

## Volet énergétique

---

Nom du Rédacteur Coordinateur de la WP : A. HUVET

Responsables de la Tâche : K. KELLNER, C. HEUDE (LBBM, UMR Phy Ecophy Mol Mar)

Cadre de l'étude : thèse de Mlle DUFOUR A.C., co-financée par la région Basse-Normandie et le SMEL.

### WP 3 – Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

#### Tâche 3.4 – Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

*Sous-tâches 3-4-1 - "R" et "S" gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18 mois)*

### Introduction

La possible implication du statut énergétique dans les phénomènes de mortalités estivales est envisagée, dans la mesure où les réserves en glycogène préalablement établies en période automnale (Berthelin *et al.*, 2000a, b), peuvent constituer un facteur limitant en période estivale alors que les animaux ont à faire face à l'émission des gamètes dans l'eau suivie de la réorganisation de la région gonadique. L'analyse de ce phénomène passe par une meilleure connaissance du métabolisme glucidique des cellules vésiculeuses, qui peuvent être appréhendés par des tests biologiques *in vitro* (mesure de l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses ou de l'incorporation dans le glycogène) ou par la mesure de l'expression de gènes marqueurs comme le SGLT (Huvet *et al.*, soumis ; Naimi, 2004), la Glycogène Synthétase et la Glycogène Phosphorylase (Huvet *et al.*, soumis), la PhosphoEnol-Pyruvate-Carboxykinase, la Pyruvate Kinase, l'Hexokinase et la Glucose-6-Phosphatase (Van Wormhoudt *et al.*, en préparation) ou d'activités enzymatiques. D'autre part, la période de mortalités estivales coïncide avec l'inversion du métabolisme global du tissu de réserve en fin de reproduction. Même si cette inversion fait appel à des mécanismes régulateurs stricts, le fait que l'on observe des différences de cycles entre les sites d'élevages implique toutefois un impact important des conditions environnementales sur cette régulation (effet de la température, de l'alimentation).

Pour ces différentes approches (*in vitro* et moléculaires), afin de travailler sur du matériel biologique caractérisé du point de vue des réserves et de la reproduction, des conditionnements trophiques opposés sont réalisés à 3 périodes clés du cycle énergétique : en début d'automne, en période de reprise du stockage de glycogène, au printemps, au moment de la mobilisation des réserves et enfin en début d'été, alors que les animaux sont matures et qu'ils ont épuisé leurs réserves. La structure pilote SYCAMAR du Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral (SMEL) de Blainville permet de maintenir des animaux dans des conditions parfaitement contrôlées (température, alimentation...). La réponse aux conditions trophiques à ces 3 périodes est mesurée sur des huîtres de 18 mois, "R" et "S".

Ces expérimentations sont menées de façon à répondre, au moins partiellement aux questions suivantes :

- 1) Quel est l'impact des conditions trophiques sur les inversions du métabolisme glucidique observées de façon saisonnière chez l'huître.
- 2) Si impact il y a, est-il le même aux 3 périodes étudiées ?
- 3) L'apport trophique agit-il (via une régulation interne) sur les transporteurs de glucose au sein de la cellule vésiculeuse (nombre, type et répartition de ces transporteurs) ou sur la cascade enzymatique qui conduit au stockage de glycogène
- 4) Quelles sont les protéines impliquées dans ces inversions métaboliques saisonnières ?

## Résultats

Les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, de 18 mois (ponte en mars 2003) conservées à la SATMAR, ont été placées en mars 2004 sur le site BDV (Géfosse) dont les paramètres abiotiques sont suivis.

Utilisation de deux lots :            Animaux R : 1400 individus  
    Animaux S : 1400 individus

Un premier conditionnement automnal a été réalisé pendant la période de restructuration du tissu de réserve et en tout début de gamétogenèse. Ce conditionnement d'un mois, du 12 octobre 2004 (To) au 15 novembre 2004 (Tf) consiste à placer les animaux à 2 niveaux d'alimentation (à jeun (-) et forte alimentation (+) à une température correspondant à la température moyenne sur estran à cette saison. Un lot d'animaux "R" et "S" restés sur estran sert de témoin non conditionné.

Pour ce conditionnement, un échantillonnage a été réalisé pour :

- suivre le déroulement de la gamétogenèse et la reconstitution du tissu de réserve chez ces animaux

- \* histologie quantitative

- dosage biochimique du glycogène dans les palpes et l'aire gonadique

- l'approche cellulaire des variations métaboliques de la mise en réserve

- \* Test de viabilité MTT

- \* Tests biologiques *in vitro* :

- Caractérisation de l'entrée du glucose dans les cellules de réserve

- Incorporation du glucose dans le glycogène

- suivre l'expression de gènes marqueurs du métabolisme du glycogène

Le traitement des échantillons est en cours.

## Bibliographie

**Berthelin C.**, Kellner K., Mathieu M., 2000a. Storage metabolism of the Pacific oyster (*Crassostrea Gigas*) in relation with summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 125 :359-369

**Berthelin, C.**, Kellner, K., Mathieu, M. 2000b. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2 : 136-145

**Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F. & Cunningham, C.** 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed as a result of summer mortality. *Gene.* 2004 8;343:211-20.

**Naimi, A.** (2004) Caractérisation des transporteurs de glucose et mesure de leur expression par PCR en temps réel chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Rapport de DEA, Université de Caen.* 30 p.

# Volet écotoxicologie

Responsable : Christophe LELONG

## Introduction

Dans le cadre de MOREST, un projet d'étude de stress environnemental a été menée en 2004 sur le site de Gêfosse en Baie des Veys (DynaBDV 2004) et portait sur la relation entre le sédiment et les mortalités observées avec comme piste envisagée, la variation de H<sub>2</sub>S et de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> d'origine sédimentaire.

L'expression différentielle de certains gènes de stress sur des individus des familles "R" et "S" disposés à deux hauteurs (15 et 50cm du sédiment) a été alors mesurée. En effet, dans la mesure où des composés toxiques provenant du sédiment puissent être impliqués dans des perturbations physiologiques chez l'huître, la mesure de gènes régulateurs de la croissance et de la reproduction semble pertinente.

Sur des individus issus d'expérimentations de changements de niveaux trophiques CN1 et CN3, nous avons également entrepris de mettre en relation l'expression de ces gènes avec l'apport nutritionnel.

Dans l'ensemble de ces expérimentations, des marqueurs précédemment caractérisés ont été mesurés, tels que des facteurs régulateurs de croissance et de reproduction (TGF- $\beta$ , CgClp, récepteurs aux protéines G de type GnRH, calcitonine et mélatonine) ainsi que des gènes de réponse à différents stress (HSP70 et HSP90, MDR1).

## WP 3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

### Tâche 3.4 - Comparaison "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

*Sous-tâche 3.4.4 - Comparaison d'expression différentielle de marqueurs moléculaires de stress sur le site DynaBDV-Gêfosse*

#### 1- Expérimentations *in situ* DynaBDV-Gêfosse

Dans le bassin ostréicole de la Baie des Veys, la pratique de cultures sur table est la seule employée. Ce bassin subit au cours de l'année, mais aussi au cours des cycles circadiens des apports terrigènes importants occasionnant des dépôts sédimentaires dans différentes localisations. Ces sédiments peuvent constituer des apports nutritifs conséquents pour les huîtres, mais ils apportent surtout de nombreuses contraintes. Ces arrivées d'eau douce entraînent une diminution de la salinité du bassin, pouvant produire un choc hypo-osmotique. De même, des produits phytosanitaires provenant de l'activité agricole sont également véhiculés par ces apports terrigènes. Enfin, le milieu sédimentaire constitue un micro-environnement agressif pour les huîtres favorisant par exemple le développement de bactéries pathogènes et la formation de composés toxiques comme des dérivés sulfurés ou ammoniaqués. De même, il entraîne souvent une hypoxie localisée pouvant atteindre les organismes.

Sur ce constat, nous nous sommes donc intéressés à l'influence du milieu sédimentaire sur l'expression de différents gènes. Pour cela deux lots d'huîtres "R" et "S" ont été placés à deux

hauteurs de table différentes (70cm, hauteur standard et 15cm, hauteur proche du sédiment et rapidement envasé). Les animaux ont été prélevés en fin de gamétogenèse. L'expression de plusieurs gènes a été mesurée à partir d'ARN extraits de branchies.

Le gène *mGDF2* montre une diminution significative de son expression dans la famille S à faible hauteur de table (figure n°1), mais également une réponse différente entre les "R" et "S" à une hauteur de table standard.

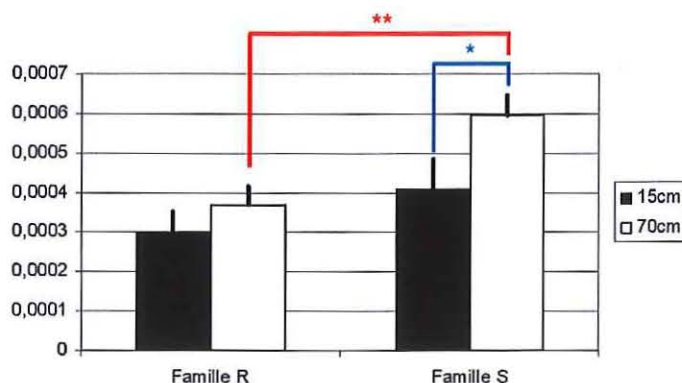


Figure 1 : Expression du gène *mGDF2* chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* selon deux hauteurs de table ostréicole (rouge : 15cm ; orange:70cm) dans les branchies de familles R et S.

L'amplification a été réalisée avec des amorces spécifiques de *mGDF2* et de l'Actine. La mesure relative du gène cible est rapportée par molécule de gène de référence (Actine) par la formule  $NmGDF2=2^{(C_{tréférence} - C_{cible})}$ . La différence d'expression a été validée par un test de Student.

De manière analogue, le gène *MDR1* diminue dans les branchies pour les animaux S posés à 15cm (figure n°2). Les familles R par contre ne montrent pas de réponse différentielle.

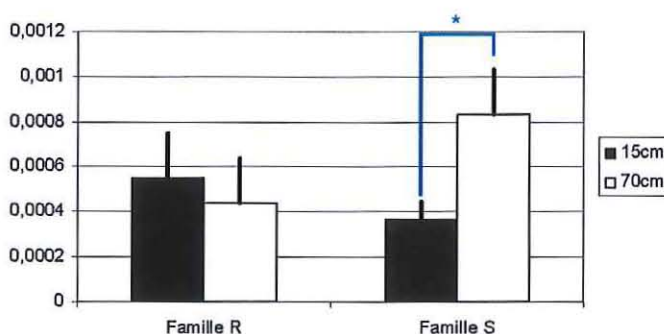


Figure 2 : Expression du gène *MDR1* chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* selon deux hauteurs de table ostréicole (rouge : 15cm ; orange:70cm) dans les branchies de familles "R" et "S".

L'amplification a été réalisée avec des amorces spécifiques de *mGDF2* et de l'Actine. La mesure relative du gène cible est rapportée par molécule de gène de référence (Actine) par la formule  $NmGDF2=2^{(C_{tréférence} - C_{cible})}$ . La différence d'expression a été validée par un test t de Student.

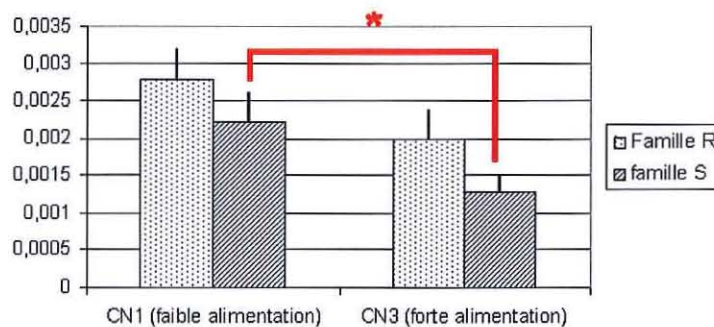


Ces résultats semblent montrer une diminution d'expression d'un gène impliqué dans la défense immunitaire (mGDF2) et d'un gène apparenté aux protéines d'extrusion des xénobiotiques (MDR1) dans les familles "S", notamment dans les familles "S". On observe également une réponse différente entre les "R" et les "S". En conditions plus défavorables, les "S" semblent voir leur défense diminuée.

## 2 - Relation avec les niveaux trophiques

Dans le milieu naturel, les huîtres sont directement soumises aux productions primaires du bassin. Selon l'année ou les conditions climatiques fluctuantes, ces apports nutritifs sont variables et influencent par conséquent la croissance et la reproduction de ces animaux. Pour étudier l'influence des niveaux trophiques disponibles, une expérimentation en conditions contrôlées a été menée où deux niveaux ont été retenus, un faible niveau de 4% de poids sec d'algues/jour/gramme de poids sec d'huître (CN1) et un niveau fort (12%) (CN3) dans le tissu de réserve énergétique (les palpes labiaux).

Dans les palpes labiaux, mGDF2 montre une diminution significative de son expression dans les animaux de la famille "S" uniquement à un niveau trophique élevé (figure n°3). Ce résultat suggère l'hypothèse qu'à un niveau trophique plus faible, le besoin de cellules spécialisées dans la mise en réserve soit plus important et donc déclencherait une voie d'intense prolifération et/ou différenciation de cellules souches en cellules différenciées impliquant le facteur de type TGF- $\beta$ , mGDF2.



**Figure 3 : Expression du gène mGDF2 chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* selon deux niveaux trophiques (CN1 faible niveau et CN3 fort niveau) dans les palpes labiaux dans les familles "R" et "S".**

L'amplification a été réalisée avec des amorces spécifiques de mGDF2 et de l'Actine. La mesure relative du gène cible est rapportée par molécule de gène de référence (Actine) par la formule  $NmGDF2=2^{-(Ct_{référence} - Ct_{cible})}$ . La différence d'expression a été validée par un test de Student.

Ces différents résultats obtenus au cours de ces expérimentations en conditions contrôlées ont montré que certains des gènes retenus dans cette étude pourraient se révéler être des marqueurs appropriés et révèlent des réponses différentielles entre les familles "R" et "S". Certaines de ces expériences devront cependant être réitérées afin de valider ces résultats.

# Volet environnement trophique

Responsable : S. Lefebvre

## WP 6 - Caractérisation de l'environnement

### Introduction

Les études préalables effectuées sur des populations d'huîtres montraient une hétérogénéité spatiale des mortalités ostréicoles. En effet, une sensibilité accrue des huîtres dans la partie Sud des parcs par rapport à la partie Nord a été révélé. L'objectif de cette étude était de débiter une première analyse de l'hétérogénéité spatiale de l'environnement trophique en Baie des Veys en la reposant sur une approche multidisciplinaire qui intègre : 1) l'analyse des signatures isotopiques naturelles du Carbone et de l'Azote dans les différentes populations et compartiment de l'écosystème (Thèse de J.C. Marin, Univ. Caen) ; 2) les simulations de modèle hydrodynamique (DEA et thèse de K. Grangeré, Ifremer/ Univ. Caen) ; 3) l'analyse des cortèges spécifiques de microalgues planctoniques (Thèse de F. Jouenne, Univ. Caen) et 4) la répartition spatiale des biomasses microphytobenthiques (DEA J. Montepini, Univ Caen).

### Tâche 2.2. Caractérisation de l'environnement trophique en baie des Veys

Si aucune différence quantitative (Chlorophylle a) n'apparaît entre les secteurs Nord et Sud des parcs, des différences existent dans les **des cortèges spécifiques phytoplanctoniques** (Figure 1a). Cette hétérogénéité spatiale rencontrée au cours des campagnes d'échantillonnage, se rencontre également au niveau de la biomasse microphytobenthique (estimée par la chlorophylle a) (Figure 1b).

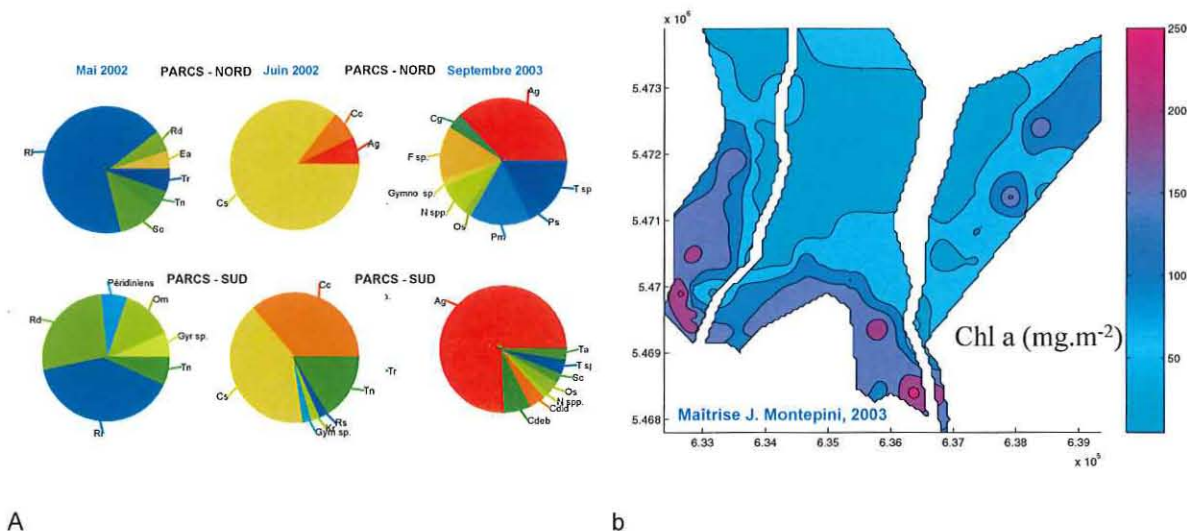


Figure 13 : Hétérogénéité de la ressource trophique en Baie des Veys : (a) cortèges spécifiques phytoplanctoniques (3 dates) pour les parcs nord (haut) et les parcs sud (bas) & (b) hétérogénéité en chlorophylle a au niveau du sédiment.

Si rien ne montre que cette hétérogénéité trophique est impliquée dans les causes de mortalité de *Crassostrea gigas* en Baie des Veys, par contre, la dessalure plus importante mise en évidence dans le secteur sud des parcs (Figure 2a), est bien associée à des mortalités supérieures dans ce

secteur (Figure 2b). De même, l'eau douce procure un surcroît d'hétérogénéité trophique par apport de matière en suspension d'origine continentale et détritique.

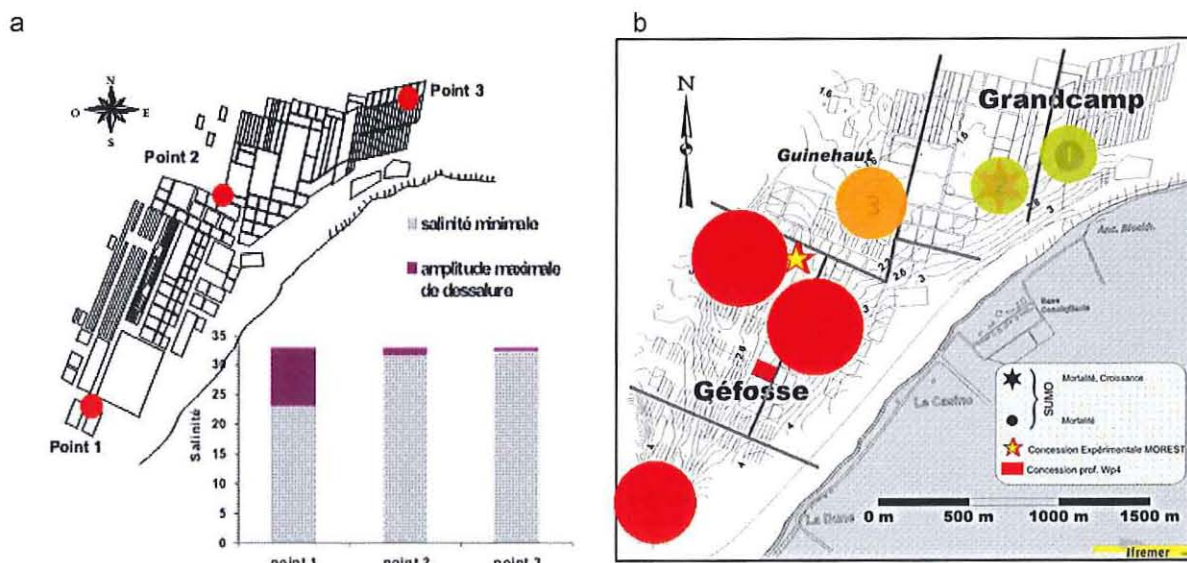


Figure 14 : (a) Salinité et (b) indice de mortalité (2000 à 2003) sur 6 sites atelier en Baie des Veys (Sumo) (Taille des cercles proportionnels aux niveaux moyens de mortalités ostréicoles).

Ainsi, une hétérogénéité spatiale de l'environnement trophique, (en particulier entre le sud et le nord des parcs ostréicoles) est mise en évidence. Elle est confirmée par la différence observée sur les analyses des signatures isotopiques du carbone et de l'azote pour des lots d'huîtres implantés au nord et au sud des parcs ostréicoles (Figure 3). Elle peut être liée au mélange des eaux estuariennes et marine avec une probable remise en suspension de microphytobenthos sous l'action de l'hydrodynamique. Sans présager d'un éventuel lien de cause à effet, il est malgré tout intéressant d'observer le parallélisme entre cette hétérogénéité trophique et les différences observées sur les niveaux de mortalités moyens entre les deux secteurs nord et sud.

La question de l'implication directe de l'hétérogénéité trophique dans les processus inducteurs de mortalités reste donc posée et nul doute que sa résolution contribuera à la compréhension de la problématique de mortalité de *Crassostrea gigas* en Baie des Veys.

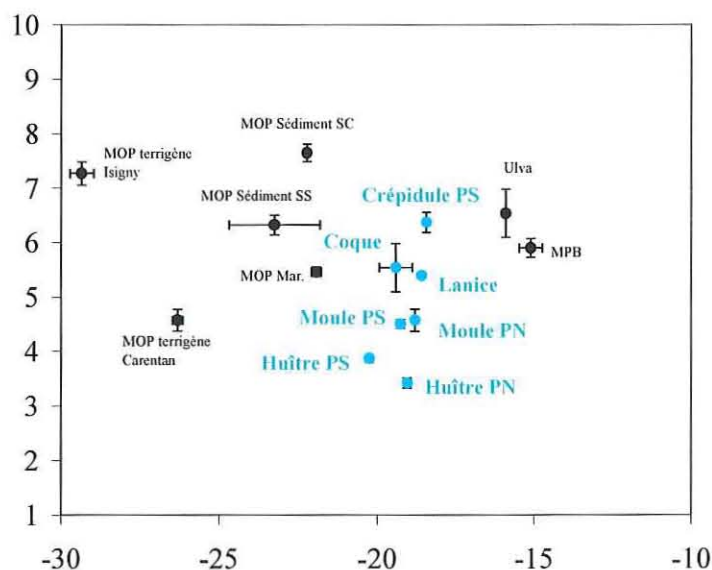


Figure 3 : Signatures isotopiques de l'azote et du carbone sur le site de la baie en mai 2004, de l'huître creuse (PN : parc nord et PS parc sud) ses compétiteurs potentiels ainsi que les sources de nourriture.

# Ifremer - DRV/RA/UMR/PE2M (Microbiologie) Brest

Responsable : Jean-Louis NICOLAS

Adresse :

Unité Mixte de Recherche Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins (PE2M),  
Ifremer, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France  
Site Expérimental d'Argenton, Presqu'île du vivier, 29840 Landunvez, France.

## Introduction

### WP1 – Mise au point d'outil

#### Tâche 1.2 - Physiologie (LPI)

- Mise au point d'un dosage type ELISA par anticorps anti-protéines ovocytaires pour suivre la gamétogénèse chez les femelles,

Un anticorps polyclonal développé à partir de protéines d'œufs de *Crassostrea gigas* a été élaboré par un groupe de recherche coréen (Kanga et al, 2003) sous l'égide du Dr Choi (Cheju National University). Cet anticorps a été fourni au Laboratoire Physiologie des Invertébrés pour y être testé. L'expérimentation Dynamaury 2004 a servi de cadre pour le testage de l'anticorps.

La réalisation du protocole montre effectivement une augmentation de la concentration des protéines ovocytaires dans un broyat d'huîtres femelles entre le début de la gamétogénèse et le début du mois de juillet. Le 17/05/2004 il apparaît une différence significative de concentration des protéines ovocytaires entre les lignées "R" et "S" qui pourrait être interprété comme une ponte partielle des huîtres de la lignée "R" suivi d'une reprise de la gamétogénèse par une accumulation de protéines ovocytaires dans la gonade (fig.1).

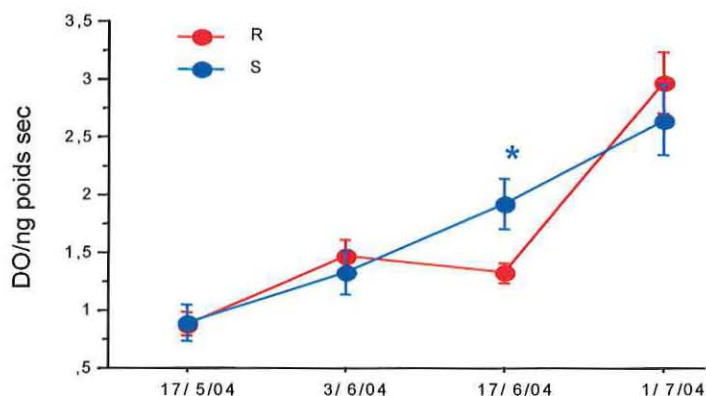


Figure 1 : mesure de l'effort de reproduction à l'aide d'anticorps antiprotéines ovocytaires des huîtres femelles des lignées "R" et "S" au cours de l'expérimentation Dynamaury 2004.

**Conclusion :** L'anticorps antiprotéines ovocytaires permet de mesurer l'effort de reproduction des femelles, il convient maintenant de réaliser un anticorps antispermatozoïdes pour mesurer l'effort de reproduction des mâles. Cette approche immunochimique devrait être comparée aux approches d'histologie qualitative et quantitative dans un but de validation.

- Mise au point du dosage biochimique de la glycogène synthase,
- Développement d'un marqueur moléculaire et protéique (hypoxie inductible facteur) pour la réponse de *Crassostrea gigas* aux phénomènes d'hypoxie (cf. tâche 3.4)
- Participation (coll. GPIA) pour la mise au point des micro-arrays pour la comparaison "R" et "S", ainsi que pour la mise au point de la technique de RNA interférence (cf. tâche 3.4.)

## **Tâche 1.4 - Pathologie – Taxonomie des souches de *V. aestuarianus*, *V. splendidus* isolées au moment des mortalités.**

(programme commun CRB-Morest)

### **Caractérisation de *Vibrio aestuarianus* : Une espèce associée à des mortalités d'huîtres creuses.**

12 souches de *Vibrio aestuarianus* ont été isolées à forte concentration et en culture pure dans des huîtres moribondes ou quelques fois vivantes. Elles ne sont pas parfaitement identiques. Elles présentent des degrés de virulence variable et une certaine diversité phénotypique. Selon les caractères phénotypiques la plupart des souches forment un groupe relativement homogène à part deux souches 02/114 et 01/031 (fig. 2). Les études phylogénétiques ont montré une homologie des séquences 16S et plus particulièrement des séquences *gyrB* entre elles d'une part et d'autre part avec la souche de référence (ATCC35048T). Des hybridations ADN-ADN ont été réalisées avec l'ADN génomique total de 2 souches de *Vibrio aestuarianus*.

- Une souche pathogène de l'huître. Les taux d'hybridations sont supérieurs à 80% avec les souches de l'huître et de 61% avec la souche de référence.
- La souche de référence : 7 souches présentent des hybridations inférieures à 65% et 4 autres entre 72 et 80%.

Ces résultats montrent une grande analogie entre les souches associées aux huîtres qui se distinguent de la souche de référence. Cependant, étant donné la similitude des séquences *gyrB* et 16S, des taux d'hybridation à plus de 70% pour certaines souches avec la souche de référence la délimitation d'une nouvelle espèce semble difficile à réaliser. Contrairement au groupe *V. splendidus* où une grande variabilité génotypique existe le groupe des *aestuarianus* est plus homogène. Ceci dénote une capacité moindre d'adaptation et un biotope plus étroit, vraisemblablement lié à la présence des huîtres. Cependant, il demeure une variabilité importante des phénotypes montrant une diversité intra spécifique de cette espèce.

### **Caractérisation de souches associées au groupe *V. splendidus*.**

L'hétérogénéité des phénotypes de ce groupe d'espèces ne permet pas d'en faire un seul groupe homogène car il s'intercale quelques espèces comme *V. alginolyticus* et *V. aestuarianus*. Cependant des sous-groupes de souches apparaissent bien homogènes (Figure 1).

D'après leurs séquences 16S et de *gyrB*, 10 souches de la collection appartiennent au groupe *V. splendidus*. Les souches 01/337, 01/083, 01/323, 02/069 sont très proches de plusieurs souches de référence par leur 16S comme *V. splendidus*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus*. Sur l'arbre *gyrB*, les souches 01/337 et 01/083 sont intimement liées à *V. crassostrea*, tandis que la souche 02/069 éloignée des souches de référence formerait une espèce non encore décrite.

La souche 02/089 (isolée de post larves de coquille St-Jacques moribondes) apparaît très atypique avec une branche profonde et il est fort probable qu'elle puisse être une espèce additionnelle. Les hybridations ADN-ADN entre 02/089 et *V. pomeroyi* ne sont que de 14%. La description de cette nouvelle espèce associée à des mortalités de post-larves de coquilles Saint-Jacques est prévue. Pour cela, des infections expérimentales prouvant la pathogénicité des souches sont à réaliser.

Les souches 02/003, 02/004 et 03/053 de provenance soit de larves de *Crassostrea gigas*, soit d'ormeau semblent constituer par leur séquence GyrB également une nouvelle espèce à l'intérieur de ce groupe *splendidus*. Les taux d'hybridation ADN-ADN 02/003-02/004 et 02/003-*V. pomeroyi* sont respectivement de 66 et 32%.

Cependant pour l'ensemble de ces souches leur affiliation définitive ne pourra être déterminée qu'après hybridation ADN/ADN qui sera faite au cours de l'année 2005.

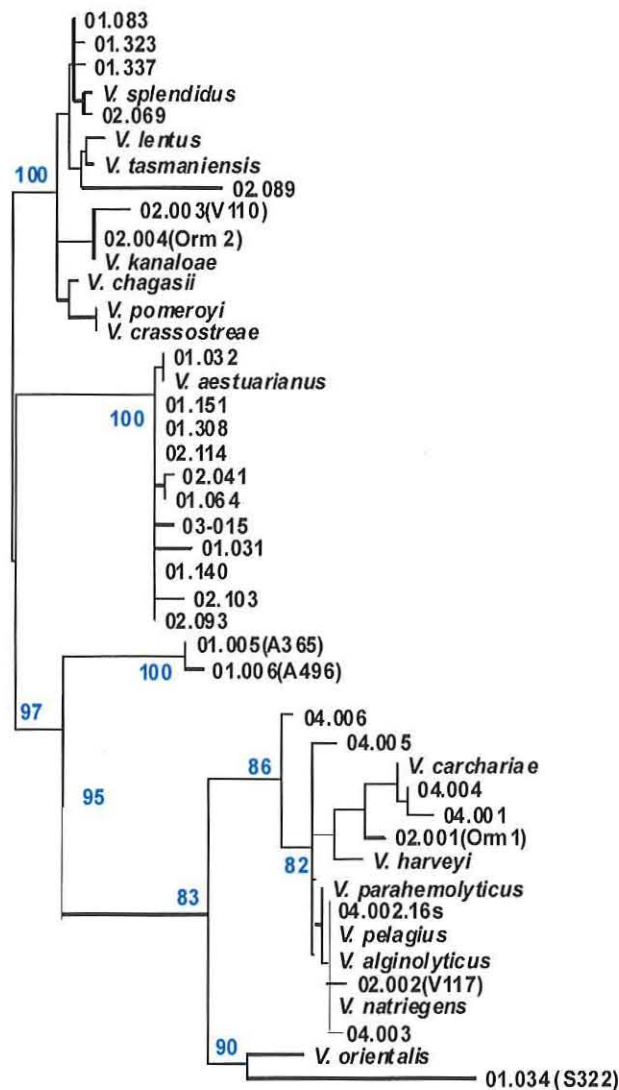
**45 species , 1058 sites (global gap removal)**

**Neighbor Joining Method**

0.022

**Jukes and Cantor distance**

**500 bootstrap replicates**



**Figure 2** : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences du gène ADNr 16S (les bootstraps supérieurs à 50% sont indiqués pour chaque embranchement).

## **WP2 - Caractérisation *in situ* des mortalités estivales**

### **Tâche 2.2.7 - Suivi pluridisciplinaire des interactions hôte– pathogène-sédiment appliqué à du naissain (Dynamauray et Former)**

*Responsable tâche : Jeanne Moal*

#### **Introduction**

Les objectifs sont :

- de vérifier pour des animaux au cours de leur première année les hypothèses de stress liés à la proximité du sédiment et de relation maturation–mortalité mis en évidence les années précédentes sur des animaux de 18 mois,
- de comparer les dynamiques de mortalité entre l'estran et l'eau profonde.

Un suivi pluridisciplinaire sur du naissain de captage naturel a été réalisé à Auray en 2004.

La contribution du laboratoire PE2M concerne l'analyse de la charge énergétique adénylique pour estimer le potentiel énergétique de l'animal, la composition biochimique pour estimer la gestion des réserves et le développement de la gamétogénèse et l'analyse des acides gras et stéroïdes pour aborder la qualité de l'alimentation .

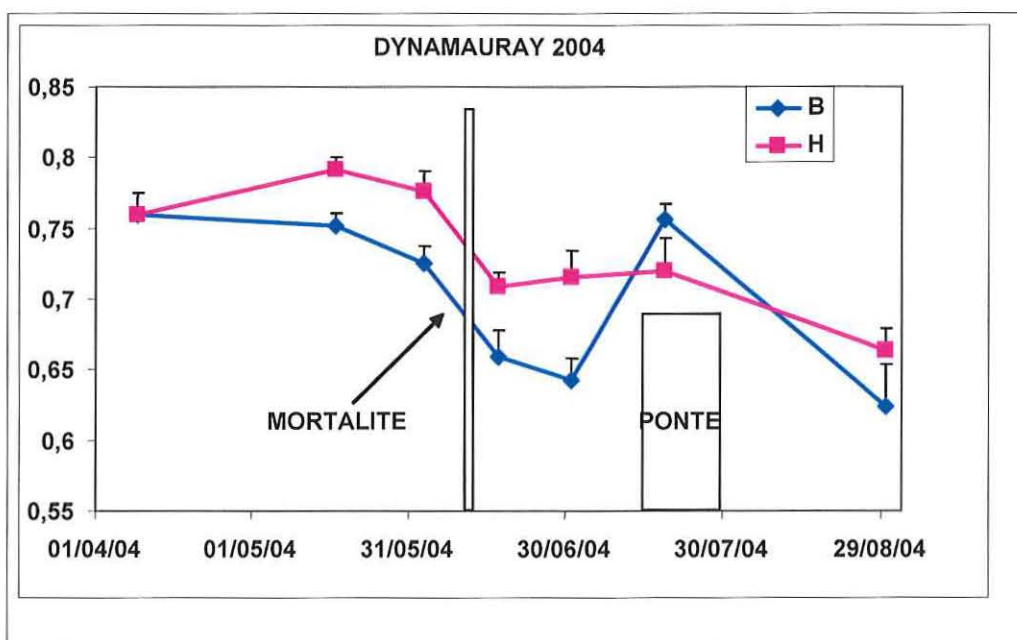
#### **Résultats**

##### **1 - Dynamauray**

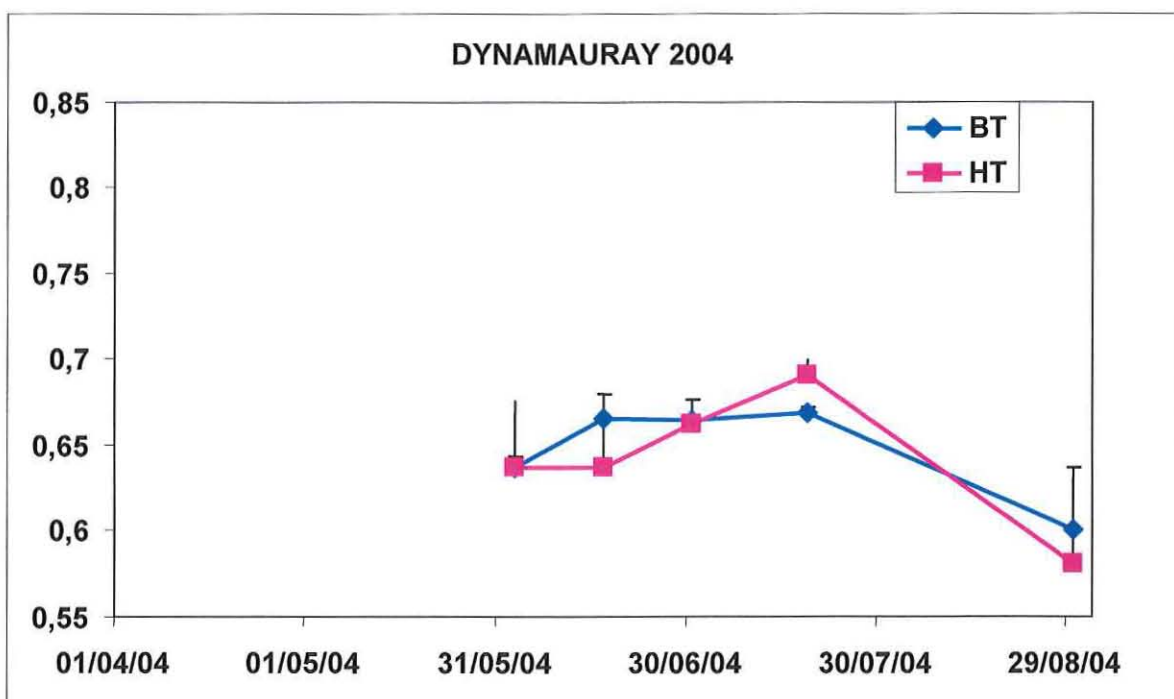
Sur l'estran on a noté un pic massif de mortalité autour du 15 juin pour le naissain diploïde alors que le naissain triploïde est peu touché. Le naissain diploïde a mûri alors que le triploïde non, ce qui conforte la relation mortalité-maturation observée sur le 18 mois. Par contre aucune différence de mortalité ou de maturation n'est observée entre les lots en fonction de leur proximité du sédiment.

La charge énergétique du naissain diploïde (fig. 3) varie au cours du suivi : elle diminue pendant toute la période estivale avec une accélération pendant le pic de mortalité. Elle est significativement différente en fonction de la proximité du sédiment, les huîtres proches du sédiment ont des valeurs inférieures. Cette baisse de la CEA est classiquement observée au cours de la montée en température et est associée au coût énergétique de la maturation. Ceci est confirmé par l'absence de variations de la CEA chez les triploïdes qui ne développent de gamétogénèse (fig. 4).

Les différences de valeurs de la charge selon la localisation des huîtres par rapport au sédiment indiquent un déséquilibre énergétique plus important avec la proximité du sédiment qui ne se traduit pas par une augmentation de la mortalité. Le rôle du déficit énergétique dans les mortalités est peut être à reconsidérer.



**Fig. 3 :** Charge énergétique du naissain naturel diploïde au cours du temps à Auray. Le naissain est disposé à deux niveaux par rapport au sol : 15 cm (B) et 70cm (H)



**Fig. 4 :** Charge énergétique du naissain triploïde au cours du temps à Auray. Le naissain est disposé à deux niveaux par rapport au sol : 15 cm (BT) et 70cm (HT)



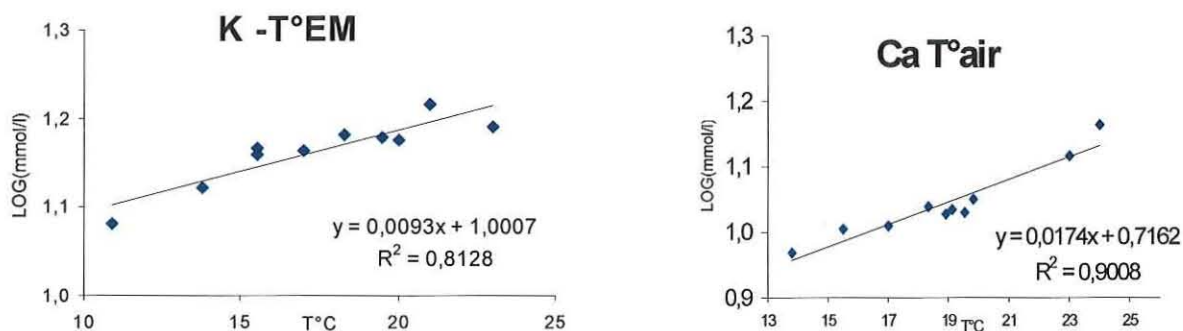
Les teneurs en glucides totaux des huîtres diploïdes sur l'estran varient selon un cycle saisonnier en relation avec le développement de la gamétogenèse. Après une période de mise en réserve d'avril à mi mai les sucres sont consommés très rapidement jusqu'à la ponte et les valeurs atteignent un seuil très bas de 5%. Les valeurs fin août restent très basses. Le positionnement des huîtres par rapport au sédiment modifie les teneurs en sucres. Les huîtres proches du sédiment accumulent moins de réserves que les huîtres à 70 cm avec des maxima respectifs de 18 et 25 % sucres/poids sec au mois de mai. Les minima sont similaires pour les deux lots. La consommation des sucres pendant le développement de la gamétogenèse est donc supérieure pour les lots à 70 cm et est à mettre en relation avec un développement plus intense de la gamétogenèse traduite par le poids sec. Cependant les triploïdes qui n'ont pas mûri perdent aussi des sucres. Comme pour les diploïdes on note pour les triploïdes une différence de teneurs en fonction de la position par rapport au sédiment.

L'ensemble de ces données (CEA et sucres) encore partielles montrent que le métabolisme énergétique des huîtres est différent selon le positionnement au sédiment et probablement en relation avec une différence d'intensité de reproduction. La mise en réserve est plus importante pour le lot à 70cm le plus exondé

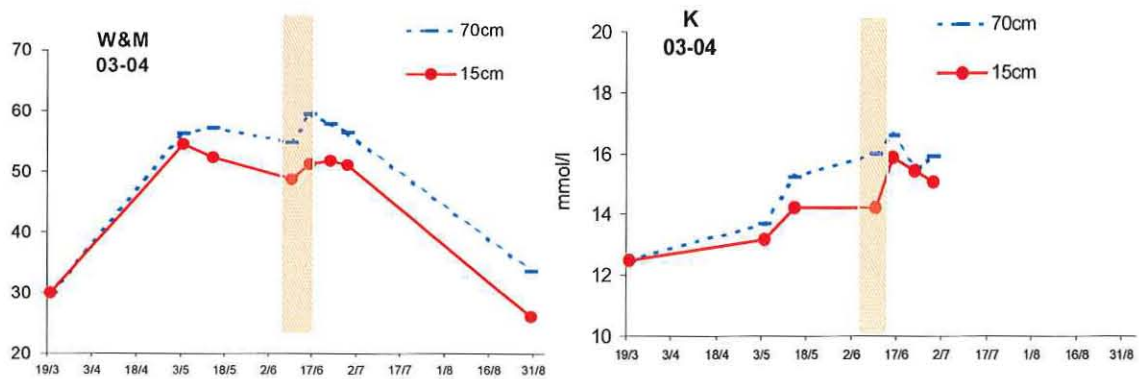
## 2 - Composition ionique de l'hémolymphe

Les variations des ions  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  et de bicarbonates observées dans l'hémolymphe des huîtres au moment des mortalités (expérience Dynamor en particulier) résultent d'une accumulation de  $CO_2$  d'origine métabolique dans l'hémolymphe à l'émersion quand la température s'élève en été. Ceci provoque une acidose proportionnelle à l'activité métabolique. L'augmentation du  $Ca^{++}$  dans l'hémolymphe provient de la dissolution de la coquille sous l'effet de cette baisse de pH et transforme l'acide carbonique en bicarbonates. Le  $K^+$  est excrété par les cellules sous l'effet de l'acidose pour maintenir le pH cellulaire. Cependant si ce mécanisme semble normal, les huîtres placées à 15 ou à 70cm ne réagissent pas exactement de la même façon.

Cette année, il a été étudié comment la température de l'air et de l'eau affectait ces concentrations ioniques. D'une part, une bonne corrélation a été trouvée entre la température de l'air et les ions  $Ca^{++}$  (19% de taux en plus chaque  $10^\circ C$ ). Cette réponse montre que c'est au moment de l'émersion que ce phénomène se produit quand la température de l'air s'élève. Une bonne corrélation est observée entre la température de l'eau et l'augmentation du potassium (9% d'augmentation par  $10^\circ C$ , Fig. 5), traduisant un mécanisme de compensation du pH cellulaire à l'immersion. La concentration de  $Ca^{++}$  étant multipliée par 1,5 au maximum dans l'hémolymphe pourrait être relativement neutre pour l'animal qui fabrique de la coquille. Par contre les effets du potassium pourraient être pénalisants (cet ion étant régulé très étroitement) s'il n'était pas excrété rapidement. Ce blocage de l'excrétion de  $K^+$  se produit surtout chez des huîtres placées à 15 cm. La conséquence pourrait en être un problème d'acidose cellulaire. Si il s'accumule dans l'hémolymphe, le  $K^+$  pourrait avoir un effet négatif sur la polarisation membranaire en particulier sur le système nerveux. Ceci restera à investiguer car les taux de potassium augmentent dans l'hémolymphe avec la gamétogenèse et diminuent après la ponte (Fig. 6)



**Figure 5** : L'augmentation de  $K^+$  dans l'hémolymphe est fortement corrélée à la température de l'eau et le calcium à l'air



**Figure 6** : L'évolution des concentrations en potassium suit l'Index de Walne et Mann (Poids sec/pds coquille x 1000). Il y a surtout un blocage de l'excrétion cellulaire du K<sup>+</sup> qui précède les mortalités pour les animaux à 15cm.

### Sous-Tâche 2.2.10 – Suivi de la maturation et de la ponte des huîtres "R" et "S" (18 mois) dans le Bassin d'Arcachon

#### Coll. DEL/ARCACHON

Responsable Sous-Tâche: Stéphane Pouvreau, Danièle Maurer

#### Introduction

L'implication de la température et de la reproduction (dynamique et intensité) dans le phénomène des mortalités estivales d'huître creuse *Crassostrea gigas* a été mise en évidence. Des lignées génétiques "résistantes ou R" et "sensibles ou S" à ce phénomène ont été sélectionnées. Elles semblent présenter des stratégies de reproduction différentes. L'étude de l'évolution de la maturation et de la ponte de ces deux lignées *in situ* dans le Bassin d'Arcachon, où l'espèce *Crassostrea gigas* trouve des conditions optimales à sa reproduction, permettra de conforter ou non cette hypothèse. Le cycle de reproduction de l'huître creuse dans ce site a été suivi pendant une dizaine d'année, ce qui permet de disposer de références en ce domaine.

#### Résultats

En 2002, un résultat original avait été mis en évidence en rivière d'Auray : placées dans le même environnement, les lignées sensibles présentaient un profil de gamétogenèse très différent des lignées résistantes (Enriquez-diaz et al., 2003) et notamment : (1) une gamétogenèse plus précoce, (2) une production de gamètes plus forte, (3) une émission gamétique très partielle et (4) une période régression très longue.

Afin de vérifier ce résultat dans un autre bassin conchylicole, des lots d'huîtres sensibles (**S**) et résistantes (**R**) ainsi qu'un lot d'huîtres témoin (**T**, issues de captage naturel) ont été placés en élevage dans le Bassin d'Arcachon. De mars à septembre 2004, leur gamétogenèse a fait l'objet, en histologie quantitative, d'un suivi mensuel, puis bimensuel en période de reproduction. Il ressort que le cycle de gamétogenèse dans le Bassin d'Arcachon est sensiblement le même entre ces trois lots d'huîtres. Leur gamétogenèse relativement lente au printemps s'accélère en juin, pour donner un pourcentage d'occupation de la gonade supérieur à 60 % en août. Vers le 11 août, une ponte, tardive pour le bassin d'Arcachon (Maurer et al., 2003) massive et synchrone est observée sans qu'aucune différence n'ait pu être mis en évidence entre les lots (fig 7). Ainsi, les caractéristiques phénotypiques des lots « résistantes » et « sensibles » observées en rivière d'Auray en 2002 n'ont pas été retrouvées au cours de cette étude en 2004 dans le bassin

d'Arcachon. Cette différence de comportement entre les deux sites pourrait s'expliquer par le fait que le Bassin d'Arcachon présente une température maximale estivale supérieure à la rivière d'Auray, dont l'effet stimulateur aurait permis la réalisation d'une gamétogenèse «classique» y compris pour les lignées « sensibles », sans différence avec le cycle de reproduction. Les valeurs printanières faibles de phytoplancton pourraient aussi constituer une piste complémentaire à cette explication.

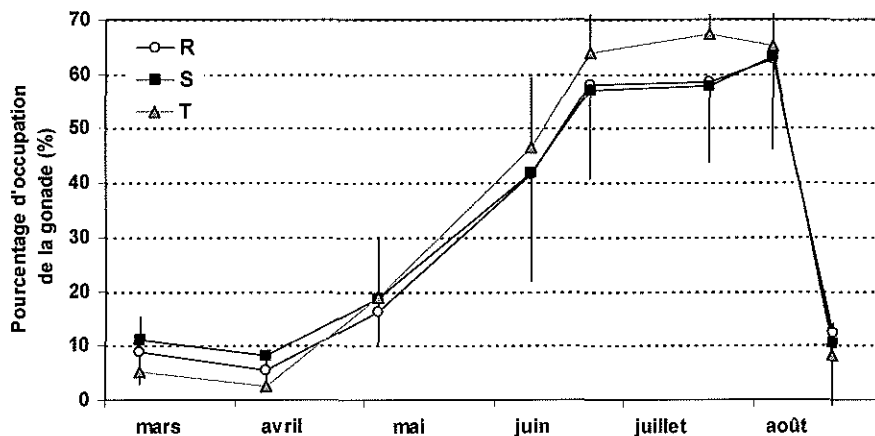


Figure 7 : Evolution du pourcentage d'occupation de la gonade dans la masse viscérale pour chaque lot (moyenne +/- écart-type).

Enfin, il est à noter que ce suivi a permis de mettre en évidence un léger phénomène de mortalité en juin en pleine période de gamétogenèse active. Ce résultat permet d'alimenter la discussion autour de ce phénomène.

## Bibliographie

Enriquez-diaz M., Pouvreau S., Le Coguc Y., Langlade A., Bédier E., Bourles Y., Fabioux C., Cochard J.C., Le Pennec M., 2003. Reproduction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Evidence of a genotype-dependent strategy. NSA 2003 Annual Meeting, April 13<sup>th</sup> to 17<sup>th</sup>, New Orleans, Louisiana, USA. -Poster-

Maurer D., Auby I., Masson N., Sautour B., Gle C., D'Amico F., Gueguen C., Tournaire M.P., Trut G., Cantin C., 2003. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Année 2002. *Rapport Ifremer DEL/AR*, 248 p. + Annexes.

## WP3 - Découplage des paramètres expérimentaux

### Tâche 3.1 – Evaluation expérimentale du coût de la gamétogénèse chez le naissain d'huîtres creuses

#### Sous-Tâche 3.2.1 – GIGAREPRO 2004 sur des juvéniles

Responsable Tâche : **Stéphane Pouvreau**

## Introduction

Les expérimentations 2002 et 2003 (Gigarepro 2002 & 2003, WP 3.1) ont consisté à analyser, sur un cycle semi-annuel, l'effet du niveau trophique sur l'état reproducteur, l'état physiologique, l'état immunitaire et l'état microbiologique de population d'huîtres âgées de 1 an en début d'expérimentation (pool génétique reconstitué en 2002 et Familles R et S en 2003).

D'un point de vue bioénergétique, l'analyse des résultats 2002 & 2003 n'est, pour l'instant, que partielle mais il ressort déjà (Pouvreau et al., 2002 ; Pouvreau et al., 2003) qu'un milieu nutritif riche au printemps favorise, en été, l'hypertrophie des gonades chez *Crassostrea gigas* tout en réduisant l'efficacité de ponte, ce qui se traduit par un prolongement de la période de gamétogénèse active. Cette période se caractérise aussi par **une efficacité d'assimilation diminuée et un métabolisme respiratoire accru**, ce qui engendre en période estivale une scope for growth négatif. Ce bilan est d'autant plus négatif que le développement des gonades est élevé. Si à ce déficit énergétique s'ajoute un «stress» supplémentaire, la probabilité d'apparition de mortalités augmente. Nous toucherions donc là un réel « talon d'Achille » chez cette espèce : à la fin de la période de gamétogénèse active et avant la ponte, l'animal semblerait ralentir toute fonction de nutrition malgré un besoin métabolique accru entrant dans une période d'affaiblissement passager. Réalisé pour l'instant sur du 18 mois, notre expérimentation 2004 en condition contrôlée vise à confirmer ou infirmer sur du **naissain naturel (12 mois)** ce schéma paradoxal de détresse physiologique.

Les 2 objectifs de Gigarepro 2004 étaient donc les suivants :

#### **Objectif premier : Vérifier le ralentissement estival de la nutrition**

L'éventuel « ralentissement » des activités de nutrition (notamment baisse de l'efficacité d'assimilation) en pleine période de gamétogénèse va à l'encontre de la plupart des lois de nutrition, généralement connues pour augmenter avec la température (e.g. Bougrier et al. 1995). Ces lois entraînent d'ailleurs un dysfonctionnement des modèles bioénergétiques (e.g. Ren & Ross, 2002) en période de maturation chez *Crassostrea gigas*. Par contre, ce résultat rejoint des observations antérieures sur l'activité ciliaire réduite en période de gamétogénèse (Mori, 1979), ainsi que les résultats obtenus par Soletchnik et al. (1997) sur la baisse de l'efficacité d'absorption.

#### **Objectif second : Vérifier l'augmentation estivale du métabolisme basal**

Les vitesses de réaction chimique et donc les taux physiologiques sont fonction de la température (e.g. loi d'Arrhenius, Kooijman 2000). Ainsi, il est classiquement observé une augmentation de la respiration standard d'un organisme avec la température. Mais, chez *Crassostrea gigas*, la gamétogénèse est concomitante de l'élévation de la température. Quel est donc la part de métabolisme liée à la gamétogénèse de l'huître creuse dans cette augmentation ? Cette fraction peut elle devenir prédominante au point d'engendrer un effondrement bioénergétique ?

# Résultats

## Rappel succinct du plan d'expérience

La figure 8 expose schématiquement le plan général d'expérience. Ce plan a visé à suivre temporellement la physiologie de la gamétogenèse d'une même population de naissain placée dans trois conditions trophiques différentes (CN0/CN1/CN3). Le niveau de nourriture de chacune de ces conditions a été fixé de manière à pouvoir produire 3 niveaux d'effort de reproduction. Le niveau CN0 visait à obtenir des animaux « à gamétogenèse très réduite » en période estivale (lot témoin « sans reproduction »).

L'intégralité de l'expérience s'est déroulée à la **Station Expérimentale d'Argenton** sur la durée d'un cycle de gamétogenèse (d'Avril à Août) sur une population de **2550 individus** (850 par condition). L'expérience de stress par cohabitation (*V. lentus*) a été réalisée à L'IFREMER de la Tremblade.

Les paramètres suivants ont été mesurés : Biométrie, Histologie quantitative, Ecophysiologie et Scope for growth (filtration, biodéposition, absorption, respiration).

Figure 8 : Plan expérimentale mis en place dans la salle physiologie 1 : les étoiles indiquent les prélèvements MAREL pour analyse d'eau. **Les paramètres zootechniques étaient les suivants** : Thermopériode saisonnière (réf : Bassin de Marennes Oléron), Photopériode saisonnière, Salinité : 36 ‰, Oxygène : Saturation, Apport Journalier de nourriture : CN0 : 2 % / CN1 : 4% / CN3 : 12% gPs<sup>-1</sup> algues / gPs<sup>-1</sup> chair d'huîtres. Composition pondérale du mélange : 50 % Isochrysis aff. galbana Clone T Iso, 25 % Chaetoceros calcitrans, 25 % Skeletonema costatum.

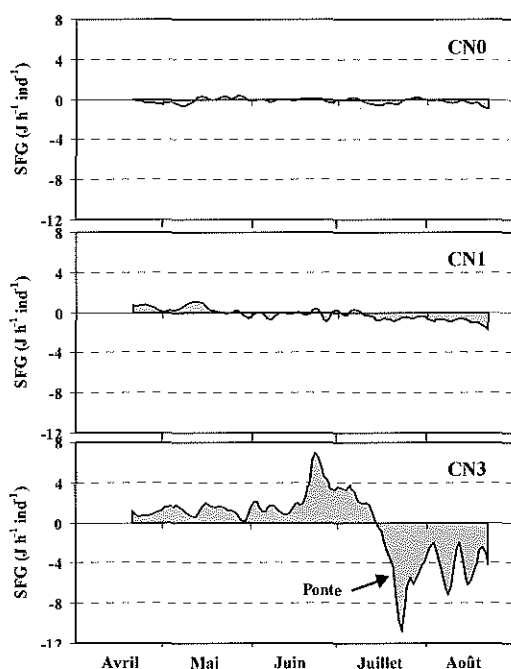
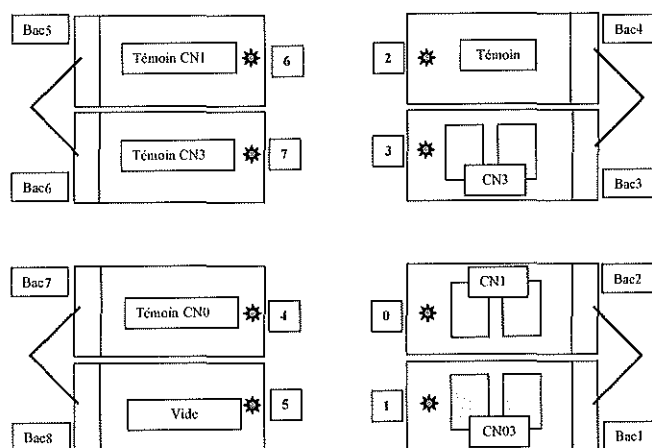


Figure 9: Pourcentage d'occupation de la gonade dans la masse viscérale en fonction des conditions trophique

## Principaux résultats obtenus

Il ressort tout d'abord que plus la nourriture est importante au printemps (condition CN3), plus le naissain investit dans sa gamétogenèse et ce, de façon **plus que** proportionnelle par rapport à son investissement somatique (hypertrophie de la gonade, figure 2). Ce résultat confirme donc sur du naissain les résultats 2002 et 2003 obtenus sur des adultes.

Il a ensuite été démontré que parallèlement au développement de la gamétogenèse, le bilan énergétique très positif au printemps **devient négatif** en été. Cette situation très défavorable en CN3 est très atténuée en condition CN1 et inexistante en condition CN0 (fig. 10). Ce résultat confirme là aussi les résultats antérieurs obtenus sur des adultes.

Les raisons liées à cette inversion ont une double origine : (1) une diminution estivale de l'énergie assimilée, malgré un apport constant de phytoplancton ; (2) un métabolisme respiratoire accru par l'augmentation de température et la gamétogenèse (fig. 11).

En outre, il a été montré que dans ce contexte estival d'affaiblissement énergétique, l'évènement de ponte qui se traduit par une respiration accrue et un arrêt de la consommation pendant les 48 h suivant l'émission des gamètes, creuse, de façon encore plus marquée, ce déficit (figure 3).

Concernant les épisodes de mortalités observés de façon spontanée en condition contrôlée, les résultats sont un peu différents des autres années. On confirme effectivement que ce sont, encore une fois, les animaux les plus nourris qui meurent majoritairement (cette année la mortalité a dépassé 51 % en condition CN3). Par contre, l'épisode de forte mortalité a lieu plus précocement que d'habitude : autour de mai-juin cette année contre juillet l'an passé. Cet épisode de mortalité n'est donc pas concomitant de l'affaiblissement énergétique, qui prend place à partir de juillet. Des causes physiologiques autre qu'énergétique sont à rechercher.

Par contre, concernant les infections expérimentales par cohabitation, on démontre une fois de plus qu'en période estivale (juillet), ce sont effectivement les huîtres qui présentent l'état énergétique le plus bas (CN3) qui sont les plus sensibles à l'infection.

Ainsi, ces résultats font donc apparaître trois phases critiques de la reproduction chez le naissain : (1) en période de gamétogenèse active pendant laquelle l'huître consacre toute son énergie à la gamétogenèse ; (2) au maximum de la gamétogenèse, phase pendant laquelle le bilan énergétique devient négatif, et (3) au moment de

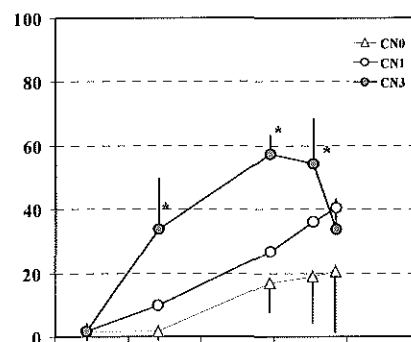


Figure 10 : Evolution mensuelle du bilan énergétique en fonction des conditions trophiques. Le déclenchement de la ponte en juillet se traduit par une forte baisse, clairement observable.

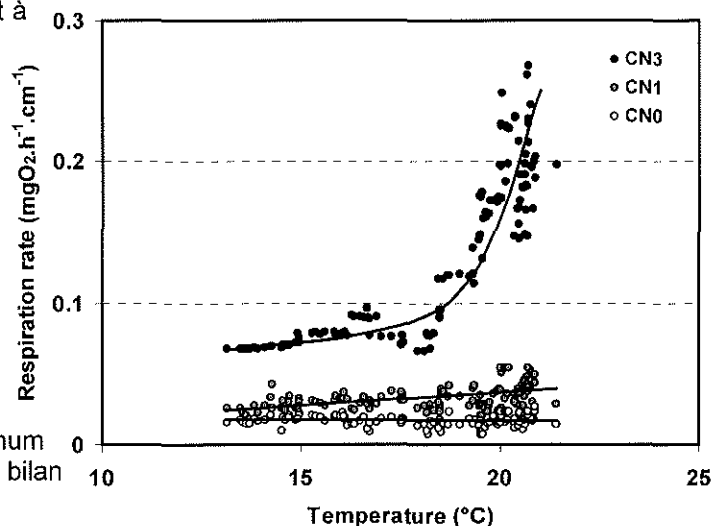


Figure 11 : Augmentation du métabolisme respiratoire (standardisé par la longueur de coquille,  $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) en fonction de la température, du niveau de nourriture (CN0, CN1, CN3) et de la gamétogenèse (principalement en CN3).

l'émission des gamètes pendant lequel l'huître s'arrête de consommer mais augmente son métabolisme respiratoire de façon accrue. Ce travail confirme les résultats antérieurs (e.g. Mori, 1979 ; Soletchnik et al. 1997 ; Pouvreau al., 2002) et apporte de nouveaux éléments utiles à la compréhension des relations entre gamétogenèse et mortalités estivales.

La prochaine étape de l'ensemble de ce travail réside désormais dans la construction d'un modèle bioénergétique (Kooijman, 2000) de croissance et de reproduction pour *Crassostrea gigas* permettant notamment d'analyser l'état des réserves énergétiques de l'animal face aux contraintes environnementales. Cette action s'inscrit dans le WP6.

### 3. Bibliographie

**Pouvreau S., Pierre S., Enriquez M., Le Souchu P., Connan J.P., Le Roy B., Mingant C. (2002).** Analyse bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en condition contrôlée : Implication dans le syndrome des mortalités estivales. Rapport Intermédiaire de Contrat ; Programme Morest. Ifremer Brest, DRV/RALPI. 56 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.

**Mori K (1979)** Effects of artificial eutrophication on the Metabolism of the Japanese Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361-369

**Pouvreau S., M. Enriquez-Diaz, P. Le Souchu, J.P. Connan, B. Le Roy, C. Mingant, J. Moal, M. Delaporte, J.R. Le Coz, J.F. Samain (2003)** Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas* : experimental approach. 95<sup>th</sup> annual meeting of NSA, 14-18 avril 2003, New Orleans, Louisiana, USA.

**Kooijman S.A.L.M (2000)** Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological System. Cambridge Univ. Press. 424 pp

*Sous-tâche 3.2.2 – Énergétique et température, conditions limites.*

#### Physiologie de la respiration

*Responsable : G. Le Moullac*

##### **Ecophysiologie et métabolisme des huîtres en hypoxie et en émergence**

Le comportement ecophysiologique et les orientations métaboliques des huîtres soumises à l'émergence et à l'hypoxie en laboratoire sont décrits. Deux conditions sont testées pendant 24 heures : l'émergence et l'hypoxie à 20% d'oxygène comparées à la normoxie (100% O<sub>2</sub>). Tous les lots sont ensuite replacés dans un milieu normoxique afin d'observer la récupération pendant 48 heures. La consommation d'oxygène et la filtration sont mesurées chez les huîtres en normoxie et en hypoxie puis en phase de récupération. Les voies métaboliques sont décrites au niveau enzymatique et transcriptionnel de la pyruvate kinase (PK) et de la phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK). En hypoxie, les huîtres réduisent significativement leur consommation d'oxygène de 70 à 80% et leur filtration d'environ 50%. Après 48 heures de récupération, leur consommation d'oxygène et leur filtration restent significativement plus faibles que chez les huîtres en normoxie (Fig. ). Après 48 heures de récupération, les huîtres exondées ont retrouvé un niveau de respiration et de filtration semblable à celui des huîtres restées en normoxie.

Au niveau métabolique, seul le muscle des huîtres en hypoxie est en anaérobiose puisque l'activité de la PK est significativement plus faible qu'en normoxie et l'activité de la PEPCK significativement

plus élevée. Après 48 h de récupération, le muscle reste en anaérobie : l'activité de la PK reste faible et l'activité de la PEPCK élevée. Au niveau transcriptionnel, en hypoxie, l'organisme entier glisse vers l'anaérobie puisque l'expression de la PEPCK est induite dans tous les tissus (significativement dans les branchies et le muscle) alors qu'en émergence, le niveau de transcription reste similaire à la normoxie. En émergence, la glycolyse dans le muscle est accélérée par une surexpression de la PK permettant d'obtenir un rendement énergétique élevé. En revanche en hypoxie la voie anaérobie est confirmée puisque la PEPCK est surexprimée de manière significative dans le muscle et les branchies. Cette étude a permis de montrer les mécanismes d'adaptation de l'huître *Crassostrea gigas* à l'émergence suggérant leur aptitude à la respiration aérienne. Le muscle est l'organe qui s'adapte en premier au manque d'oxygène et *a contrario* se réadapte le plus lentement. Cette expérimentation fournit des éléments indiquant les niveaux de régulation de la PK et de la PEPCK.

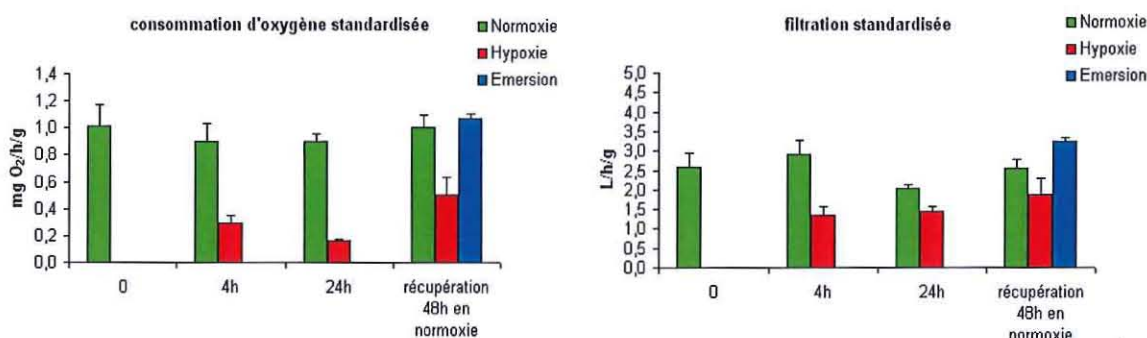


Figure 12 : respiration et filtration des huîtres placées en normoxie, hypoxie et émergence

## Expérimentation pluridisciplinaire (VALI) (18 mois "R" et "S")

### Test de l'hypothèse du déficit énergétique responsable des mortalités associé à un stress environnemental

Responsables tâche : G. Le Moullac et J. Moal

#### Introduction

L'objectif de VALI est de confirmer, sur des animaux sélectionnés comme résistants ou sensibles (S), amenés à maturité et à 19°C, si le déséquilibre énergétique peut à lui seul expliquer les mortalités ou si la conjonction de ce déséquilibre et d'un stress «standard» et/ou d'une infection bactérienne est nécessaire. Le ou les stress provoquant les mortalités estivales n'est pas identifié. Cependant la proximité du sédiment est un facteur aggravant. Bien qu'aucune anoxie n'ait été signalée, un relargage de sulfures et d'ammoniaque est noté au moment des mortalités. Le stress choisi est une hypoxie chronique pour représenter cette situation d'un microenvironnement défavorable à l'efficacité de respiration des huîtres.

Des animaux SD3 (R et S) de 18 mois, normalement en gamétogenèse active, élevés à Auray ont été transférés début juin à Argenton et subissent une période d'adaptation de 15 jours à 19°C. Pendant la période expérimentale de 3 semaines la moitié des huîtres subissent une hypoxie chronique de 4h. Un suivi multiparamétrique (physiologie, immunologie cellulaire et moléculaire, bactériologie,...) des animaux maintenus à 19°C a été réalisé dans le but de mieux comprendre les phénomènes.



## Résultats

Les bilans biochimiques indiquent un fonctionnement normal des individus c'est-à-dire que les huîtres en maturation utilisent leur réserves glucidiques pour la production d'ATP. Il n'apparaît pas de déficit énergétique puisque la charge énergétique reste constante à un niveau élevé. L'hypoxie chronique en condition expérimentale n'est pas apparue comme le facteur déclenchant les mortalités des huîtres en maturation à 19°C. Les mortalités sont similaires entre la normoxie et l'hypoxie. Afin de distinguer une cause infectieuse d'autres causes de mortalité, des lots d'huîtres ont été spécialement et régulièrement traités avec un antibiotique (érythromycine) depuis le début de la phase expérimentale. La mortalité des lots traités est similaire à celle des lots non traités pendant les 10 premiers jours, mais la mortalité semble jugulée après le 10<sup>ème</sup> jour de traitement. L'antibiotique n'est donc pas efficace dès le début du traitement. Pendant les 10 premiers jours, les mortalités semblent avoir une autre cause qu'une infection bactérienne (Fig. ). Le bilan final des mortalités ne montre pas d'effet des lignées "R" et "S". En hypoxie les mortalités des "R" et des "S" sont similaires. En normoxie la mortalité des "S" a toujours été supérieure à celle des "R" de l'ordre de 20 à 30% mais cet écart ne s'est pas maintenu puisque les "R" en normoxie ont rattrapé leur retard dans les derniers jours.

En conclusion, l'hypothèse de départ n'est pas vérifiée. Les mortalités observées au cours de cette expérimentation n'ont pas eu pour origine un déficit énergétique, puisque les réserves glucidiques étaient suffisantes pour maintenir une charge énergétique élevée. La cause infectieuse de la mortalité n'apparaît qu'après le 10<sup>ème</sup> jour chez les huîtres non protégées avec l'érythromycine. Il reste donc à déterminer l'origine des mortalités pendant la première partie de l'expérimentation. Les analyses bactériennes de l'hémolymphe des huîtres moribondes montrent une microflore monospécifique de *V. aestuarianus* en l'absence de traitement antibiotique et une microflore inférieure à  $10^7$  cell ml<sup>-1</sup> dans les huîtres sous érythromycine et très diversifiée. Cette dernière malgré une relative abondance il ne semble pas qu'elle puisse avoir un rôle dans les mortalités d'après les études précédentes. (Fig. 13)

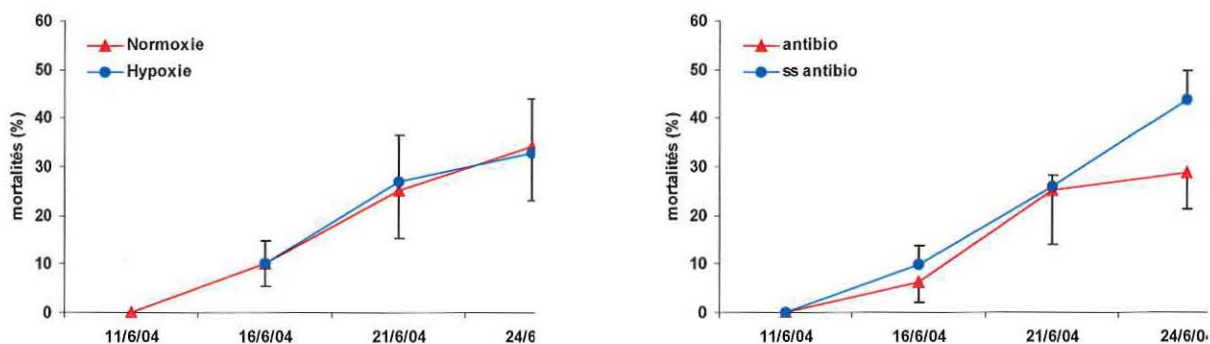
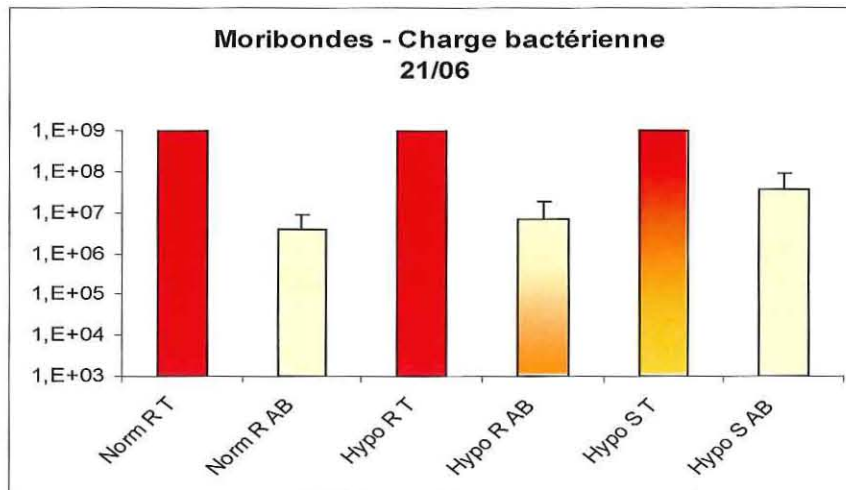


Figure 13: mortalité (a) des huîtres en normoxie et soumises à une hypoxie chronique, (b) sous l'effet de l'érythromycine.



**Figure 14:** Concentrations bactériennes dans l'hémolymphe des huîtres moribondes le 21 juillet après 10 jours d'antibiotiques et alors que les lots traités et non traités aux antibiotiques avaient les mêmes taux de mortalité. La couleur rouge indique la présence en dominance exclusive de *V. aestuarianus*, la couleur jaune une microflore très diversifiée (non identifiée). Les couleurs dégradées le mélange des 2 types de populations.

Légende : Norm : normoxie Hypo : hypoxie ; R Résistante ; S : sensibles et T : Témoin, AB : antibiotiques

### Sous-Tâche 3.2.3 – Effet de la qualité de la ressource trophique

#### Influence de la nutrition sur la physiologie des huîtres : rôle de l'acide arachidonique sur les paramètres immunitaires de l'huître

Responsable tâche : E. Guidicelli, M. Delaporte, C. Séguineau, J. Moal

#### Introduction

Lors d'études précédentes, des différences de paramètres hématocytaires avaient été observées chez des huîtres et des palourdes en fonction du régime alimentaire. Deux acides gras : 20 :5(n-3) et 20 :4(n-6) éléments importants de la réponse immunitaire des vertébrés, ont été suspectés et il a été décidé de déterminer leur rôle dans cette réponse.

Après avoir testé le rôle du 20 :5(n-3) sur les paramètres physiologiques des huîtres en 2003, il a été décidé d'élucider le rôle du 20 :4(n-6). Afin d'éviter l'apport de nombreux acides gras qui pourraient avoir affecté les paramètres mesurés, une nouvelle technique de supplémentation mise au point par Séguineau *et al.* (en préparation) a été utilisée. Cette technique permet de tester uniquement le rôle de l'acide gras choisi : le 20 :4(n-6).

#### Résultats

Il est tout d'abord intéressant de souligner que la nouvelle technique de supplémentation a conduit à une incorporation massive de 20 :4(n-6) dans les lipides polaires des branchies des huîtres, la valeur maximale atteint 19.7%. L'expérimentation contrôlée réalisée sans algue a permis de démontrer que l'algue T-*iso* n'était pas nécessaire à l'incorporation du 20 :4(n-6) dans les membranes, mais facilitait son incorporation. En présence de l'algue dans le bac d'élevage, le 20 :4(n-6) pourrait s'attacher à l'algue ou être incorporé dans celle-ci (Séguineau *et al.*, en préparation). Ceci permettrait une meilleure efficacité d'assimilation et incorporation de l'acide gras dans les membranes. Par ailleurs, comme l'ont proposé Bunde & Fried (1978), le 20 :4(n-6)

pourrait aussi être incorporé directement à travers les membranes du manteau et des branchies sans passer par le système digestif.

Le suivi des paramètres hématocytaires des huîtres au cours de cette expérimentation a permis de mettre en évidence un effet significatif de la supplémentation en 20:4(n-6) sur la concentration hématocytaire, l'activité de phagocytose, la capacité d'adhésion des hématocytes et la production d'espèces actives de l'oxygène.

Ainsi, les huîtres nourries avec les deux doses d'acide arachidonique (0.25 et 0.41 µg/ml d'AA) présentent les plus fortes concentrations hématocytaires tout au long de l'expérimentation

L'activité de phagocytose des hématocytes des huîtres a été significativement augmentée par la supplémentation en 20:4(n-6) après les deux premières semaines de conditionnement. Puis, cet effet disparaît. La corrélation positive avec le 20:4(n-6) est intéressante car cet acide gras est impliqué dans le processus de nodulation chez les insectes, c'est-à-dire la formation d'un amas d'hématocytes autour d'une particule à phagocyter (Stanley-Samuels & Pedibhotla, 1996 ; Stanley-Samuels *et al.*, 1997 ; Mandato *et al.*, 1997 ; Dean *et al.*, 2002 ; Lavine & Strand, 2002 ; Tunaz *et al.*, 2003). De même, comme les métabolites du 20:4(n-6) sont impliqués dans le processus d'adhésion des hématocytes chez les insectes (Mandato *et al.*, 1997), il est possible que ces métabolites soient aussi impliqués dans l'activité de phagocytose et la capacité d'adhésion des hématocytes des huîtres.

La production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) des hématocytes est aussi affectée par le conditionnement (Fig. 15). L'incorporation en grande quantité du 20:4(n-6) dans les membranes des branchies, et donc des hématocytes, est supposée avoir augmenté la disponibilité de cet acide gras pour la production d'eicosanoïdes. Il a été démontré que ces derniers stimulent la production de ROS chez les vertébrés (cf la revue de Calder, 2001). Par conséquent, les changements drastiques de composition en acides gras des membranes des branchies ont peut être induit une sur-production de ROS, et aussi une augmentation des produits issus de la peroxydation lipidique. L'ensemble a pu conduire à un « désordre inflammatoire » comme chez les vertébrés. Finalement, la production de ROS n'a pas été stimulée par l'utilisation des produits extra-cellulaires (ECPs) du *Vibrio aestuarianus*, alors que Labreuche *et al.* (soumise) et Lambert *et al.* (en préparation) ont démontré que les ECPs de cette bactérie pouvaient jusqu'à doubler la production de ROS des hématocytes. Par conséquent, l'incorporation de 20:4(n-6) dans les membranes a pu contre-carrer l'effet des ECPs sur la production de ROS des hématocytes.

Une confirmation du rôle des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) dans cette réponse immunitaire a été abordée par la recherche d'une activité lipoxygénase dans les branchies et dans l'hémolymphe. Cette activité qui est à l'origine de la formation des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique n'a pu être détectée chez l'huître.

In sterile sea water condition

After ECP addition

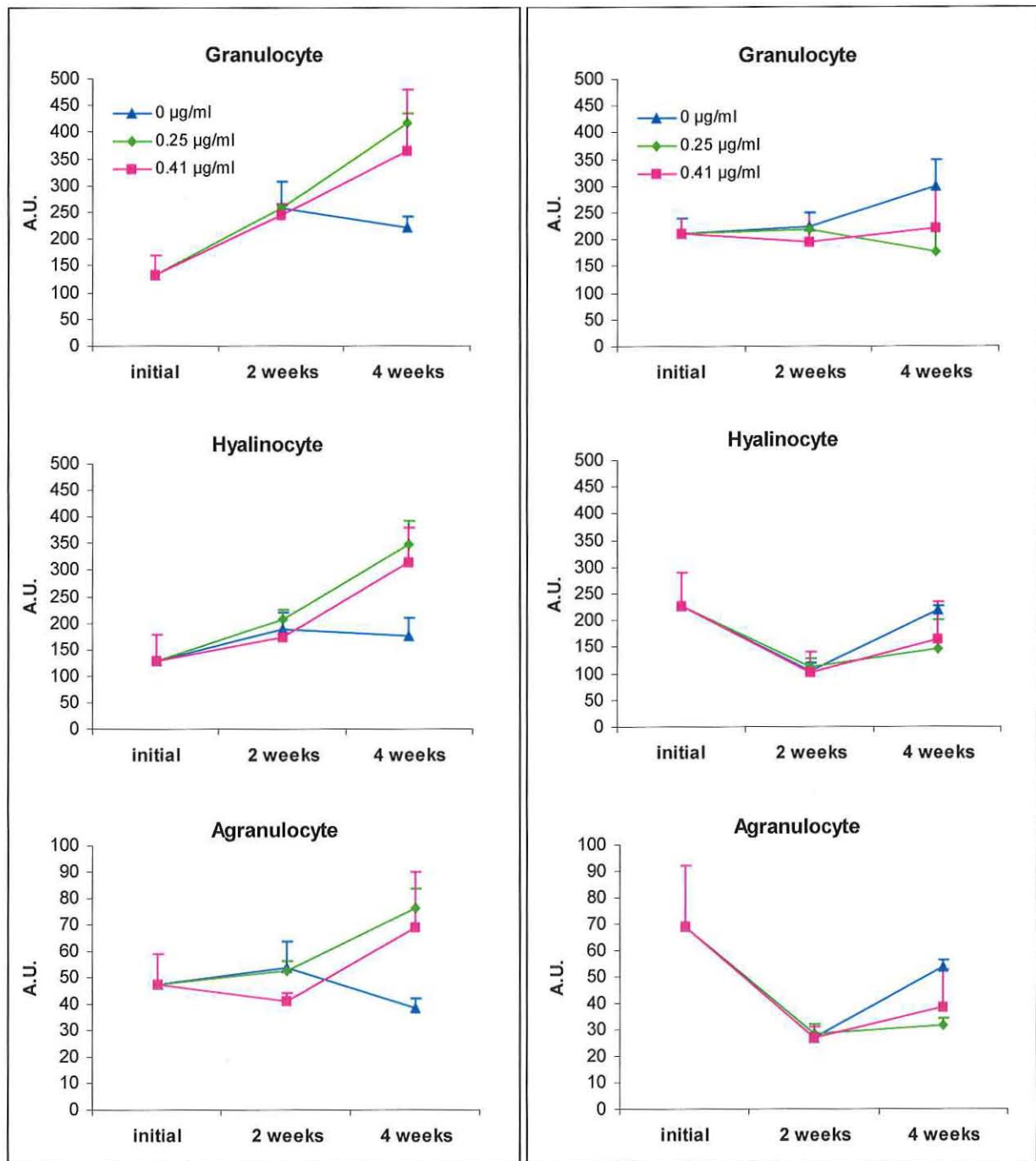


Figure 15: production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) des hémocytes d'huîtres nourries avec l'algue T-iso supplémentée par 0, 0.25 and 0.41 µg/ml d'acide arachidonique (AA). Les hémocytes sont incubés 2 heures avec de l'eau de mer stérile (graphes gauche) et avec 30 µg/ml de produits extra cellulaires de *Vibrio aestuarianus* (graphes droite).

## Tâche 3.4 – Comparaison de "R" et "S" au niveau de l'expression de gènes

### Le métabolisme des glucides chez *Crassostrea gigas*

Responsables sous-tâche : H. Bacca, A. Le Roux, A. Huvet, J. Moal

#### 1) Caractérisation de cDNA de gènes clés

A partir des séquences cDNA partielles de Glycogène Synthase et Pyruvate Kinase préalablement caractérisées, nous avons recherché leurs deux extrémités 5' et 3' (par PCR sur banques de cDNA de bord de manteau et d'hémocyte), clonées et séquencées pour obtenir la séquence cDNA complète de ces 2 gènes. La séquence complète de la GS a pu être placée sur un arbre phylogénétique et publiée en même temps que celle du transcript codant pour la Glycogène Phosphorylase (Bacca et al., sous presse).

#### 2) Profil saisonnier d'expression des gènes du métabolisme du glycogène (Gigarepro 2002)

Les huîtres conditionnées une année entière dans les bacs expérimentaux d'Argenton (quantité de nourriture constante, température et photopériode calquées sur les moyennes du bassin de Marenne-Oléron) ont été prélevées mensuellement. Le dosage enzymatique du glycogène a été réalisé à partir du protocole de Keppler et Decker (1974) en parallèle au dosage des glucides totaux. L'évolution saisonnière du glycogène dicte celle des glucides totaux pour l'animal entier. Le taux de glycogène diminue de mars à juillet. C'est la période de dégradation du glycogène. Puis la tendance s'inverse après le mois de juillet avec une augmentation des glucides totaux qui correspond aux phases de restructuration puis de développement du tissu de réserve.

La mesure des niveaux de transcrits de GP et GS par PCR en temps réel montre qu'il existe un cycle saisonnier d'expression des gènes du métabolisme du glycogène. Dans les palpes, l'expression des deux gènes est décalée dans le temps, le gène de la GP s'exprime préférentiellement au printemps alors que le gène de la GS montre un fort signal en automne. Globalement dans les palpes, au regard de l'évolution du glycogène et des résultats d'expression, il semble que la période d'utilisation des réserves soit marquée par un fort signal de mobilisation des réserves (expression de GP) au printemps (au moment de la gamétogenèse) tandis que la période de mise en réserve correspond à l'automne (période de repos sexuel). Il existe probablement une régulation saisonnière de l'expression des gènes du métabolisme du glycogène dans les palpes labiaux qui marque l'orientation de cette voie, le tout en relation avec l'état reproducteur de l'animal.

Pour la gonade, de même que dans les palpes, le pic d'expression du gène de la GS en octobre marque l'orientation du métabolisme vers la mise en réserve du glycogène. Le niveau de GP est fort en mars, ce qui pourrait correspondre au signal d'utilisation des réserves mais ce niveau diminue jusqu'en juillet alors qu'il culmine en mai dans les palpes. Ces variations du niveau de transcrits dans la gonade pourraient simplement être liées aux variations de la composition cellulaire de ce tissu, variation de la proportion de cellules germinales et cellules de réserves. Au mois de mai par exemple, d'après les résultats d'histologie, les gonades sont très majoritairement constituées de cellules germinales et il ne reste que très peu de cellules de réserve d'où un faible niveau de transcrits exprimés de façon spécifique par ces cellules. Cette remarque n'est pas vraie pour les palpes qui sont strictement constitués de cellules de stockage du glycogène. Le cycle saisonnier de niveau de transcrits des gènes du métabolisme du glycogène dans les palpes ne serait ici pas dicté par des variations de nourriture puisque la ration algale a été constante tout au long de l'année expérimentale, les seuls paramètres environnementaux fluctuant ont été température-photopériode dont on sait qu'ils modulent totalement l'horloge interne de la reproduction de *Crassostrea gigas* (Fabioux et al, sous presse).

### 3) Profil d'expression des gènes du métabolisme du glycogène en période critique chez les huîtres sélectionnées Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale (Gigarepro 2003) :

Au cours du conditionnement expérimental Gigarepro 2003 réalisé à Argenton, nous avons mesuré par PCR en temps réel l'expression de gènes clefs du métabolisme des sucres pour un lot d'huîtres "R" et un lot "S" et ce au cours de la période dite critique (juin 2003) pour des huîtres ayant subi un fort apport nutritif (CN3) ou une mise à jeun d'un mois. Deux types de profils ont été observés : (1) une nette différence de niveau de transcrits entre "R" et "S" en période critique ( $R > S$ ) et avec une diminution nette pour les "R" après mise à jeun pour obtenir une égalité de niveaux de transcrits entre "R" et "S". C'est le cas des enzymes hexokinase, GS, GP, PGM et PEPCK. (2) Les autres transcrits mesurés G6PDH, pyruvate kinase n'ont montré aucune différence entre "R" et "S" que ce soit après mise à jeun ou non, la mise à jeun n'ayant eu aucun effet. Ces résultats suggèrent une gestion des flux différente entre "R" et "S" en période critique : la voie de mise en réserve du glycogène serait notamment favorisée chez les huîtres "R" sans que cela n'ait de conséquence sur le niveau de glycogène stocké. En effet, aucune différence n'a été observée entre "R" et "S" pour le taux de glycogène ou de glucides totaux contenus dans l'animal entier. Toutefois, les conséquences biologiques de ces variations de l'expression des gènes du métabolisme énergétique, notamment GP et GS, ainsi que la compréhension des phénomènes de régulation nécessite le dosage enzymatique des ces enzymes. Pour ce faire, nous avons mis au point le dosage complexe de la GP chez l'huître *Crassostrea gigas*. De nombreux essais ont été réalisés pour aboutir à une préparation spécifique de l'échantillon nécessaire au bon déroulement du dosage (purification de l'extrait pour éliminer AMP et ATP présents dans l'échantillon ; fixation des formes a et b de la GP par NAF et EDTA au moment de l'extraction). De même, différents tests de concentration de différents facteurs ou co-facteurs (AMP, Pi, glycogène...) ont été nécessaires pour aboutir à un dosage fiable, répétable et analysable en micro-plaque. Une fois mis au point, les dosages enzymatiques de la GP ont été réalisés et sont en cours d'exploitation sur les échantillons du conditionnement Gigarepro 2003. Les premières données vont en partie dans le sens des résultats d'expression du gène de la GP. En effet, la mise à jeun diminue l'expression du gène comme l'activité des deux formes a et b de la GP et cela uniquement pour les huîtres "R". Pour les huîtres "S", la mise à jeun d'un mois n'a d'effet ni sur l'activité de l'enzyme, ni sur le niveau d'expression du gène. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une différence de gestion des flux de glucose entre "R" et "S". Les huîtres "R" montrent une plus forte réactivité au changement de niveau trophique que les huîtres "S". Toutefois, la compréhension des mécanismes de régulation reste encore à éclaircir.

### Bases fonctionnelles de la survie estivale chez *Crassostrea gigas*

Responsable sous-tâche : A. Huvet

Dans le cadre du programme Morest, les souches sélectionnées Résistantes et Sensibles à la mortalité estivale sur l'estran sont l'objet d'analyses moléculaires dans le but de rechercher des gènes de réponse aux stress et/ou à l'infection et donc de rechercher des caractères corrélés potentiellement explicatifs de cette différence de survie entre souches sélectionnées. Parmi les 137 ESTs caractérisés pour leur différentiel d'expression entre "R" et "S" en période critique (Huvet et al., 2004), un travail a été réalisé en 2004 pour identifier les ESTs qui apparaissent de façon récurrente comme différentiellement exprimés entre des lots d'huîtres "R" et "S" au cours de la période critique précédant les mortalités, et ce sous plusieurs conditions d'âge, de génération de sélection et d'environnement. La première étape de cette étude a consisté en la mise au point de la technique de macro-array et d'hybridation par des sondes marquées à la digoxygénine. Les analyses ont ensuite été effectuées sur des échantillons "R" et "S" (G2 et G3), âgés de 5 mois et de 16 mois, et prélevés en Baie des Veys, Bretagne Sud et à la nurserie Ifremer de Bouin. Les résultats ont permis la caractérisation de 27 ESTs différentiellement exprimés entre les lots "R" et "S". Parmi ceux-ci, quatre ESTs ont été identifiés comme différentiellement exprimés pour les expériences réalisées sur les juvéniles, qui présentent les différences de mortalité les plus importantes (R et S respectivement 4% et 75% à Bouin, 38% et 80% à Auray). Parmi ces quatre, deux coderaient pour des protéines inconnues. Leur extension jusqu'à la taille complète du

messenger (par PCR sur banque d'ADNc de bord de manteau) est en cours et devrait aider à leur identification ; de même pour les deux autres ESTs qui coderaient pour des protéines connues: une Bone Morphogenetic Protein (BMP) et une putative-precerebellin. Cette BMP pourrait avoir une implication importante dans la gamétogénèse et demande des travaux supplémentaires sur sa fonction. La putative-precerebellin a été caractérisée chez le saumon pour son intervention dans les processus de défense. Dans cette optique, ces candidats pourraient constituer des candidats sérieux pour de futures analyses fonctionnelles et la recherche de QTLs (Quantitative Traits of Loci) en relation avec la résistance aux mortalités estivales.

### *Sous-tâche 3.5.2 – Conditions de l'expression de la virulence. (adultes)*

#### **Etudes des facteurs de virulence de *V. aestuarianus* ; et de leur modulation**

*Responsables de la sous-tâche : Y. Labreuche, J.L. Nicolas*

#### **Introduction**

Une métallo-protéase a été isolée dans les ECP (Extracellulaire products) de *V. aestuarianus*. Elle possède un fort pouvoir pathogène. La séquence encore partielle de son gène devra être complétée. Il pourra alors être intégré dans un vecteur d'expression pour produire cette enzyme et pouvoir fabriquer un anticorps contre celle-ci. Etant probablement un des facteurs de virulence essentiel chez ce pathogène son expression (par PCR en temps réel, par dosage enzymatique ou par ELISA) sera mesurée chez les huîtres au cours de l'infection. Son dosage permettra également d'étudier sa modulation en présence de différents facteurs environnementaux : NH<sub>3</sub>, sulfure, anoxie, milieu nutritif (hémolymphe,...).

Il sera précisé les effets des ECP de la souche O1/32 sur les hémocytes de l'huître (effet dose sur le respiratory burst, la létalité, la phagocytose...).

Les premiers travaux de Yannick Labreuche au cours de sa thèse ont montré clairement le rôle des produits extra-cellulaires de la souche 32 de *V. aestuarianus* comme facteur de virulence. Une forte activité immuno-modulatrice (respiratory burst, test d'adhésion) de ces produits a été montré sur les hémocytes de *Crassostrea gigas*. Des essais complémentaires seront menés pour mieux comprendre les modes d'actions de ces produits, extra-cellulaires notamment en testant les fractions obtenues par passage sur colonne de gel-filtration. L'utilisation de culture primaire d'hémocytes pourra également permettre de tester rapidement la virulence de ces fractions en fonction des conditions de culture de la bactérie (T°C, S‰, phase de croissance...).

#### **Résultats**

##### **Purification métallo-protéase**

Au cours d'une purification de la métallo-protéase proche de celle de *V. anguillarum*, il est apparu une deuxième métallo-protéase à activité spécifique apparemment plus élevée et de nature inconnue. Des nouvelles purifications sont en cours pour procéder à leur isolement et à leur caractérisation.

##### **Modulation de la virulence par des paramètres abiotiques**

Une inhibition de la métallo-protéase est produite par l'hémolymphe et le mucus (125µg /ml) ajoutés dans le milieu de culture avec respectivement 45% et 95% d'inhibition. Le glucose présente également un fort pouvoir inhibiteur mais le glucose circulant semble être à des doses infimes à l'état dissous et seuls les tissus une fois dégradés pourraient exercer ce pouvoir inhibiteur. Ceci est toutefois à mettre en relation avec la baisse des sucres à la fin de la maturation qui pourrait lever cette inhibition.

D'autres paramètres vont être étudiés comme la température, la pression partielle d'oxygène.

## Effet des ECP sur les hémocytes

L'action des ECP (Extra Cellular Products) a été étudiée *in vitro* sur les hémocytes d'huître creuse. Ces ECP sont produits sur gélose nutritive (Marine agar). Une feuille de cellophane sépare le milieu de culture des bactéries et leurs produits. Les ECP sont ensuite séparés des bactéries par centrifugation après 48 H d'incubation.

L'effet d'inhibition des ECP est significatif dès la dose de 0.5 $\mu$ g sur l'adhésion et la capacité de phagocytose des hémocytes (fig 16 et 17). On observe également une activation du respiratory burst mais à des doses plus importantes ( $\geq 32\mu$ g) qui probablement ne sont pas atteintes *in vivo*. Ces expériences ont donné lieu à une publication (acceptée).

Il est à noter que les cellules de *V. aestuarianus* à la concentration de 50 cellules bactériennes par hémocyte sont inoffensives sur celles-ci après les mêmes temps de contacts des ECP.

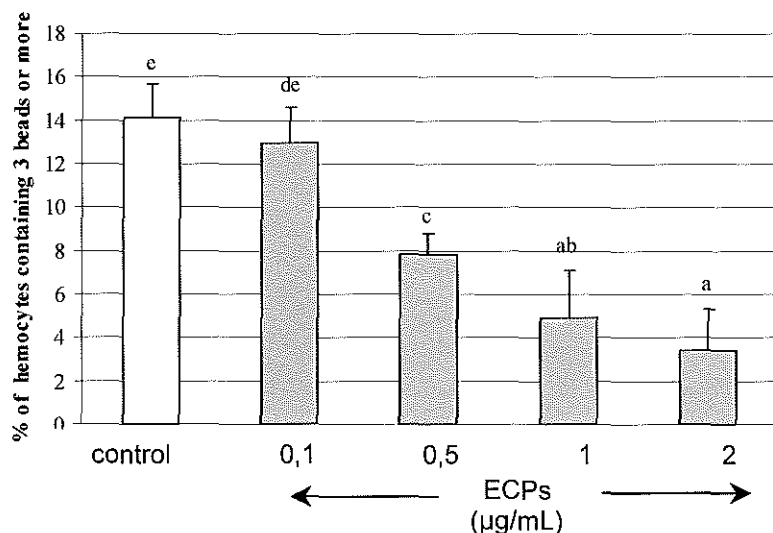


Figure 16 : Diminution du taux de phagocytose des hémocytes soumis à des concentrations faibles d'ECP pendant 1 heure

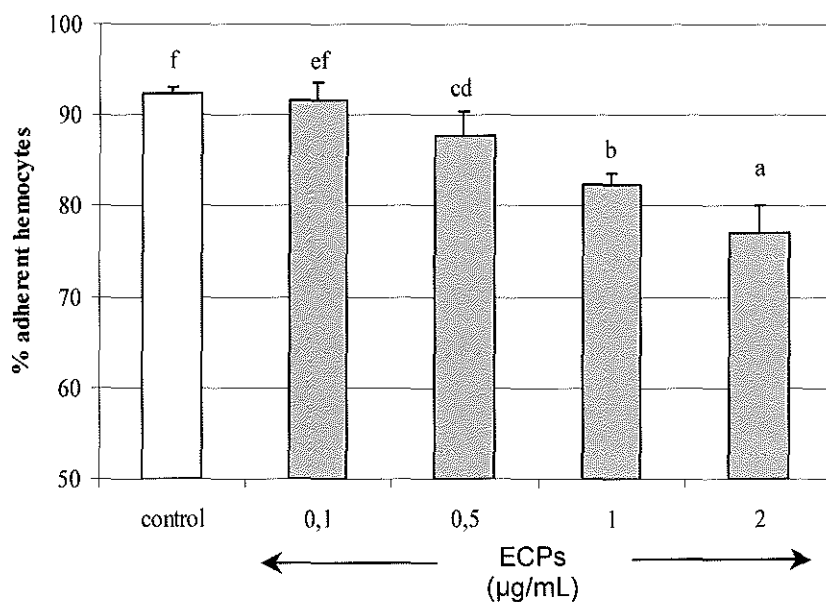


Figure 17 : Diminution de l'adhésion des hémocytes soumis à des concentrations faibles d'ECP après 3 heures.



L'étape suivante sera de faire des dosages *in vivo* de la métallo-protéase qui est le facteur de virulence principal des ECP, pour vérifier que sa concentration correspond bien à celle qui agit *in vitro* sur ces hémocytes

## WP5 - Synergie REPAMO-MOREST

### Tâche 5.1 – Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes

#### Sous-Tâche 5.1.2 – Mortalités intervenues dans le cadre MOREST

Responsable : M. Garnier, J.L. Nicolas

#### Introduction

Les données depuis 2001 montrent la présence fréquente de bactéries chez les huîtres moribondes. Autant en structures fermées (Ecloseries, Nurseries), les bactéries opportunistes sont quasi-systématiques autant en milieu ouvert ces bactéries septicémiques ne sont pas systématiquement retrouvées. On se trouve souvent en présence :

- soit d'un grand nombre de souches de bactéries sans dominance de l'une d'entre elles. Dans ce cas il est probable que ce ne sont qu'un envahissement par des souches banales. Les infections expérimentales confirment leur faible virulence voire leur absence de virulence.
- soit d'une faible charge bactérienne ou une quasi-absence de bactéries

Enfin dans les huîtres saines des lots en cours de mortalité comme des autres la situation est contrastée : elles hébergent généralement dans leur hémolymphe des bactéries mais à des quantités ne dépassant pas  $10^5$  Bact/ml. Elles ne révèlent généralement rien d'une mortalité en cours ou récente, excepté dans quelques rares cas.

#### Résultats

##### Les bactéries du genre *Vibrio* Bilan des isollements de bactéries dans les huîtres moribondes (2001-2004):

Le bilan des infections bactériennes trouvées dans les huîtres moribondes montre qu'au moins 40% des huîtres sont infectées par une seule bactérie, tandis que 40% autres sont envahies par plusieurs souches ou espèces bactériennes différentes. Dans ce dernier cas, elles incluent au moins des vibrios appartenant à *V. aestuarianus* ou au groupe des *V. splendidus* et souvent des *Pseudoalteromonas*. Dans les 20% restant aucune bactérie n'a pu être décelée en quantité significative c'est-à-dire  $>10^5$  ml<sup>-1</sup>. Lorsqu'une seule bactérie est présente *V. aestuarianus* est retrouvé dans la majorité des cas (Fig. 18).

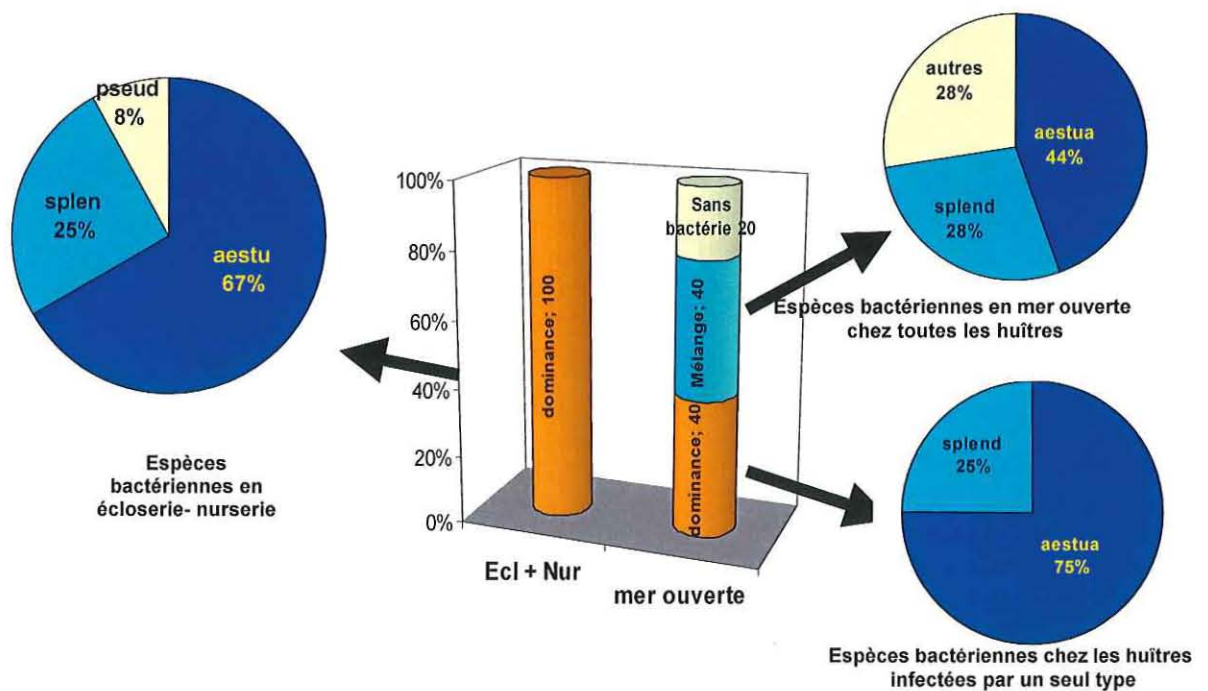


Figure 18 : Fréquence des infections bactériennes chez les huîtres moribondes et occurrence des groupes ou espèces retrouvées majoritairement ou en culture pure dans les huîtres sur parcs ou en éclosérie nursery.

En infection expérimentale, aucune des souches trouvées en mélange n'est pathogène tandis que la plupart des souches isolées en culture pure le sont. Parmi ces dernières quelques unes n'ont toutefois pas montré de pathogénicité (20% environ). Il ne s'agit pas d'une variabilité de virulence en fonction des conditions de cultures ou de l'état physiologiques des huîtres : l'inoculation de souches pathogène à des doses de  $10^7$  ou  $10^8$  est très rarement sans effet de mortalité. Il ne semble pas qu'il y ait eu aussi perte de virulence au cours des subculture, ce qui n'a jamais été observée sur les souches virulente. Plusieurs questions se posent :

- Est-ce qu'il faut, par exemple, que d'autres souches proches soient présentes pour que leur virulence s'exprime ? Comme l'a démontré F. Leroux, plusieurs souches peuvent agir en synergie pour augmenter leur virulence. Cependant, dans ce cas les souches inoculées, seules n'étaient pas sans pathogénicité.
- L'autre hypothèse est que ces souches ne possèdent que des facteurs de colonisations qui leur permettent d'envahir les huîtres dépourvues alors de toute défense immunitaire. Au quel cas elles ne seraient que des bactéries pionnières dans des huîtres condamnées de toute façon.
- Enfin l'affaiblissement des huîtres pourrait être dû à des bactéries plus localisées comme celles qui résideraient dans la glande digestive dont l'aspect apparaît très dégradé au moment des mortalités estivales. Les vibrios qui se développeraient par la suite dans l'hémolymphe ne seraient pas forcément identiques avec celles-là.

## WP6 – Caractérisation de l'environnement

### Tâche 6.3 - Modélisation

*Sous-Tâche n° 6.3.2 - Allocation d'énergie et modèle d'écophysiologie générique chez *Crassostrea gigas**

### Coll. CREMA

*Responsables Sous-Tâche : Stéphane Pouvreau & Marianne Alunno-Bruscia*

#### Introduction

En physiologie, l'une des approches implicitement utilisées est d'essayer de mesurer des cinétiques cellulaires et moléculaires pour comprendre le fonctionnement d'un organisme. L'autre approche est d'estimer les entrées et les sorties d'un système, pour en déduire les cinétiques qui ont eu lieu. C'est cette deuxième approche qui est privilégiée en bioénergétique. A l'heure actuelle, une nouvelle théorie (DEB theory) dans ce domaine voit le jour (Kooijman, 2000) et promet d'identifier les lois majeurs régissant l'entrée et l'utilisation de l'énergie dans un organisme vivant. A l'évidence, cette théorie commence à réussir une certaine conquête en bioénergétique des organismes marins (e.g. Cardoso et al., 2001 ; van der Veer et al., 2001).

Dans le cas de Morest, il apparaît un lien quantitatif entre croissance, gamétogenèse, survie et conditions environnementales (Observation sur Marennes-Oléron, Baie des Veys, Rivière d'Auray et sur le Site en condition contrôlée d'Argenton). L'application d'un modèle DEB au cas de l'huître creuse pourrait donc s'avérer utile au programme Morest (prédiction de période critique).

En outre, les modèles déjà existants pour l'huître creuse (e.g. Barillé et al., 1997 ; Ren et Ross, 2001) sont limités ou perfectibles : (1) ils sont en général dépendant du site et difficilement applicables de manière générique sans modifier la paramétrisation, voire la formulation conceptuelle ; (2) leur formulation est, dans certains cas, trop complexe et disproportionnée (par exemple, la physiologie de la nutrition est particulièrement détaillée, alors que celles de la respiration ou de l'allocation sont négligées) et (3) certains processus n'ont été que peu étudiés expérimentalement et leur formulation mathématique est liée à l'application de concepts insuffisamment validés - c'est le cas notamment de la gamétogenèse et des lois d'allocation d'énergie.

En 2003, l'objectif de cette tâche a visé, dans un premier temps, à créer une dynamique permettant, à terme, la construction d'un modèle générique chez l'huître creuse, puis chez les mollusques bivalves. Tout d'abord, mené en interne Ifremer, un atelier de sensibilisation à la modélisation et de formation à un logiciel (STELLA) a été mis en place en novembre 2003. Il a permis en outre de faire le point sur les modèles existants en bioénergétique des mollusques filtreurs. Cet atelier a été également ouvert aux participants du PNEC sur la capacité trophique et la restructuration de la baie du Mont Saint-Michel ainsi qu'à des collègues du CREMA et d'Arcachon intéressés aux aspects d'allocation d'énergie et de reproduction *in situ* de l'huître creuse, thématiques pour lesquelles la mise à disposition d'un modèle bioénergétique générique pour les mollusques bivalves fait défaut.

En 2004, une association (permise par l'obtention d'un programme européens de finance d'échanges bilatéraux, dans le cadre d'un plan d'action intégrée, DEBIB project) avec des chercheurs étrangers de renommée internationale en terme de bioénergétique chez les organismes marins (du NIOZ institute, Pays Bas) a permis de faire avancer significativement la construction d'un nouveau modèle de type DEB pour l'huître creuse. En parallèle, l'exploitation des données de gigarepro (Tâche 3.1.) a permis de fournir un jeu de données utiles à la construction d'un tel modèle. Ainsi, pour la première fois chez *Crassostrea gigas*, le cœur du modèle développé

ne fait pas appel aux concepts classiques du Scope for Growth (Bayne, 1976), mais repose sur une théorie de bioénergétique relativement récente et présentée exhaustivement par Kooijman (2000).

Nous présentons ici la démarche et les tous premiers résultats acquis en novembre 2004. Ces résultats servent de point de départ à une thèse 2004-2007 (Thèse GENERIC), pour laquelle nous avons obtenus les financements Ifremer et POITOU-Charentes. Dans le cadre de Morest, cette thèse se propose de retravailler sur l'ensemble du jeu de données disponibles sur la croissance et reproduction de *Crassostrea gigas*. Elle a aussi pour objectif de fournir un modèle d'allocation d'énergie utile à la thèse « écosystème BDV » menée en parallèle dans le cadre du programme Morest.

## Résultats

### Première paramétrisation du DEB-modèle pour *Crassostrea gigas*

La première étape dans la construction d'un modèle réside dans l'acquisition des paramètres. Nous avons donc réalisé une synthèse des données acquises en bioénergétique lors des expérimentations GIGAREPRO. Cette synthèse a aussi été complétée par une analyse bibliographique chez *Crassostrea gigas* afin d'estimer le mieux possible les paramètres nécessaires à un DEB (fig.19). Il serait trop compliqué ici de détailler la signification de l'ensemble des paramètres nécessaires à un modèle de type DEB, à ce titre nous renvoyons au travail de van der Veer et al. (2001) réalisé sur le poisson.

Néanmoins, et à titre d'exemple, nous allons fournir ici les valeurs obtenues chez *Crassostrea gigas* pour une liste (non-exhaustive) de certains paramètres clés, à savoir:

- 1)  $p_{Am}$  « Maximum Surface Area Specific Assimilation Rate »
- 2)  $T_A$  « Arrhenius coefficient »
- 3)  $E_M$  « Maximum energy density »
- 4)  $E_G$  « Volume specific cost for growth »
- 5)  $\kappa$  « Fraction of metabolism allocated to somatic growth and maintenance »
- 6)  $P_M$  « Volume Specific Cost of maintenance »

Ainsi, à partir des données synthétisées sur *Crassostrea gigas*, il nous a donc été possible d'obtenir une première estimation des paramètres clés présentés ci-dessus. Les valeurs obtenues sont présentées ci-dessous.

$$\{p_{Am}\} = 126.4 \text{ J.cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$$

$$T_A = 6911 \text{ K}^{-1}$$

$$[E_m] = 6500 \text{ J.cm}^{-3}$$

$$[E_G] = 6380 \text{ J.cm}^{-3}$$

$$\kappa = 0.65$$

$$[p_M] = 14 \text{ J.cm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$$

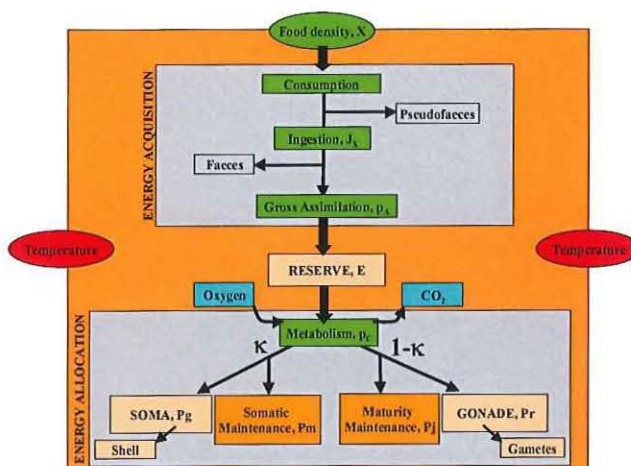
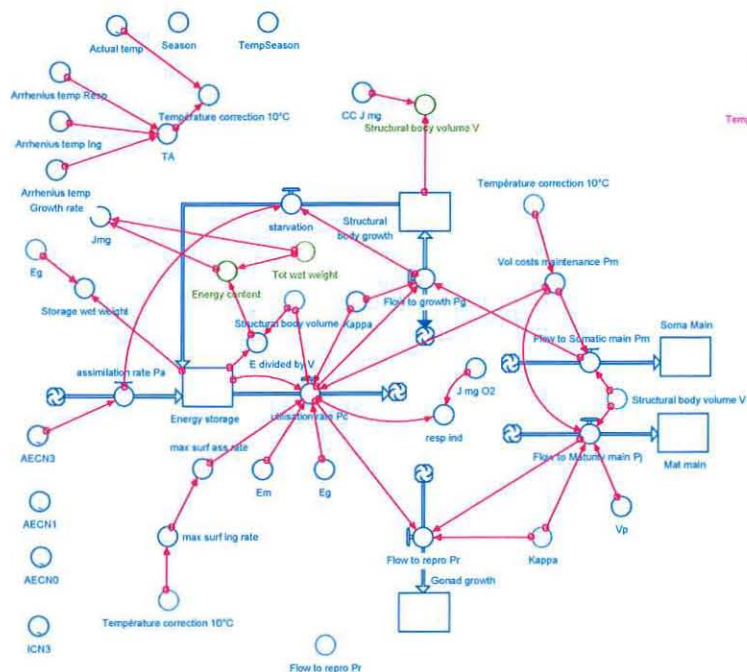


Figure 15 : représentation schématique d'un DEB-modèle

Ces données ont ensuite été injectées dans un modèle construit sous STELLA (figure 20) dont les concepts et le code sont donnés par van der Veer et al. (2001).

Figure 20 : Présentation du DEB-modèle pour *C. gigas* sous le logiciel STELLA.



### Première simulation du DEB-modèle pour *Crassostrea gigas*

Nous avons fait tourner le modèle sur les données issues de GIGAREPRO 2004. La comparaison des simulations par rapport aux observations est présentée à titre d'information sur la fig.21. On constate une relativement bonne adéquation, présageant des perspectives intéressantes pour l'utilisation du DEB-modèle chez les mollusques marins.

Les paramètres nécessaires au DEB méritent certaines expérimentations bien spécifiques, nous prévoyons d'ores et déjà une à deux expérimentations en conditions contrôlées pour 2005, afin de confirmer les valeurs (1) du paramètre « Arrhenius coefficient,  $T_A$  », et (2) du « functional response,  $f$  ».

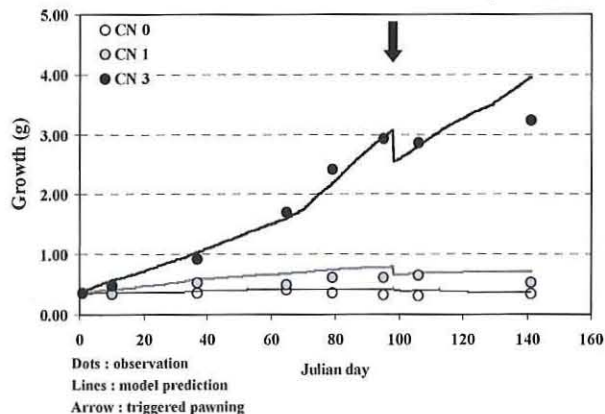


Figure 21 : Adéquation entre prédiction du modèle (ligne) et observation (point) pour les 3 conditions trophiques CN0, CN1 et CN3 de l'expérimentation Gigarepro 2004.

## Bibliographie

**Bayne, B.L., 1976.** Marine mussels : their ecology and physiology. Cambridge Univ. Press. 506 pp.

**Barillé L., Héral M., Barillé-Boyer A.-L., 1997.** Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. Aquat. Living Resour., 10, 31-48.

**Kooijman S.A.L.M., 2000 .** Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge Univ. Press. 424 p.

**Ren J.S., Ross A.H., 2001.** A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Ecological Modelling, 142,105-120.

**Cardoso, J.F.M.F., van der Meer, J., van der Veer, H.W. 2001.** Interspecies comparison of energy flow in some North Atlantic bivalve species by means of dynamic energy budgets. ICES, CM 2001/J :43, 23 p.

**Van der Veer, H., Kooijman, S., van der Meer J., 2001.** Intra- and Interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets. J. Sea Reseach 45, 303-320.

# Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR - équipe RSA - Plouzané

---

Responsable : D. Moraga

Isabelle Boutet, Elise David, Arnaud Tanguy

Adresse : Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) Equipe Réponse au Stress et Adaptation (RSA) - Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) ; Université de Bretagne Occidentale (UBO) ; Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, FRANCE.

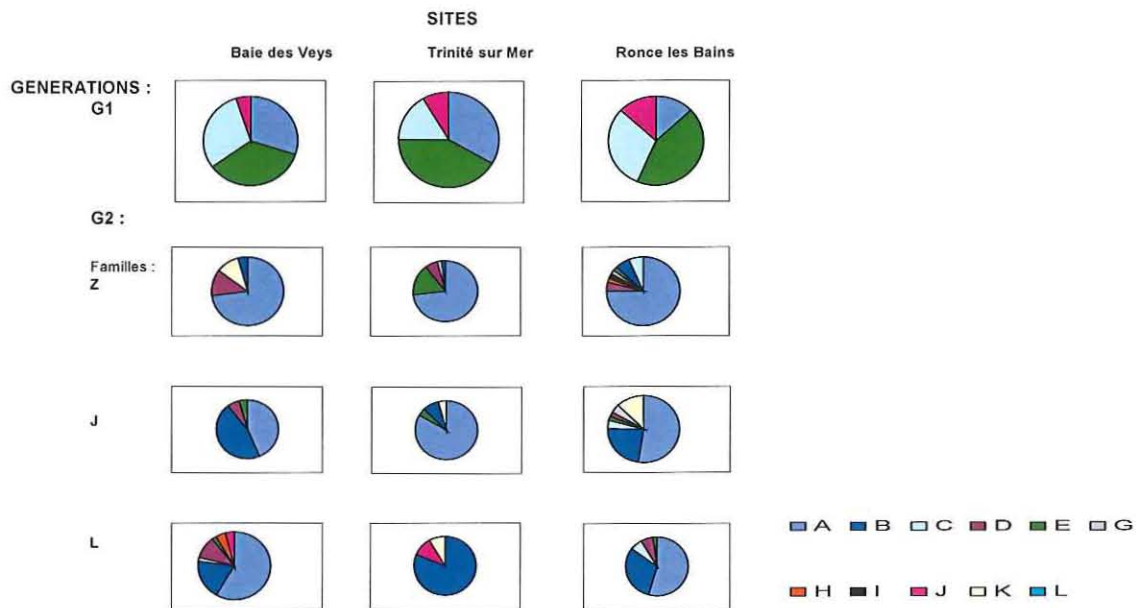
## Introduction

L'équipe Réponse au Stress et Adaptation (RSA) du LEMAR, est spécialisée dans l'étude des mécanismes moléculaires des processus adaptatifs mis en place par les bivalves marins en réponse aux fluctuations de leur environnement. Dans ce cadre, elle développe notamment des outils génétiques et protéiques d'évaluation des effets des divers stress environnementaux sur la structure génétique des populations de bivalves. Dans ce contexte, l'équipe intervient dans le volet génétique des « Work Package » 1 (mise au point d'outils) et 2 (caractérisation des mortalités *in situ*) ainsi que dans le WP 3 (expérimentation phase I).

## WP1 - mise au point d'outils

### Tâche 1.1 - Génétique

Au cours de l'année 2004, des études de polymorphisme du gène CgMT1 codant pour une métallothionéine (protéines de détoxification et d'homéostasie des métaux) ont été conduites au sein des familles Morest au niveau des 3 sites d'étude retenus (Ronces-les-Bains, Auray et Baie des Veys), sur les générations G0, G1 et G2. Une étude antérieure du polymorphisme du gène CgMT1 réalisée en milieu naturel en 2002 avait déjà montré l'existence de profils caractéristiques des individus résistants vis-à-vis de la pollution par les métaux lourds. Les premiers résultats obtenus sur le suivi de l'évolution des fréquences des différents haplotypes de l'exon 2 chez les familles Morest ont montré des variations significatives de fréquences de ces différents haplotypes entre les générations. Ces premiers résultats suggèrent que 3 haplotypes particuliers (A, B, et K, figure 1) dont les fréquences augmentent au cours des générations, pourraient être associés à des caractères de résistance chez les survivants des sensibles. A l'inverse, les haplotypes C et E pourraient être associés à des caractères de sensibilité.



**Figure 1 :** fréquences haplotypiques observées pour l'exon 2 de CgMt1 chez des familles MOREST, par génération, site et famille.

D'autres marqueurs génétiques sont actuellement développés par le biais de l'utilisation des banques soustractives (SSH). Durant l'année 2003, environ 350 gènes impliqués dans les processus de détoxification des hydrocarbures et des pesticides avaient ainsi été identifiés. En 2004, la même méthode nous a permis d'obtenir plus de 600 séquences correspondant à des gènes potentiellement régulés par l'hypoxie (Figure 2). Un certain nombre de fonctions physiologiques ont été identifiées comme impliquées dans la réponse à ce stress majeur pour les organismes benthiques : régulation des protéines (facteurs d'élongation 1-alpha et 2, facteur de transcription BTF3), communication cellulaire et réponse immunitaire (cavortine, glutathione peroxidase), protéines de stress (superoxyde dismutase, HSP70), métabolisme énergétique (glycogène phosphorylase, anhydrase carbonique), etc. Un travail de recherche de polymorphisme sur quelques uns de ces marqueurs est en cours (delta-9 désaturase, glutamine synthétase,...).



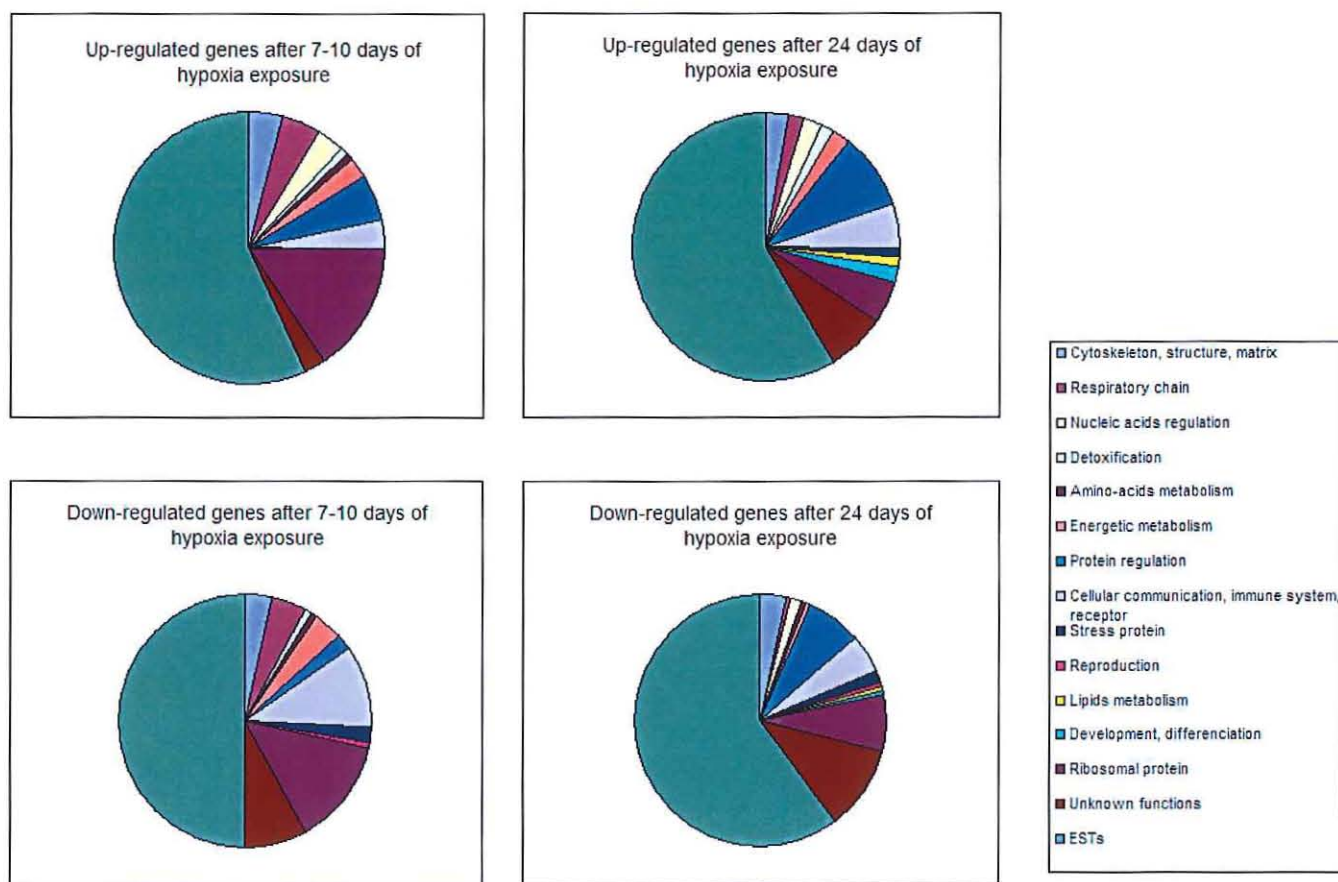


Figure 2 : résultats des banques SSH hypoxie chez *Crassostrea gigas*.

Les différentes séquences partielles d'ADNc obtenues au laboratoire par les banques soustractives en réponses à divers stress (hypoxie, contaminations chimiques comme les hydrocarbures ou les pesticides, salinité), ajoutées à d'autres séquences d'ADNc (obtenues en réponse à des parasites, lors du développement larvaire et en fonction du sexe), ont servi à la fabrication d'une micropuce à ADN multistress. Cette biopuce rassemble ainsi 3000 séquences connues ou inconnues d'ADNc de *Crassostrea gigas*. Elle permettra dans les mois prochains de tester les motifs d'expressions de ces différentes séquences chez différentes familles Morest et notamment de comparer les réponses des lots dits résistants et des lots dits sensibles.

## WP3 - Expérimentations phase I. "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités

### Tâche 3.1 - Energétique et température, conditions limites – Expérimentation pluridisciplinaire : VALI (VAleurs Llimites)

En collaboration avec le Laboratoire Physiologie des Invertébrés d'Ifremer et l'équipe IHP du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'IUEM, nous avons suivi l'évolution de marqueurs génétiques de stress (expression de gènes candidats) lors de l'exposition de *Crassostrea gigas* à des périodes quotidiennes d'hypoxie (4h à 20% de saturation en O<sub>2</sub> pendant 15 jours), en comparant les réponses de lots sensibles et résistants. Les premiers résultats d'expression de l'anhydrase carbonique (enzyme du métabolisme du CO<sub>2</sub>, impliquée dans la respiration et la calcification). Les individus provenant des lots sensibles expriment ce gène plus faiblement que les individus provenant des lots résistants, et ce dans les témoins et les expérimentaux. Ces différences semblent cependant s'estomper au cours du temps.

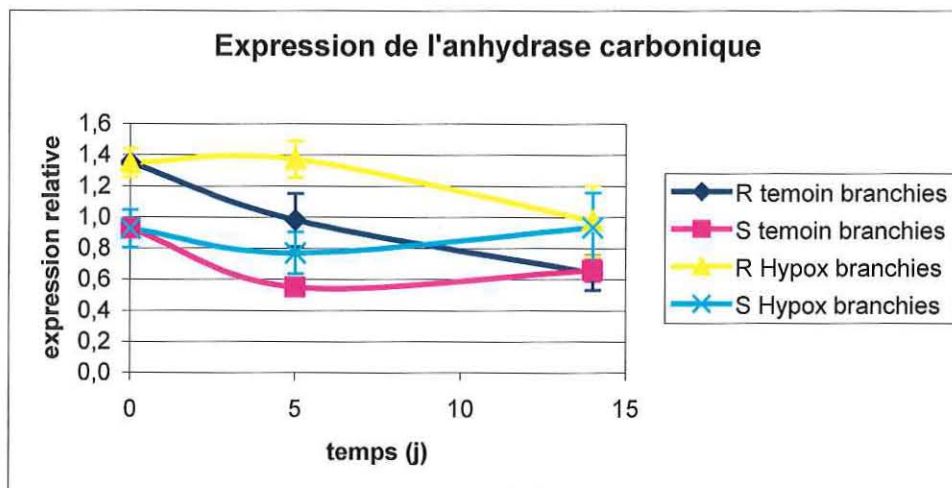


Figure 3 : expression des ARNm de l'anhydrase carbonique mesurée dans les branchies dans le cadre des actions VALI.

Des analyses d'expressions d'autres marqueurs génétiques sur les échantillons VALI sont en cours.

## Publications

- Boutet, I.,** Meistertzheim, A. L., **Tanguy, A.** Thebault M. T., & **Moraga, D.** 2005 Molecular characterisation and expression study of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. Comparative Biochemistry and Physiology, part C in press.
- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D.** 2004. Identification and expression of four mRNA sequence encoding glutathione S-transferase pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. Marine Biology. 164: 53-64.
- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D.** 2004. Molecular identification and expression of two non P450 enzymes, Monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biochimica and Biophysica Acta. *Gene Structure and Expression*. 1679, 29-36.
- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D.** 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene. 329 : 147-157.
- David, E., Tanguy A.,** Pichavant K. and **Moraga D.,** 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. In prep.
- Tanguy A., Boutet, I.,** Laroche, J. & **Moraga D.** 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticides exposure. Journal FEBS. 272: 390-403.
- Tanguy, A., Boutet, I. & Moraga, D.** 2005. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. Biochimica and Biophysica Acta. *Gene Structure and Expression*. 1681, 116-125..
- Tanguy, A., Guo, X. & Ford, S E.** 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in the Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. Gene. 338: 121-131.

### Congrès internationaux

- Boutet, I., Tanguy, A., David, E. & Moraga, D.** 2004. Molecular identification of xenobiotic regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. SETAC Europe 14<sup>th</sup> Annual Meeting Prague, Czech Republic 18 April-22 April. Une affiche scientifique.
- David, E.,** Marchand, J., **Tanguy, A., Boutet, I.,** Quiniou, L., Laroche, J. & **Moraga, D.** 2004. Identification of hypoxia-induced genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the European flounder *Platichthys flesus*. SETAC Europe 14<sup>th</sup> Annual Meeting Prague, Czech Republic 18 April-22 April. Une affiche scientifique.
- David, E., Tanguy, A. & Moraga D.** 2005. Molecular response of anti-oxydant enzymes coding genes to hypoxia exposure in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Second Workshop on Comparative Aspects of Oxidative Stress in Biological Systems February 15-18, 2005. La Paz, Baja California Sur, Mexico. Une affiche scientifique.
- Quiniou F., Damiens G., His E., Caisey X, **Moraga D., Tanguy A., Boutet I.,** Gnassia-Barelli M. Roméo M. 2004. Développement des biomarqueurs enzymatiques et protéiques chez les larves d'huître, pour l'évaluation précoce de stress environnementaux. ACFAS (Canada). Une présentation orale.

### Autres congrès

- David, E., Tanguy, A.,** Pichavant, K., **Moraga' D.** 2004. Identification de gènes régulés en condition d'hypoxie chez l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* en conditions expérimentales. 108<sup>ème</sup> Congrès annuel de la Société Zoologique de France. Reims 4-6 Octobre 2004. Présentation orale.

# Université Bretagne Occidentale - IUEM - LEMAR équipe IHP - Plouzané

---

Responsables : Christophe LAMBERT et Philippe SOUDANT

Adresse:

Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) ; Université de Bretagne Occidentale (UBO) ; Place Copernic, technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, FRANCE.

## Introduction

L'équipe "interaction hôtes-pathogènes" (IHP) du LEMAR, est spécialisée dans l'étude des mécanismes fins des interactions hôtes-pathogènes chez les bivalves marins et de leur modulation par l'environnement. Dans ce cadre, elle développe des outils d'évaluation des paramètres hématocytaires des bivalves.

En 2004, l'équipe IHP s'était proposée de réaliser, notamment, 4 actions majeures pour répondre aux objectifs du programme Morest. Les résultats obtenus dans le cadre de ces actions majeures ainsi que dans le cadre d'autres actions proposées (mise au point d'outils....) sont résumés ci-après.

## WP1 - mise au point d'outils,

### Tâche 1.3 - Immunologie

Dans le cadre du stage de maîtrise de Nathalie Byrne, l'adaptation du protocole du « killing index » [1] a été finalisé, notamment en utilisant une nouvelle souche bactérienne (*Vibrio splendidus* ATCC 25914) pour le test de routine ainsi que sa variante antibio-résistante. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de ce biotest sur les hémocytes d'huître *Crassostrea gigas*, en évitant les problèmes de contamination bactérienne de l'hémolymphe rencontrés lors de l'utilisation de ce test en 2003.

## WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*,

### Tâche 2.1 - Effet génétique,

#### 2.1.4 : comparaison "R" et "S" au niveau de marqueur génétique.

En 2004, Les données obtenues et traitées en 2003 ont fait l'objet d'une mise en forme style « publication » et ont été transmises à l'équipe RSA (Arnaud Tanguy) du LEMAR pour être intégrées dans une publication couplant génotype (PGM : phosphoglucomutase) et phénotype (paramètres hématocytaires).

## WP3 - Expérimentation phase I, "R" et "S" reproduction expérimentale des mortalités.

### Tâche 3.2 - Energétique et température : définition des conditions limites.

#### Tâche 3.2.2 - adulte, VALI.

Dans le cadre de l'expérience VALI, deux lots d'huîtres, résistantes "R" et sensibles "S", maintenus en condition contrôlée à 19°C pendant la période de pleine gamétogénèse (juin) ont été soumis pendant 2 semaines à 4 conditions : hypoxie chronique (4h00 à 20% d'O<sub>2</sub> par jour/ normoxie, traitement antibiotique (Erythromycine, 10 ppm) / pas d'antibiotique.

Sur cette 1<sup>ère</sup> phase de l'expérience, deux questions principales ont pu être traitées:

- Effet d'une hypoxie chronique sur les paramètres hématocytaires d'huîtres creuses maintenues à 19°C en pleine gamétogénèse.
- Différence des paramètres hématocytaires d'huîtres "R" ou "S".

Dans une seconde phase, 5 jours après le démarrage du stress hypoxique, des animaux "R" et "S" ont été soumis à un stress d'infection bactérienne (injection dans le muscle de 5.10<sup>6</sup> cellules de la souche *Vibrio aestuarianus* 01-32).

Au cours de cette infection expérimentale, les paramètres hématocytaires des huîtres ont été suivis 24 et 48h00 après injection.

Sur cette 2<sup>ème</sup> phase expérimentale, la question principale est celle de l'effet d'une infection bactérienne sur les paramètres hématocytaires compte tenu de la composante génétique (différence R/S).

Après une analyse (qui reste à détailler), les principaux résultats obtenus montrent que :

- Effet d'une hypoxie chronique : voir résultats § 0, p. 81.
- Différence "R" et "S" : Des différences entre les paramètres et les activités hématocytaires des huîtres "R" et "S" ont été observées au cours de la première phase expérimentale (J0 à J13) toutes conditions confondues (hypoxie/ normoxie, traitement antibiotique ou non). On remarque notamment que les granulocytes des huîtres "R" sont en plus fort pourcentage, en plus forte concentration et sont moins denses que ceux des huîtres sensibles (Figure 16, p.78). De même les hémocytes des huîtres "R" présentent un taux de phagocytose supérieur aux hémocytes d'huîtres "S" (Figure 16, p.78). Ces résultats semblent aller dans le sens d'un meilleur état « immunitaire » des huîtres "R". Cependant des mortalités équivalentes et élevées (>35%) ont été enregistrées dans les 2 lots ("R" et "S" sans antibiotique : Figure 17, p.79).
- En fonction de la présence ou non d'antibiotique, les individus sélectionnés comme résistants "R" ou sensibles "S" ne présentent pas la même réponse hématocytaire. En présence d'antibiotique, c'est-à-dire avec une charge bactérienne réduite, donc un stress « bactérien » réduit, on ne distingue pas les paramètres hématocytaires des huîtres "R" de ceux des huîtres "S" que ce soient leurs taux de phagocytose, la concentration hématocytaire et la production de radicaux libres oxygénés (RLO) par les granulocytes (Figure 18, p.79). De même il n'y a pas de différence significative de mortalité entre les animaux "R" et "S" traités aux antibiotiques (Figure 19, p.80). Par contre, en l'absence de traitement antibiotique, les huîtres "R" présentent une concentration hématocytaire, un taux de phagocytose et une production de RLO supérieurs aux huîtres "S" (Figure 18, p.79). Ces résultats semblent, là encore, aller dans le sens d'un meilleur état « immunitaire » des huîtres "R" en présence d'un stress bactérien (sans antibiotique). Cependant pour cette condition, des mortalités équivalentes et élevées (>40%) ont été enregistrées dans les 2 lots (Figure 19, p.80).

- Les paramètres hématocytaires des huîtres après infection par la souche 01/32 de *Vibrio aestuarianus* apparaissent fortement modulés. De plus cette modulation est différente selon la composante génétique, "R" ou "S" (Figure 20, p.80) : L'injection du vibrio entraîne une baisse du taux de phagocytose chez les huîtres sensibles alors qu'il est inchangé chez les "R"; une forte réduction du % de granulocytes est observée chez les "R" alors qu'elle est faible chez les "S"; aucune modification de la capacité d'activation de la production des radicaux libres oxygénés (RLO) n'est notée pour les "R", alors qu'elle est augmentée chez les "S" (Figure 20, p.80). Par contre, la production de RLO dans l'EMS n'est pas modifiée après injection du vibrio, et ce pour les "R" et les "S" (Figure 20, p.80). Ces modifications différentielles (R-S) des paramètres hématocytaires après injection d'une bactérie pathogène n'ont pas pu être couplées à la survie. En effet, les fortes mortalités enregistrées au cours de l'expérience n'ont pas permis le maintien d'un cheptel suffisant pour suivre ce paramètre.

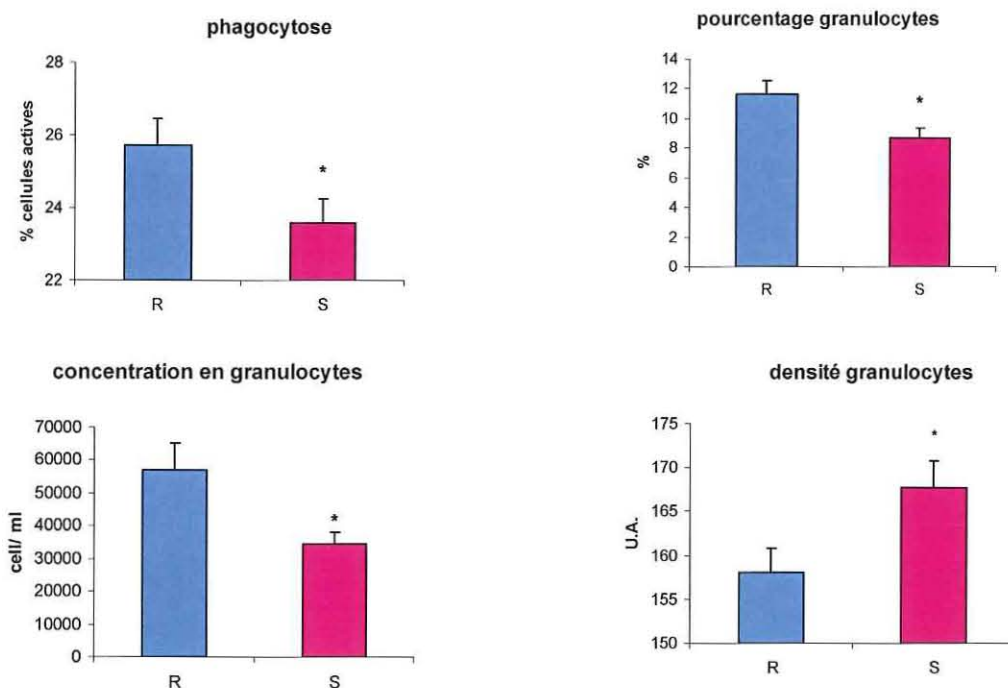


Figure 16 : Comparaison de quatre paramètres hématocytaires (moyenne à J5 et J13) d'huîtres sélectionnées comme résistantes (R) ou sensibles (S) et maintenues à 19°C en pleine gamétogenèse, toutes conditions confondues : hypoxie/ normoxie, traitement antibiotique ou non (Phagocytose : % de cellule active; concentration en granulocyte : cellule par ml; densité des granulocytes: unité arbitraire).

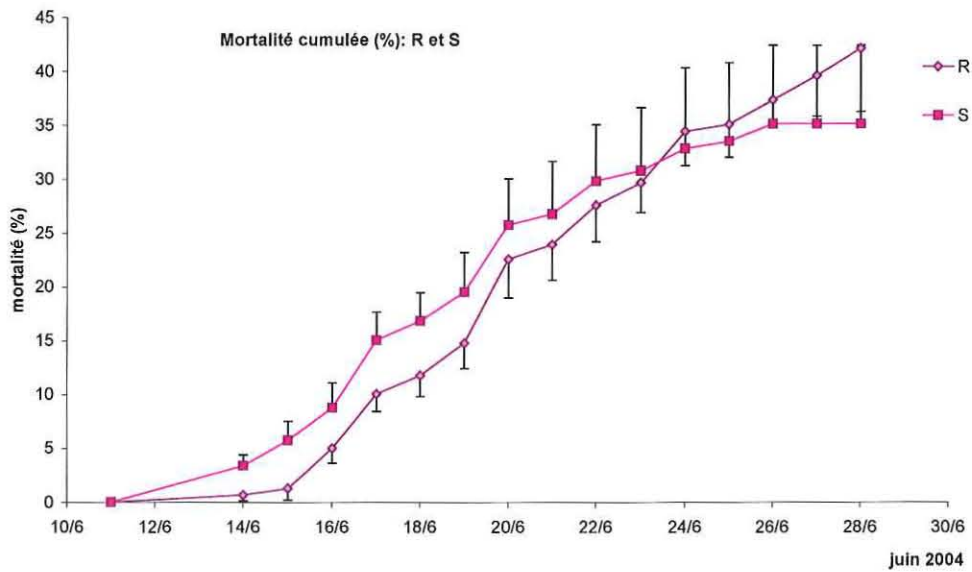


Figure 17 : Mortalité cumulée (moyenne  $\pm$  SE, n= 4) des lots d'huîtres résistantes (R) et sensibles (S) au cours de l'expérience VALI (huîtres maintenues à 19°C en pleine gamétogenèse, toutes conditions confondues : hypoxie/ normoxie, traitement antibiotique ou non).

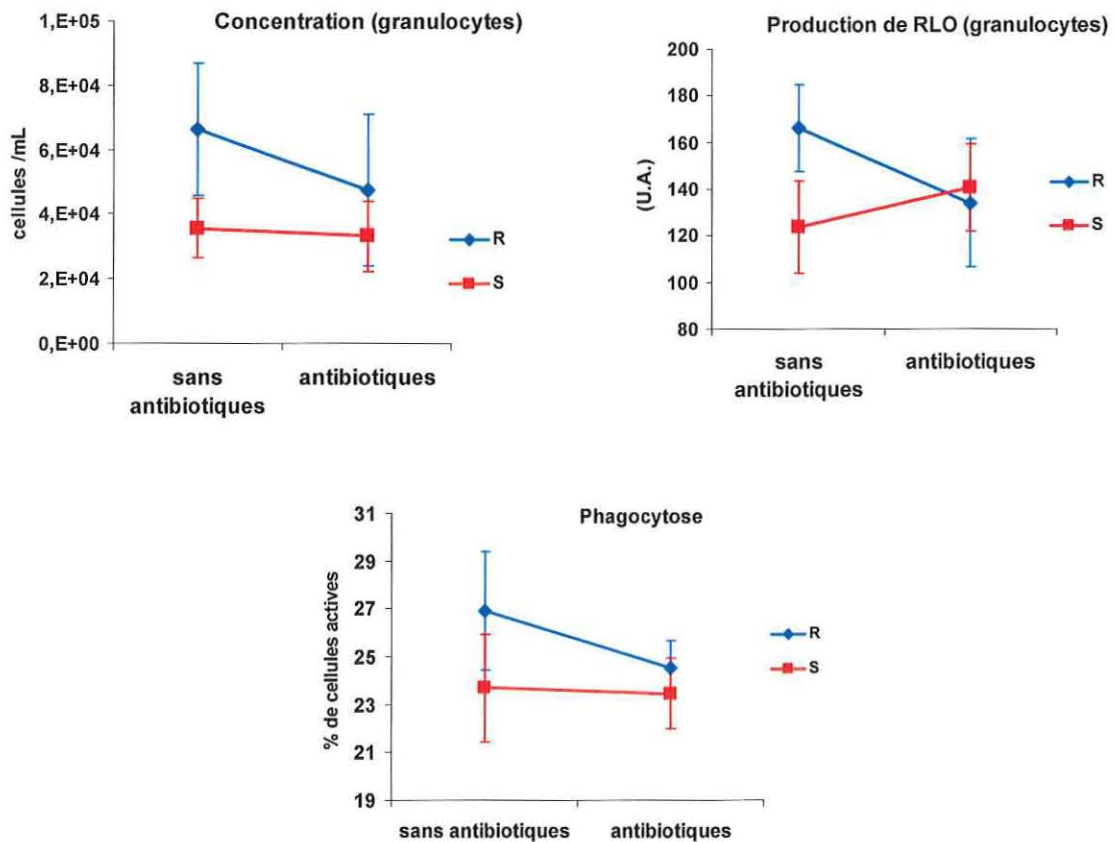


Figure 18 : Comparaison de trois paramètres hémyctaires (moyenne à J5 et J13) d'huîtres sélectionnées comme résistantes (R) ou sensibles (S) et maintenues à 19°C en pleine gamétogenèse en fonction de la présence ou non d'antibiotique (Erythromycine 10 ppm). (U.A. : unité arbitraire).

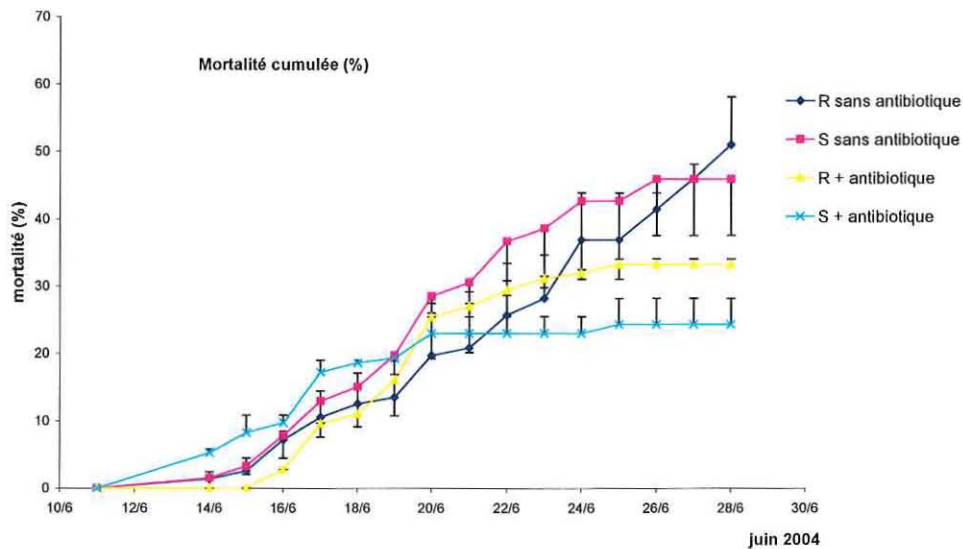


Figure 19 : Mortalité cumulée (moyenne  $\pm$  SD,  $n = 2$ ) des lots d'huîtres résistantes (R) et sensibles (S) traitées ou non aux antibiotiques (Erythromycine 10 ppm) au cours de l'expérience VALI (huîtres maintenues à 19°C en pleine gamétogenèse). Il n'existe pas de différence significative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) de mortalité entre R et S quelle que soit la condition (antibiotique ou non).

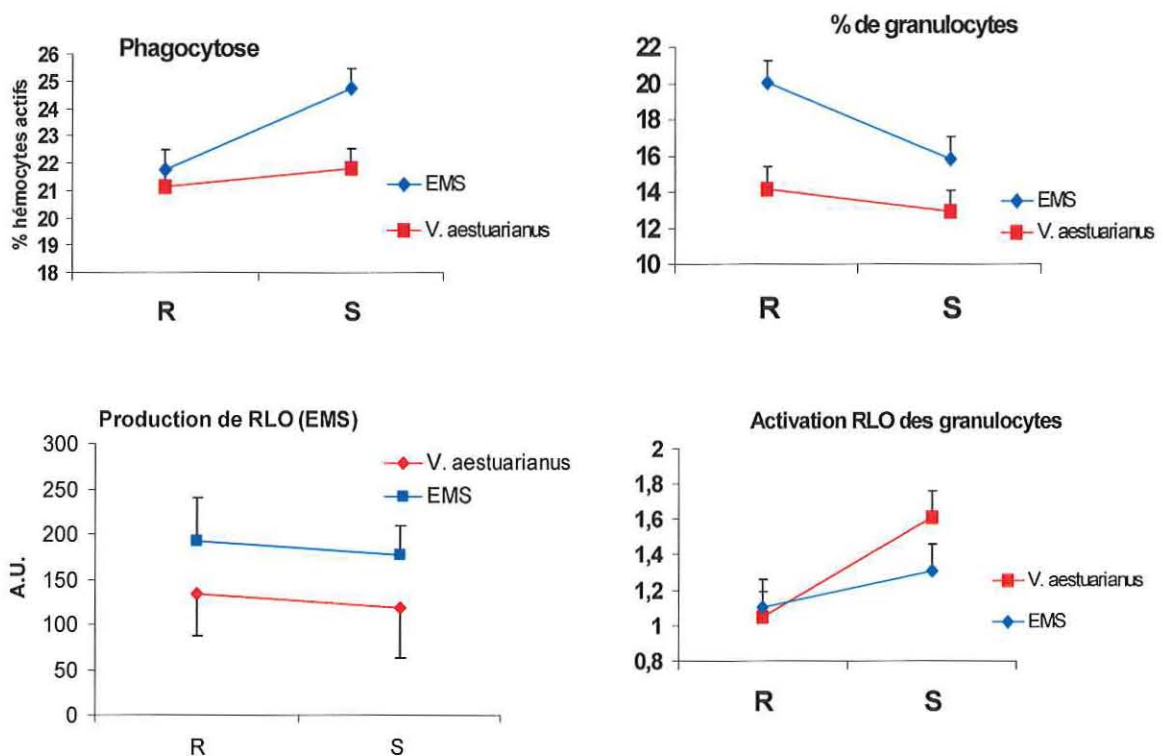


Figure 20 : Evolution de quatre paramètres hématocytaires d'huîtres sélectionnées R et S après injection dans le muscle de  $5 \cdot 10^6$  cellules de la souche pathogène 01/32 de *Vibrio aestuarianus* ou d'eau de mer stérile (EMS). (Phagocytose : % de cellule active; Activation RLO des granulocytes : ratio de la production de radicaux libres oxygénés (RLO) par les granulocytes après activation, divisé par la production dans l'eau de mer, sans activation ; production de RLO : niveau de synthèse de radicaux libres oxygénés dans l'eau de mer en unité arbitraire A.U.).



## Tâche 3.3 - Stress

### *Sous-tâche 3.3.2 - Hypoxie/anoxie.*

Deux expérimentations ont été menées au cours de l'année 2004 pour tester l'effet d'un stress hypoxique sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Le stress appliqué consistait, par bullage d'azote dans les bacs d'élevage, à baisser à 20% le niveau d'oxygène dans l'eau de mer. Le bullage est réalisé pendant 4 heures, 1 fois par jour.

La 1<sup>ère</sup> expérience a été réalisée en mars sur des animaux hors gamétogenèse et le suivi des paramètres hématocytaires a eu lieu à J0, J1 et J4.

La seconde expérience (dans le cadre de VALI, cf. §2.3) a été réalisée en juin sur des animaux en pleine gamétogenèse. Les paramètres hématocytaires ont été évalués à J0, J5 et J13.

L'ensemble des résultats obtenus et les **premières analyses rapides montrent que le stress hypoxique appliqué (stress chronique, 20% O<sub>2</sub>, 2 à 3 heures par jour) n'entraîne pas de modifications majeures des paramètres hématocytaires mesurés.**

### *Sous-tâche 3.2.3 - Effet de la qualité de la ressource trophique*

Deux actions ont été menées par l'équipe IHP du LEMAR dans le cadre de ce WP. La première intitulée « Etude de l'effet de l'acide arachidonique sur les réponses immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas* » a été réalisée dans le cadre du stage de DEA de Mlle Emilie Giudicelli et la seconde intitulée « Influence du dinoflagellé *Alexandrium catenella* sur la réponse immunitaire de l'huître *Crassostrea gigas* » dans le cadre de l'accueil de Mlle Hélène Hégaret (doctorante) au laboratoire.

#### **Etude de l'effet de l'acide arachidonique sur les réponses immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas***

La quantité et la qualité du régime alimentaire des huîtres sont des paramètres importants d'explication des modulations des paramètres hématocytaires. Des premiers travaux [2] ont montré l'influence du régime algal et notamment de sa composition en acides gras sur les paramètres immunitaires des bivalves. C'est dans ce cadre qu'une expérience de complémentation en acide arachidonique (C20 :4(n-6)) du régime alimentaire d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* adultes a été réalisée, en milieu contrôlé.

Les résultats montrent **une modification des paramètres hématocytaires pour les huîtres nourries avec un régime complétement en acide arachidonique** avec notamment **une augmentation de la concentration hématocytaire, une augmentation temporaire de la phagocytose** (Figure 21, p.82) ainsi **qu'une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés** (Figure 22, p.82). L'ensemble des résultats montre l'implication réelle de l'acide arachidonique (C20 :4(n-6)) ainsi que du rapport n-3/ n-6 dans la réponse immunitaire des huîtres.

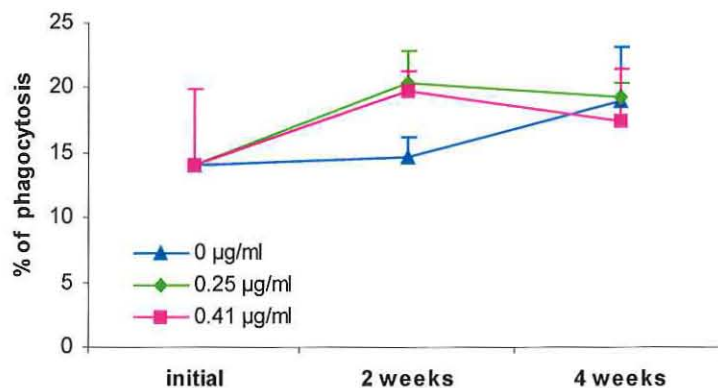


Figure 21 : Evolution sur un mois du taux de phagocytose (% d'hémocyte actif) d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* soumises à un régime complétement en acide arachidonique (0 – 0,25 et 0,41 µg/ml eau de mer).

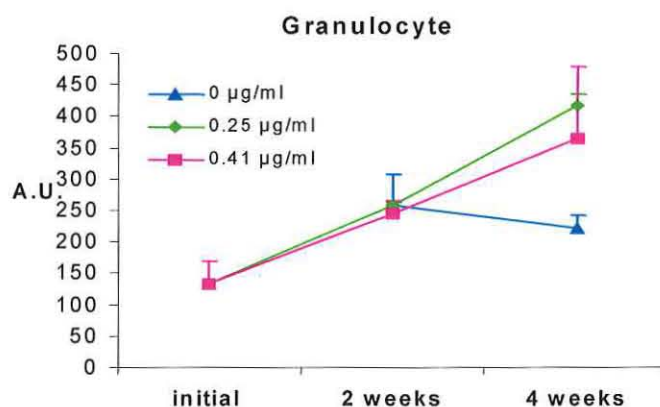


Figure 22 : Evolution sur 1 mois de la production de radicaux libres oxygénés (en unité arbitraire A.U.) par les granulocytes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* soumises à un régime complétement en acide arachidonique (0 – 0,25 et 0,41 µg/ml eau de mer).

### Influence du dinoflagellé *Alexandrium catenella* sur la réponse immunitaire de l'huître *Crassostrea gigas*

Deux expériences ont été menées, l'une à 18°C (25 juin 2004) et la suivante à 12°C (2 juillet 2004). Pour chacune de ces deux expériences, 20 huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes (60 mm de taille de coquille) ont été déposées dans 20 bacs individuels et nourries avec un mélange de souches d'algues *Alexandrium catenella* et *Thalassiosira weissflogii* en flux continu pendant différentes périodes de temps (1, 2, 3 et 4 jours). En parallèle de chaque expérience, 8 huîtres étaient maintenues non nourries aux mêmes températures et servaient de contrôle « non exposé » à l'algue toxique *A. catenella*.

Au cours de cette étude les paramètres immunitaires mesurés sont :

- Nombres et pourcentages des différentes populations d'hémocytes de l'huître *Crassostrea gigas* (hyalinocytes et granulocytes), basés sur leur taille et leur complexité interne.
- Mortalité/viabilité des hémocytes

- c) Phagocytose de billes fluorescentes par les hémocytes,
- d) Mesure de la production d'espèces oxygénées réactives par les différentes sous-populations hémocytaires. Cette production d'éléments microbicides participe à la destruction des particules du non-soi mises au contact des cellules de défense. Les niveaux de production pour chaque population d'hémocytes ont été évalués après 2 heures d'incubation dans l'eau de mer, ou en présence des produits extra-cellulaires (ou extra-cellular product ECP) de la souche bactérienne *Vibrio aestuarianus* n°01-32, pathogène de l'huître.

Les résultats obtenus montrent qu'*Alexandrium* n'a pas de réel impact sur la réponse immunitaire des huîtres, du moins dans les conditions testées. Cependant, à l'occasion de cette expérience, il a été possible de suivre l'effet de la température sur les paramètres hémocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Il apparaît qu'une augmentation de température de 12 à 18°C chez des huîtres triploïdes (hors gamétogénèse) entraîne une activation du système immunitaire qui se traduit notamment par une augmentation du taux de phagocytose, de production de radicaux libres oxygénés ainsi qu'une augmentation de la concentration hémocyttaire (Figure 23, p.83).

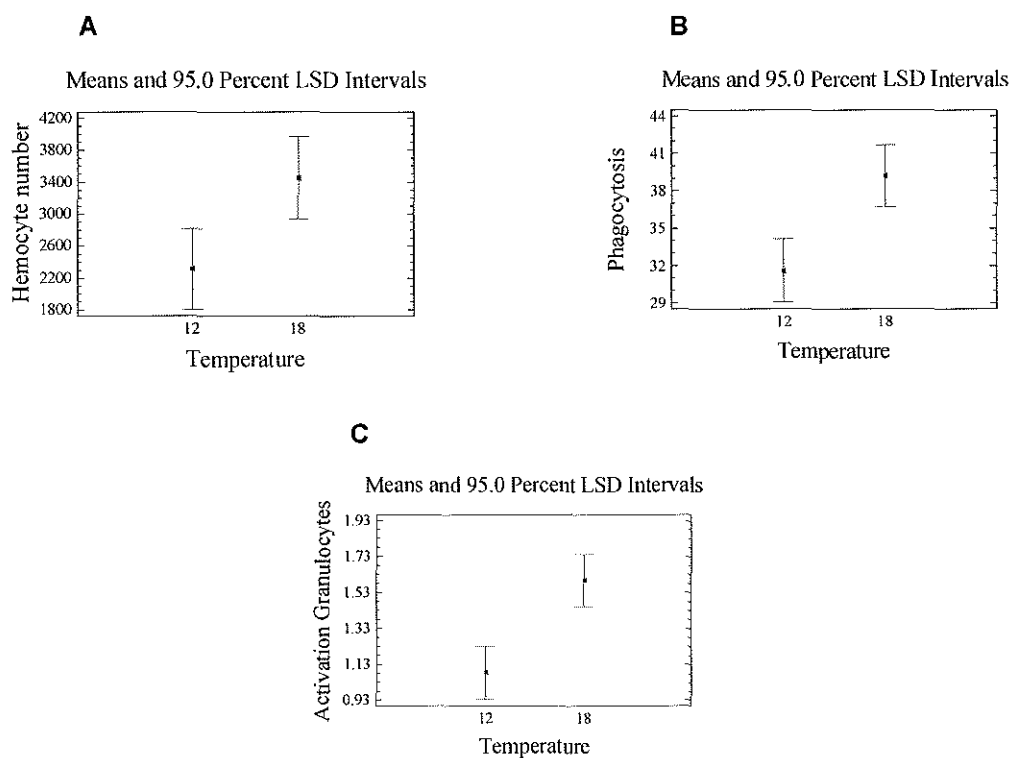


Figure 23 : Effet de l'augmentation de la température de 12 à 18°C sur les paramètres hémocytaires d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* triploïdes : A = Concentration hémocyttaire (x 10<sup>2</sup> cellules par mL, ± SD), B = Phagocytose (pourcentage d'hémocytes actifs ± SD). C = Synthèse de radicaux libres oxygénés (ratio d'activation après addition de produits extra-cellulaires bactériens ± SD).

## Tâche 3.5 - Modèle d'infection

### 3.5.2 - Facteurs de virulence

Dans le cadre de la thèse de Yannick Labreuche et du stage de maîtrise de Madeleine Gonçalves, l'effet des produits extra-cellulaires (ECP) de la bactérie *Vibrio aestuarianus* souche 01/32, pathogène pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte, a été testé *in vitro* sur les paramètres hématocytaires.

Il a été montré que les ECP de *V. aestuarianus* étaient capables d'altérer la réponse des hémocytes notamment en réduisant leur capacité de phagocytose à partir de  $1\mu\text{g}$  par ml (Figure 24, p.84) ou d'adhésion à partir de  $0,5\mu\text{g}$  par ml (Figure 25, p.85) et d'augmenter la production de radicaux libres oxygénés à partir de  $16\mu\text{g/mL}$  (Figure 26, p.85). Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur la capacité des bactéries pathogènes à contourner le système de défense de l'huître en agissant, par l'intermédiaire de produits extracellulaires, sur l'activité hémocytaire.

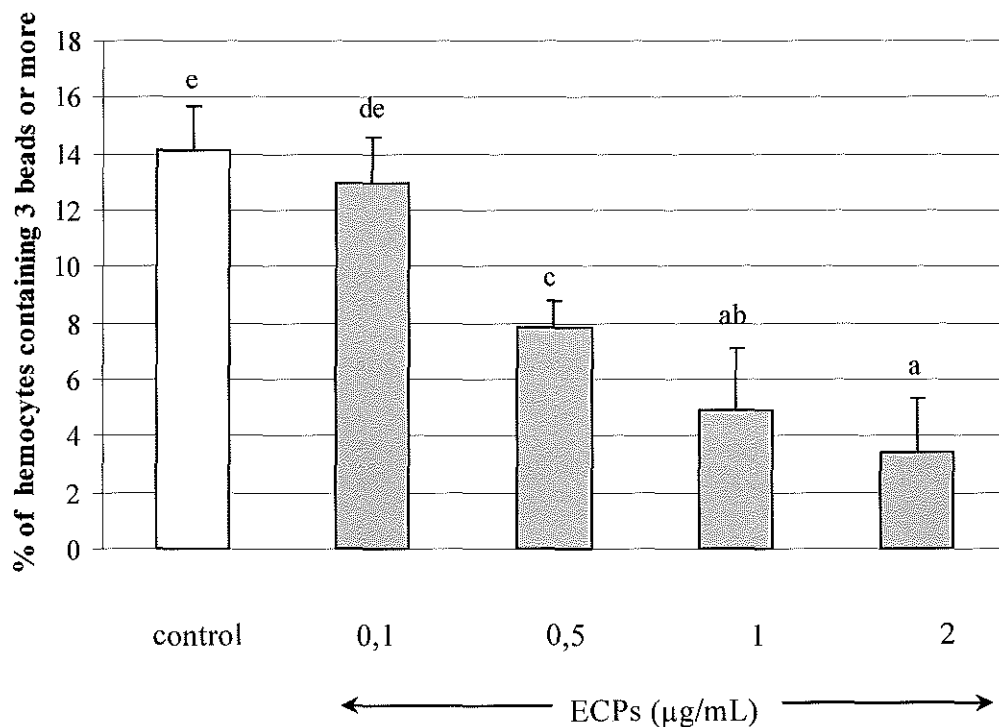


Figure 24 : Taux de phagocytose des hémocytes (ici traduit en pourcentage d'hémocyte contenant 3 billes ou plus) soumis à des concentrations croissantes de produits extra-cellulaires de la souche 01/32 de *Vibrio aestuarianus* (de  $0,1$  à  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements (moyenne  $\pm$  SD,  $n = 4$ , ANOVA  $P < 0,05$ ).

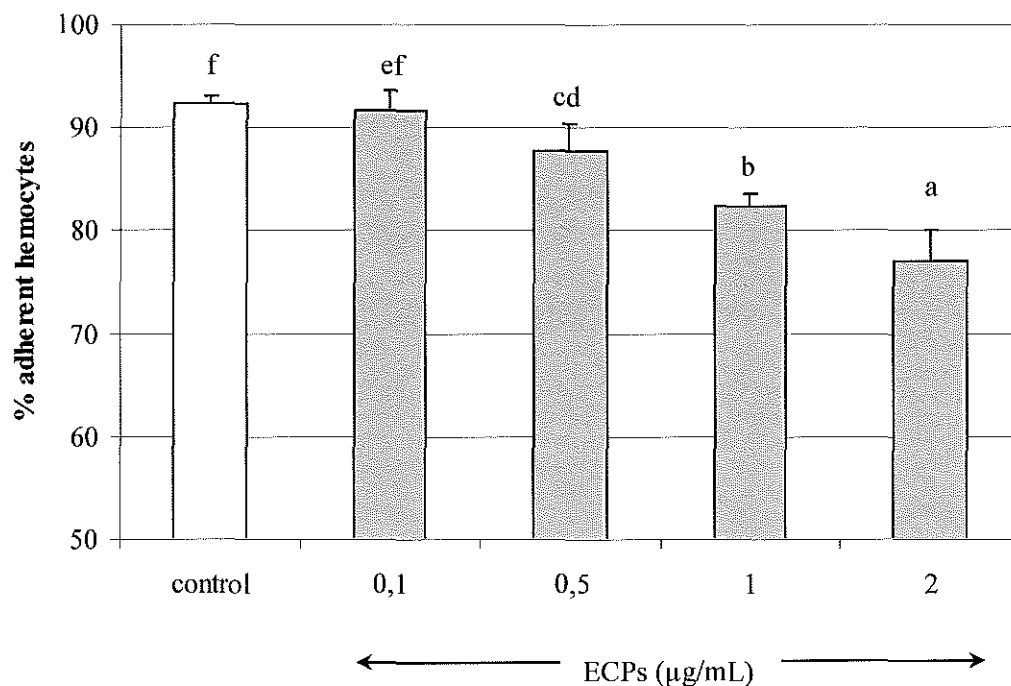


Figure 25 : Pourcentage d'hémocytes adhérents après mise en contact avec des concentrations croissantes de produits extra-cellulaires de la souche 01/32 de *Vibrio aestuarianus* (de 0,1 à 2 µg.mL<sup>-1</sup>). Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements (moyenne ± SD, n = 4, ANOVA P<0,05).

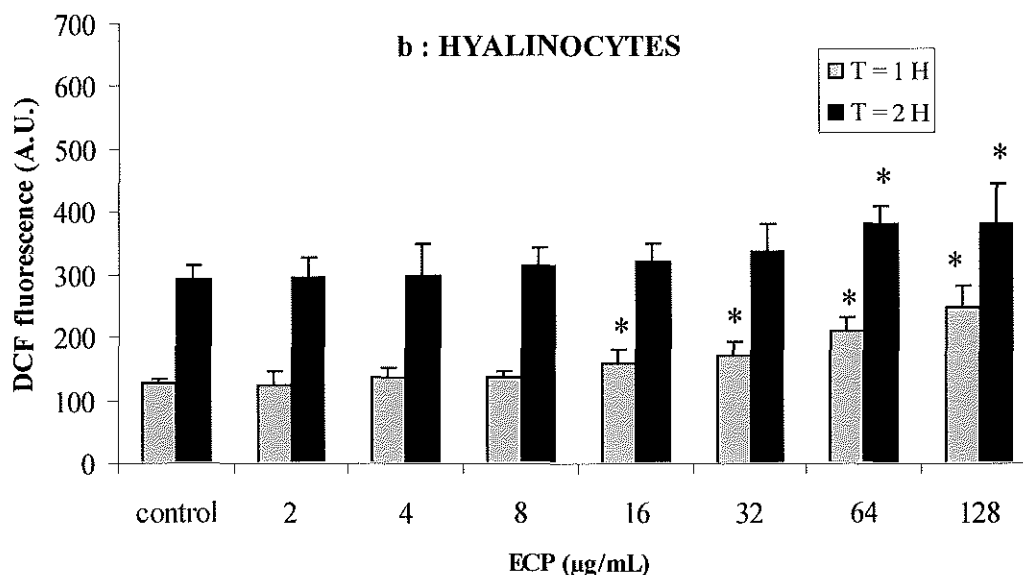


Figure 26 : Production moyenne de radicaux libres oxygénés (niveau de fluorescence du DCF en unité arbitraire A.U.) par les hyalinocytes de *Crassostrea gigas* stimulés par une concentration croissante de produits extra-cellulaires de la souche 01/32 de *Vibrio aestuarianus* (de 2 à 128 µg.mL<sup>-1</sup>). Les astérisques (\*) indiquent une différence significative avec le contrôle « eau de mer » (moyenne ± SD, n = 4, ANOVA P<0,05).

## Bibliographie Citée

1. Volety, A.K., Oliver, L.M., Genthner, F.J. & Fisher, W.S. (1999). A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 172, 205-222.
2. Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. & Samain, J.F. (2003). Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206, 3053-3064.

## Listes des travaux 2004

### Publications (revues internationales)

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Gouy, M. and Berthe F. (2004). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *GyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* 58,143-150.

Soletchnik P., C. Lambert and K. Costil. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to rearing environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*. In press.

Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., and Nicolas, J.-L. *In vitro* effects of Extracellular Products (ECPs) from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on the oyster *Crassostrea gigas* cellular immune responses. *Developmental and comparative Immunology*. In press.

### Conférences et workshops internationaux

Measurement of oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte oxydative burst by flow cytometry: application to evaluate defence capacity of oysters selected on their survival performance to summer mortality. Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y. and Paillard, C. The Sixth International Symposium on Fish Immunology; Turku, May 25 – 29, 2004.

Summer mortality in The pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of three year results of the cooperative "Morest" project. JF Samain, P. Boudry, L. Degremont, P. Soletchnik, M. Ropert, J. Moal, M. Mathieu, S. Pouvreau, C. Lambert, JM. Escoubas, JL. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, T. Burgeot, C. Bacher. 96th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, Triennial Meeting of NSA, WAS, and AFS, March 1-5, 2004, Hawaii Convention Center, Honolulu, HI, USA.

Application of flow cytometry in bivalve physiology and disease studies: An overview. P. Soudant, G. Choquet, C. Lambert, C. Paillard, P. Mirella da Silva, C. Fabioux, Y. Labreuche, M. Delaporte, H. Hégaret, F.-L. Chu. International Workshop on Trend of Research On Shellfish: Disease, Genetics, Physiology and Ecology. October 3 – 6 2004. University Park, Segwipo, Jeju Korea. (invité)

Flow cytometric measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte "Oxidative Burst"(OB): Specific activity of granulocytes and hyalinocytes, differentiation between stimulated or non-stimulated OB. C. Lambert, P. Soudant, M. Jegaden, Y. Labreuche, J. Moal, C. Paillard, J.-F. Samain. International Workshop on Trend of Research On Shellfish: Disease, Genetics, Physiology and Ecology. October 3 – 6 2004. University Park, Segwipo, Jeju Korea. (invité)

Environment effect on the host-pathogen interactions: Development of a vibriosis model in bivalves. **Paillard C.**, J. Flye Sainte Marie, **G. Choquet**, M. Perrigault, F. Jean, **C. Lambert**, **P. Soudant**, S. E. Ford, E. Powell, J. Klink, E. Hoffmann, P. Le Chevalier, C. Le Boulay. International Workshop on Trend of Research On Shellfish: Disease, Genetics, Physiology and Ecology. October 3 – 6 2004. University Park, Segwipo, Jeju Korea. (invité)

## Conférence et workshops nationaux

Température et immunité. **H. Hégaret**, **P. Soudant**, **C. Lambert**, M. Delaporte, J. Moal, P. Lassus, T. Renault, B. Gagnaire, P. Soletchnik. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

Evolution des paramètres hématocytaires en relation avec la gamétogenèse : synthèse des approches terrains et labos. M. Delaporte, **P. Soudant**, **C. Lambert**, J. Moal. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

Les hémocytes d'huître: des cellules multi-fonctionnelles. **C. Lambert**. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

Variation des réserves énergétiques au cours de la gamétogenèse : synthèse des approches terrains et labos. M. Delaporte, C. Quéré, J.R. Le Coz, J. Moal, **P. Soudant**, **C. Lambert**. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

Génétique et paramètres hématocytaires. **C. Lambert**, **P. Soudant**, M. Delaporte, J. Moal, **H. Hégaret**, **M. Jegaden**, D. Moraga, A. Tanguy, F. Geret, T. Burgeot, T. Renault, B. Gagnaire, N. Faury, P. Soletchnik, J. Haure, J.-L. Martin. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

Effet d'un traitement antibiotique sur les mortalités en conditions expérimentales. **C. Lambert**, **P. Soudant**, M. Delaporte, J. Moal, **H. Hégaret**, Y. Labreuche, M. Garnier, J.-L. Nicolas, A. Huvet. Séminaire Morest 2004, Caen, 24-26 Novembre 2004.

## Rapports (stage maîtrise, DEA, post-doc, contrats ...)

Influence du dinoflagellé *Alexandrium catenella* sur la réponse immunitaire de l'huître *Crassostrea gigas*. **Hélène Hégaret**, **Philippe Soudant**, **Christophe Lambert**, Patrick Lassus et coll. Rapport d'expérimentation, 2004, 10 pages.

Développement et application du test du « killing Index » sur un modèle hémocyte d'huître *Crassostrea gigas*/ *Vibrio splendidus*. **Nathalie Byrne**. Rapport de stage de Maîtrise. Février 2004, 23 pages.

Modulation des fonctions cellulaires de défense de l'huître *Crassostrea gigas* par les produits extra-cellulaires de *Vibrio aestuarianus* souche 01/32. **Madeleine Gonçalves**. Rapport de stage de DEA. Juin 2004, 30 pages.

Etude de l'effet de l'acide arachidonique sur les réponses immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. **Giudicelli Emilie**. Rapport de stage de DEA. Août 2004, 28 pages.

Evaluation et modulations des paramètres hématocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le cadre du programme MOREST. **C. Lambert**, **P. Soudant**, M. Delaporte, **N. Byrne**, **H. Hégaret**, **M. Gonçalves**, **M. Da Silva**, Emilie Giudicelli. Rapport Intermédiaire Contrat d'étude : IFREMER / LEMAR N°externe : IF 2004.2.2521124, Convention UBO KPS2. 30 Septembre 2004. 89 pages.

# MNHN - Muséum National d'Histoire Naturelle, Station de Biologie Marine - Concarneau

---

Responsable : A. Van Wormhoudt, DR2 CNRS

Adresse : Station de Biologie Marine, Muséum National d'Histoire Naturelle : UMR 5178 Biologie des organismes et de Ecosystèmes Marins ; Equipe Ecogénétique et Laboratoire « Évolution Moléculaire et Adaptation » (EPHE) BP 225 – 29182 Concarneau .

## Introduction

### Régulations transcriptionnelles des enzymes du métabolisme des glucides chez *Crassostrea gigas*.

Une des causes des mortalités estivales pourrait être liée au déficit énergétique associé à la faiblesse des réserves. Il a été démontré que les huîtres « sensibles » ont une dépense énergétique plus forte et de ce fait, la période de reproduction devient une phase critique associée à des mortalités importantes. Une étude détaillée de ce métabolisme a donc été entreprise pour essayer de comprendre les phénomènes et de déterminer s'il existe une composante génétique ? Les enzymes clés du métabolisme ont été choisies et la caractérisation de leurs ARN effectuée afin de déterminer vers quel type de métabolisme l'animal (ou les différents organes) est orienté à différentes étapes de son développement.

Les enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogénèse ont été choisies au départ mais la sélection s'est affinée au fur et à mesure des résultats obtenus.

Une bourse (H. Bacca) co-dirigée par A. Van Wormhoudt et J. Moal et financée par l'Ifremer et la Région Bretagne a été obtenue pour aider à la réalisation de ce programme.

## WP1 - Mise au point d'outils

### Tâche 1.2 - Physiologie

Les cDNAs de différentes enzymes (PEPCK, Hexokinase, Pyruvate-kinase, Leucine amino peptidase, glucose-6-phosphate deshydrogénase, Aspartate amino transferase...) ont été isolés par PCR et séquencés.

## WP3 - Expérimentations phase I - Reproduction expérimentale des mortalités : découplage des paramètres envi-ronnementaux

### Tâche 3.1 - GIGAREPRO II

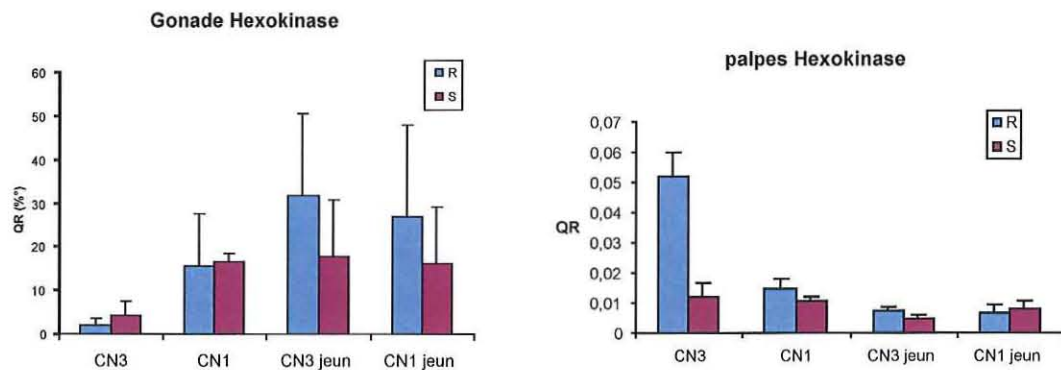
- Suivi annuel :

Une étude de l'expression par PCR quantitative des gènes ciblés dans la glycolyse (Pyruvate Kinase, Hexokinase) a été effectuée avec un suivi annuel, réalisé avec des conditions trophiques variables en parallèle avec la mesure des activités de ces enzymes et la quantification des ARN messagers correspondants.

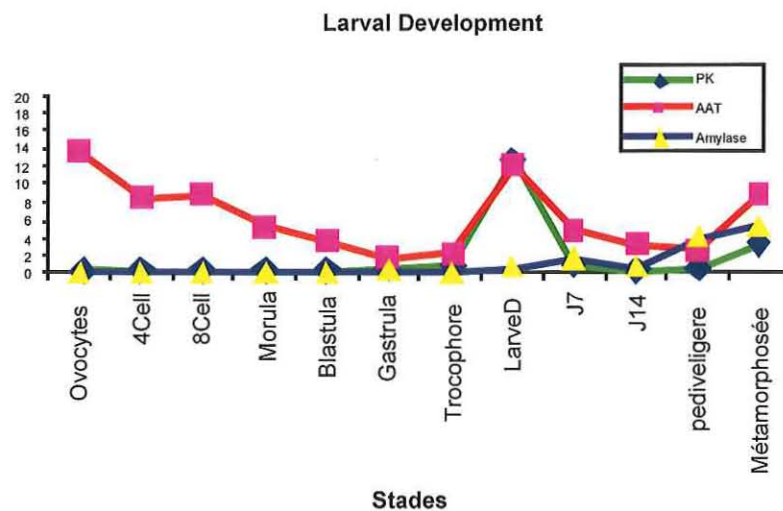


- Variations comparables de la PK et de l'hexokinase en 2002 et 2003 avec un décalage des pics.
- Rôle important des conditions trophiques pour la PK, la PGM et la PEPCK ce qui suggère une réponse à un autre niveau pour les autres enzymes (hexokinase, AAT)
- Comportement différent des R et des S, ce qui est confirmé au niveau tissulaire essentiellement sur milieu riche (CN3). L'effet trophique est retrouvé pour les palpes et les muscles. En été, les gonades réagissent différemment avec un baisse des ARNm PGM et G6PDH impliqués dans les synthèses et augmentation importante des ARNm de l'hexokinase et de la PK impliqués dans la glycolyse.

Répartition tissulaire : la proportion des ARNm varie selon la saison et le tissu considéré. La saison a un effet important sur l'hexokinase et la PGM, maximums en été. le muscle renferme les plus forts taux sauf en été ou c'est le tissu gonadique qui présente un maximum de PGM et de G6PDH. Les fortes teneurs au niveau du muscle pourraient être liées à son activité plutôt qu'à ses capacités de mise en réserve ?



**Développement larvaire :** c'est au stade larve D que se produisent les changements les plus importants de la teneur en ARNm ; maximum correspondant aux enzymes métaboliques, début de l'augmentation des amylases digestives : cas particulier des AAT et des LAP qui pourraient intervenir au début du développement.



## Liste des rapports, publications, contributions à colloques réalisées dans le cadre du projet morest.

Moal J., J.Y. Daniel, D. Sellos, A. Van Wormhoudt et J.F. Samain, Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. 2002 **J. Comp. Physiol**, 170, 21-26.

Moal J., J.F. Samain, J.Y. Daniel, P. Boudry, D. Bougrier, D. Sellos, A. Va, Wormhoudt. Evidence of absorption efficiency differences in two sub-populations of *Crassostrea gigas*. 2002 **J. of Shellfish research**, 19 : 616pp .

Moal J., J.Y Daniel, P. Boudry, S. Bougrier, D. Sellos, A Van Wormhoudt and J.F. Samain. Evidence of absorption efficiency differences in two subpopulations of *Crassostrea gigas*. A first approach of their amylase gene polymorphism. Eur. Mar. biotech., 12-14 Mai, Nantes, abs.

Sellos D., J. Moal, L. Degremont, A. Huvet, J.Y. Daniel, S. Nicoulaud, P. Boudry, A. Van Wormhoudt, J.F. Samain. 2002. Structure and polymorphism of the amylase genes in the oyster *Crassostrea gigas* : Tissues specific expression and allelic polymorphism as population genetic markers. **Mar. Biotech.** 5 , 360-372;.

Huvet A., J.Y. Daniel, C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, J.F. Samain and J. Moal. Tissue expression of two  $\alpha$ -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. **Aquaculture** 228, 321-3A

Bacca H., A. Huvet, J.Y. Daniel, J. Moal, A. Van Wormhoudt - 2003 Expression tissulaire et saisonnière des gènes du métabolisme des sucres. Journées Morest ( La Rochelle).

Bacca H., A. Huvet, J.Y Daniel, C. Lelong, A. Van Wormhoudt, J. Moal, J.F Samain -2005 Molecular cloning and expression of the oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Comp. Biochem. physiol.** (sous presse).

Bacca H., A. Huvet, J.Y. Daniel, J. Moal, A. Van Wormhoudt - 2005 Expression of carbohydrate metabolic enzymes of mRNAs during larval development in *Crassostrea gigas*. (en préparation)

Le Moullac<sup>1</sup> G., H. Bacca, S. Pouvreau, A. Van Wormhoudt - Physiological and metabolic consequences of emersion and hypoxia On PK and PEPCK activities and mRNAs in the oyster *Crassostrea gigas* (en préparation).

# Ifremer - DRV/RA/ Laboratoire Conchylicole de Bretagne LCB - La Trinité-sur-Mer

Responsable : Édouard Bédier

Principaux intervenants du LCB : P.G. Fleury, J. Mazurié, A. Langlade, S. Claude et A.G. Martin

Adresse : 12 rue des Résistants - 56470 La Trinité sur Mer

## Introduction

Le Laboratoire Conchylicole de Bretagne gère le site expérimental de Fort Espagnol, en rivièrè d'Auray, qui est l'un des sites ateliers du projet Morest, choisi comme étant l'un des sites les plus significatifs en terme d'intensité de mortalités sur le naissain de 1<sup>ère</sup> année. Les spécificités régionales de la production conchylicole en Bretagne Sud ont conduit à adjoindre à ce site sur estran, un site en baie de Quiberon (Men er Roué), caractérisé par une production en semis en eau profonde.

Les résultats acquis depuis le début du projet ont confirmé que ce site de Bretagne Sud est caractérisé par des mortalités importantes de juvéniles, et par une mortalité modérée d'animaux de deux ans.

Les suivis menés au LER-PC en 2002 (DYNAMO) et 2003 (DYNAMOR), ont conduit à la mise en évidence, chez des huîtres de 18 mois et dans les conditions d'estran, de stress environnementaux liés à la présence du sédiment. Les relations entre mortalité et maturation *in situ* ont également été vérifiées chez des animaux de 18 mois au LCB.

L'objectif prioritaire de 2004 a donc été la caractérisation des mortalités de 1<sup>ère</sup> année, et en particulier l'étude de la réaction des juvéniles aux stress potentiels liés à la proximité du sédiment, et de la relation entre maturation et mortalité, données acquises jusqu'à présent chez des animaux de 18 mois. Cet objectif a été poursuivi dans les deux environnements de Bretagne Sud: estran en Rivière d'Auray (**Tâche 2.2.7 DYNAMAURAY**), et eau profonde en baie de Quiberon (**Tâche 2.2.6 FORMER04**).

La relation étroite mise en évidence entre l'effort de reproduction et la mortalité estivale a également conduit à tester sur ce site des possibilités de sortie de crise, en bridant l'accès du naissain à la ressource trophique pour réduire l'intensité de reproduction (par effet d'exondation ou de densité).

L'objectif 2004 était de compléter les données 2003 (amélioration significative de la survie estivale par "bridage") et de vérifier la capacité de ce naissain à compenser en 2<sup>ème</sup> année son retard de croissance. Cette méthode de réduction de l'accès aux ressources trophiques a été comparée à l'accroissement de la densité locale d'élevage (**Tâche 4.2.2 RETRO & CHAPO**).

Les différences observées dans les dynamiques de maturation des "R" et "S" amènent à poser la question de l'existence, au sein des populations naturelles, d'individus de caractères similaires liés à des pontes précoces et tardives. Une action a donc été entreprise en 2004 pour vérifier cette hypothèse (**Tâche 2.2.11 CANARD**).

En parallèle des expérimentations *in situ*, une analyse des données des mortalités dans les différents environnements a été menée en commun avec les autres laboratoires côtiers afin de synthétiser la caractérisation de ces mortalités (**Tâche 2.2.1 REMOCAR**), en utilisant notamment les données issues du REMORA (**Tâche 5.1.3 REMORA**).

Le bilan d'utilisation des outils que constituent les indices de vitalité qui devait être effectué en 2004 a été reporté en 2005 (**Tâche 1.7 CESAM**).

Enfin, en terme de communication, l'année 2004 a permis la mise en place d'une base de données (**Tâche 7.1**), et de poursuivre la communication et l'accès extérieur aux résultats (**Tâche 7.2**).

## WP 1 - Mise au point d'outils

### Tâche 1.7 - Bilan des indices de stress CESAM

Intervenant : P.G. Fleury

Les expérimentations du projet MOREST utilisent de nombreux outils dont la thématique est regroupée dans le WP 1 (Mise au point d'Outils). Dans la pratique aucune synthèse n'a été réalisée sur l'utilisation de ces divers outils. La présente tâche CESAM, dont l'objectif est de dresser un bilan des indices de stress et tests de vitalité des Bivalves, a été, faute de temps, reportée à 2005.

## WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

### Tâche 2.2 - Étude interdisciplinaire *in situ* des mortalités

#### Sous-Tâche 2.2.1 - Synthèse et caractérisation des mortalités (REMOCAR)

Intervenants : P.G. Fleury et J. Mazurié

Cette tâche a été menée en collaboration entre les 3 laboratoires côtiers abritant des sites ateliers: LER-PC, LER-N et LCB. Son objectif est de caractériser les mortalités en fonction des sites, en s'appuyant sur les données du réseau REMORA, ainsi que sur celles des réseaux de suivi de l'environnement et de Météo France.

Une première partie a porté sur la caractérisation, à partir des données de la base REMORA, des mortalités saisonnières sur une trentaine de sites couvrant les principales zones ostréicoles du littoral français (à l'exception de Thau). L'étude a porté sur les suivis annuels de 1993 à 2003 pour les huîtres de "2 ans" et de 1995 à 2003 pour les "1 an".

La variabilité de la mortalité de chaque classe d'âge ("1 an" et "2 ans") est présentée selon les années et selon les sites ostréicoles (Figure 27). Il ressort que la mortalité des huîtres de "1 an" est essentiellement estivale et très marquée à Marennes et sur quelques sites bretons. La mortalité des "2 ans" est plutôt printanière, forte en Baie des Veys et également sur quelques sites bretons.

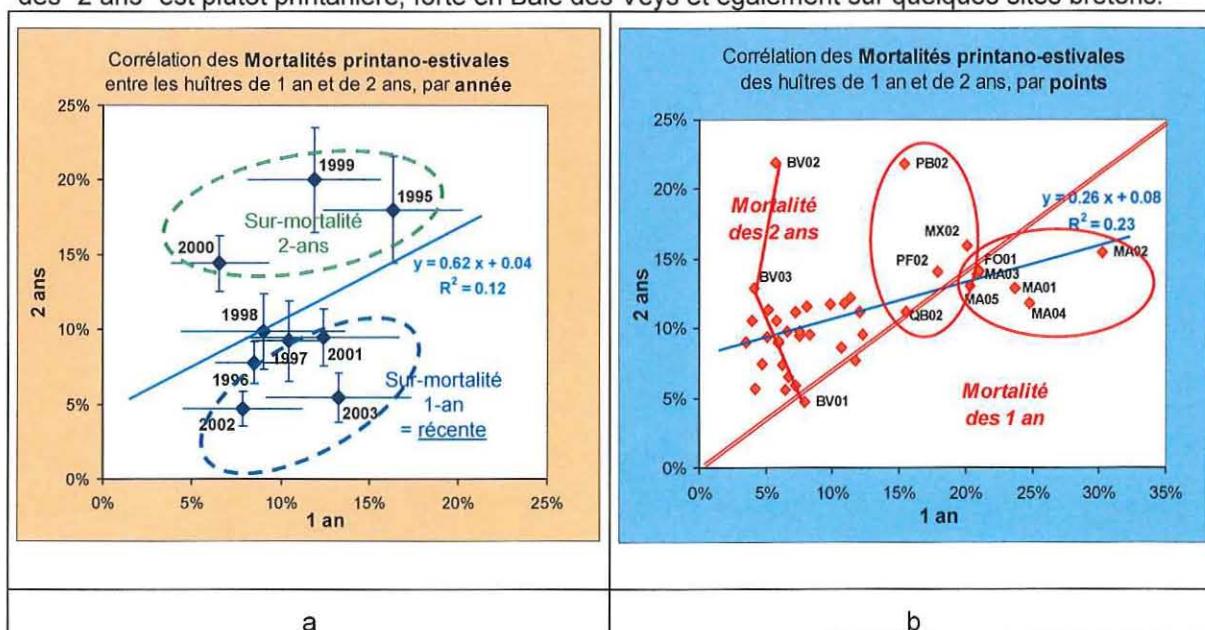


Figure 27 : Mortalité comparée des huîtres de 1 et "2 ans" par année (a) et par site (b)

Les mortalités printanières et estivales au sein d'une même classe d'âge sont positivement corrélées (20-24%). On n'a donc pas d'effet de la mortalité printanière sur une diminution de la mortalité estivale.

L'analyse des corrélations montre que les mortalités sont peu corrélées aux autres facteurs intrinsèques (croissance, remplissage des huîtres), qui expliquent donc assez faiblement les mortalités estivales (15 à 20% au maximum).

On a recherché par analyse de variance l'influence de la météorologie à travers le facteur année (campagne annuelle), et de la géographie à travers le facteur site (secteur conchylicole). Les résultats montrent, pour chaque classe d'âge, des différences hautement significatives entre les années et entre les sites, sans interaction significative entre ces 2 facteurs. Le facteur "site" (topographie) apparaît prépondérant pour le "1 an" (51% de part de variance), tandis que pour le "2 ans" c'est nettement le facteur "année" (conditions météorologiques) avec 74% de part de variance.

Les causes de mortalité apparaissent donc essentiellement de nature environnementale, avec des mécanismes sans doute différents selon les 2 classes d'âge (plutôt effet topographique pour le "1 an" et effet météorologique pour le "2 ans").

La deuxième partie, consacrée à l'étude des relations existantes entre les mortalités et l'environnement hydrologique et climatologique sur 11 secteurs conchylicoles du littoral Français, a été majoritairement traitée par le LER-PC.

Il en ressort que la mortalité des "1 an" est plus corrélée à de fortes concentrations en chlorophylle a et à des températures élevées; celle des "2 ans" plus liée aux variables pluie et dessalure.

### *Sous-Tâche 2.2.7: Suivi des interactions hôte - sédiment sur estran en Rivière d'Auray (DYNAMAURAY)*

*Intervenants : E. Bédier, S. Claude et A. Langlade*

Les études DYNAMO et DYNAMOR menées en 2002 et 2003 l'ont été sur des animaux de 18 mois. Or le phénomène des mortalités estivales touche essentiellement les juvéniles sur le site de la Rivière d'Auray. Ce site a donc été gréé en 2004 pour étudier cet effet de la proximité du sédiment sur des juvéniles.

Deux lots de naissain: un lot de captage naturel (captage Arcachon 2003) et un lot de naissain triploïdes de même âge (provenance: éclosérie de Kerné, Morbihan), ont été positionnés en poches, le 20 avril 2004, selon deux modalités de hauteur (10 et 65 cm). Les lots de naissain d'éclosérie "R" et "S" prévus initialement n'ont pu être utilisés faute de production début 2004.

Les lots mis en élevage sont identiques à ceux utilisés dans la tâche 2.2.6 FORMER04. Le lot de captage naturel est identique à celui utilisé dans la tâche 3.2.1 GIGAREPRO 04 menée à Argenton et dont l'objectif est de valider sur du naissain le schéma écophysique préalablement établi sur du 18 mois.

En parallèle du suivi effectué sur les juvéniles, la mortalité de deux lots de 18 mois "R" et "S", constitués de pools de respectivement 5 familles "R" et 5 familles "S" conservées exemptes de mortalité (SATMAR), et transférées en mars à La Trinité-sur-Mer, a été suivie suivant le même protocole de mise en élevage à deux niveaux différents d'élévation. Ce suivi, complété par les analyses biochimiques du LPI - PE2M, a permis la comparaison avec les lots identiques suivis en Normandie (tâche 2.2.9 DYNABDV).

Le suivi a porté sur les paramètres suivants :

<i>Paramètres</i>	<i>Intervenant Former04</i>	<i>Intervenant Dynamauray</i>
Biométrie	LCB	LCB
Force musculaire	LCB	
Biochimie	LPI – PE2M	LPI – PE2M
Histologie quantitative (1)	LPI – PE2M	LPI – PE2M
Bactériologie		LPI – PE2M
Analyse chimique du sédiment	DEL/PC Nantes	DEL/PC Nantes
Ecotoxicologie (eau et sédiment)	DEL/PC Brest	DEL/PC Brest
Suivi milieu	LCB	LCB

(1) Les prélèvements ont été fixés pour analyse ultérieure

### **Contexte environnemental de la saison 2004**

La figure 2 montre l'évolution des températures sur Fort Espagnol en 2004, comparée à l'évolution en 2002 et 2003. Les mortalités se sont produites relativement tôt en 2004 (date de début: 10 juin), à la suite d'une période de montée rapide en température (+4°C en 1 semaine) et à une température de 19,9°C. L'épisode de mortalité a été important sur l'ensemble de la Bretagne Sud, avec des mortalités de 30 à 50% selon les secteurs (source REPAMO).

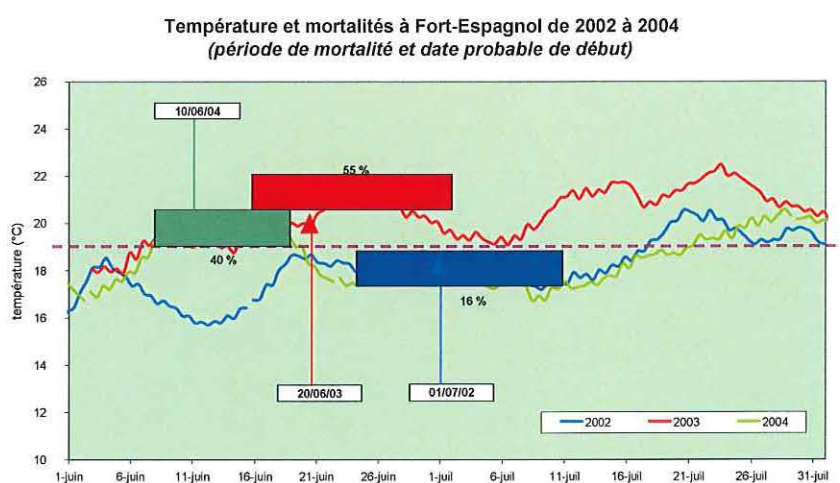


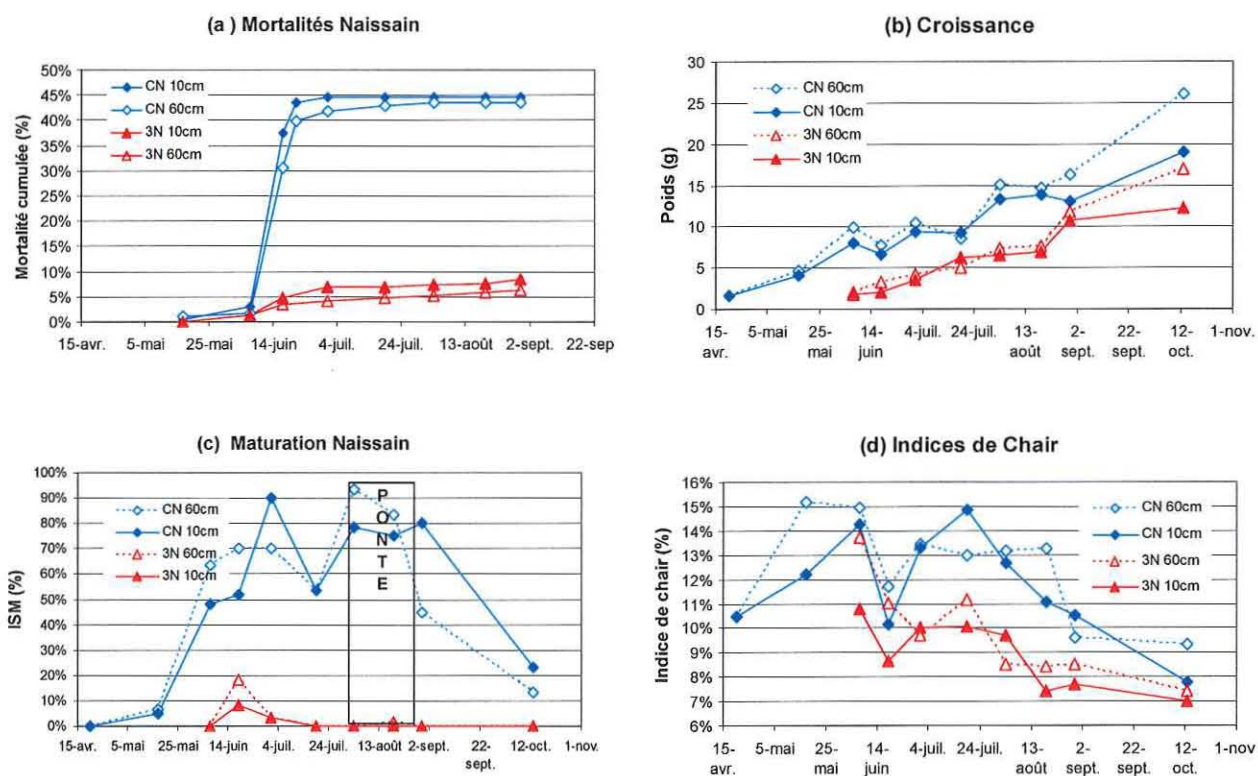
Figure 2: Conditions environnementales en Rivière d'Auray

### Résultats sur les juvéniles

Les résultats concernant les juvéniles sont montrés dans les figures 3a à 3d. On ne note pas de différences entre les élévations 10 et 60 cm au sein d'un même lot de naissain. La mortalité s'établit respectivement à 44,5% et 43,5% pour le captage naturel (cf. taux moyen enregistré chez les professionnels du secteur); à 8,4% et 6,3% pour le lot de triploïdes. La dynamique de la mortalité entre les hauteurs ne montre pas de différences particulières.

La mortalité intervient en phase croissante de maturation (figure 3c). En revanche, le faible taux de mortalité des triploïdes peut être mis en relation avec l'absence de maturation de ce lot, montrant ainsi l'importance de la maturation même dans cette classe d'âge.

La croissance ne montre pas non plus de différences inter-niveaux, sauf à partir de début septembre. L'indice de chair montre une chute importante au moment de l'épisode de mortalité, suggérant une mortalité préférentielle des animaux les plus matures. La ponte principale intervient à partir de la fin du mois de juillet, de manière plus rapide pour les animaux à 60 cm



Figures 3a – 3d: Suivi des juvéniles à 10 et 60 cm du sédiment en Rivière d'Auray

### Résultats sur les 18 mois "R" et "S"

Les résultats de mortalité sur les animaux de 18 mois conservés exempts de mortalité en 1<sup>ère</sup> année montrent des valeurs supérieures à celles obtenues dans les mêmes conditions en 2002 et 2003 (moyenne des 2 lots à 60 cm: 24,5% contre respectivement 8,6 et 9,9%). Ces lots avaient déjà présenté en 2003 des mortalités en 1<sup>ère</sup> année supérieures aux valeurs des années précédentes (58,5% contre 21,3 et 25,3%). Un effet "lot" n'est donc pas à exclure. Le différentiel entre R et S reste du même ordre de grandeur que les années précédentes (5% contre 0,8 et 8,7%).

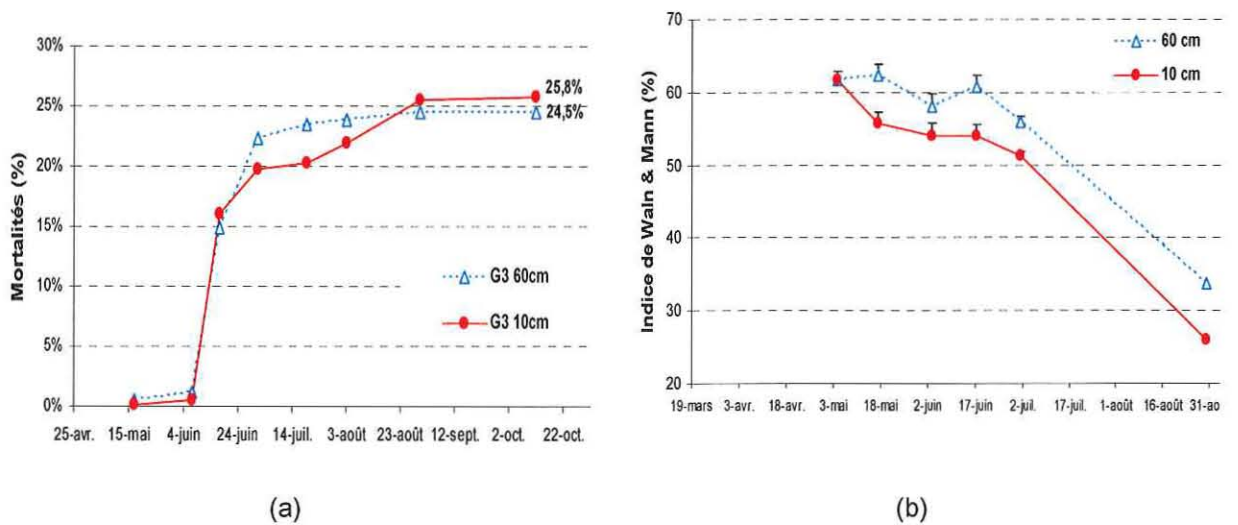


Figure 4: Mortalités (a) et indices de Walne & Mann (b) moyennés sur les lots "R" et "S" 18 mois à 10 et 60 cm du sédiment

Comme pour les juvéniles, aucune différence dans les valeurs de mortalités n'apparaît entre les niveaux haut et bas, les huîtres à +10 cm montrant seulement un léger différenciel dans la dynamique de mortalité. (figure 4a)

### Discussion

L'absence globale de différences, chez les juvéniles, dans les indices biométriques entre les niveaux haut et bas est en contradiction avec les résultats obtenus sur estran sur le bassin de Marennes-Oléron en 2002 et 2003. Chez les animaux de 18 mois, les valeurs de l'indice de Walne & Mann (figure 4b), ainsi que les concentrations en ion  $K^+$ , considéré comme indicateur de la gamétogenèse, présentent cependant des différences, en faveur des animaux élevés à 60 cm (résultats A. Le Roux, LPI-PE2M), confirmant les résultats précédemment obtenus sur le site de Ronce, et montrant l'existence de différences métaboliques.

Le suivi des conditions de l'évolution des composés réduits dans le sédiment (résultats J.R. Knoery, DEL/PC-Nantes) montre cependant une augmentation des valeurs pendant la période de mortalité, avec un maximum de reminéralisation de la matière organique vers la mi-juin (figure 5). Cette dynamique est confortée par les mesures d'embryotoxicité du sédiment effectuées à la même période (résultats F. Quiniou, DEL/PC-Brest). En revanche, ces derniers tests ne montrent pas de valeurs critiques dans l'eau à la même période.

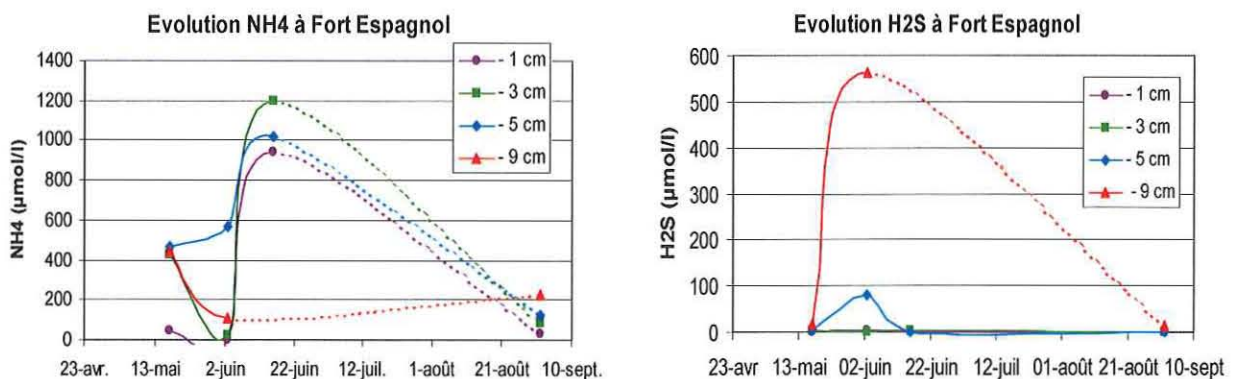


Figure 5: Evolution des composés réduits dans le sédiment à Fort Espagnol

S'il existe un effet "proximité du sédiment" en rivière d'Auray, celui-ci (1) ou affecte l'ensemble de la masse d'eau; (2) ou n'est pas suffisant pour se concrétiser en terme de mortalité différentielle. La



diffusion des composés réduits à partir du sédiment, et la manière dont il affecte la masse d'eau, sont à préciser sur ce site. D'autres hypothèses sont susceptibles d'affecter la survie, comme l'importance du microphytobenthos, relativement peu présent *a priori* sur Fort Espagnol.

### Sous-Tâche 2.2.6 - Suivi des interactions hôte - sédiment en eau profonde en baie de Quiberon (FORMER04)

Intervenants : E. Bédier, P.G. Fleury et A. Langlade

La tâche FORMER prend en compte la spécificité des pratiques culturales en Bretagne Sud. Initiée en 2003, elle se propose de comparer les dynamiques de mortalité entre les environnements d'estran et d'eau profonde. La contrainte particulière des semis en eau profonde fait que les huîtres élevées au sol subissent une influence importante du sédiment. Cette tâche complète le dispositif expérimental mis en place en 2004 pour étudier l'influence de l'effet du sédiment dans différents environnements, et en particulier pour comparer avec le site sur estran de Fort Espagnol (cf. 3.1.2. DYNAMAMAURAY).

Les lots de naissain utilisés ont été identiques à ceux de DYNAMAMAURAY. Comme en 2003, pour des questions d'ordre pratique, les animaux n'ont pas été semés directement au sol, mais mis en poches ostréicoles positionnées sur des cadres métalliques à des hauteurs de 10 et 65 cm au dessus du sol, suivant le modèle mis en œuvre sur estran.

Les lots de naissain ont été positionnés le 22 avril 2004 sur le site de Men er Roué (point QB2), sur la concession Ifremer de la baie de Quiberon.

Des carottages discrets avaient permis, en 2003, à l'équipe DEL/PC Nantes, de vérifier que le sédiment présentait une évolution au niveau des composés réduits  $H_2S$  et  $NH_4^+$ . Le suivi de l'évolution de ces composés potentiellement toxiques a été effectué en 2004 sur 3 points de la baie incluant Men er Roué. La toxicité du sédiment et de la colonne d'eau ont également été mesurées sur les mêmes points par des tests d'embryotoxicité (DEL-PC Brest).

#### Contexte environnemental de la saison 2004

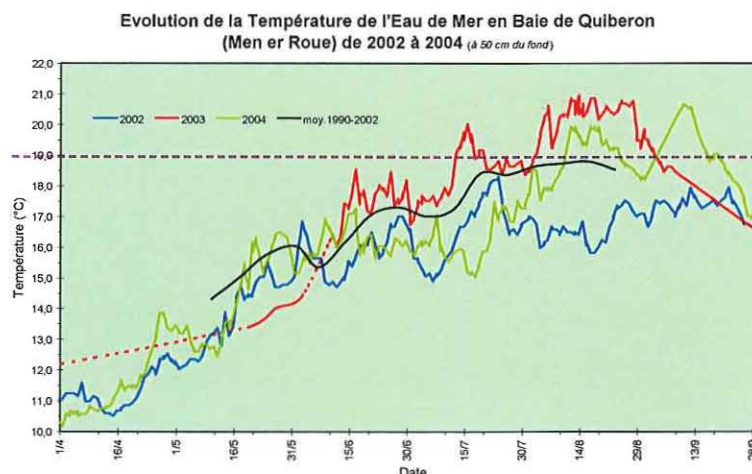
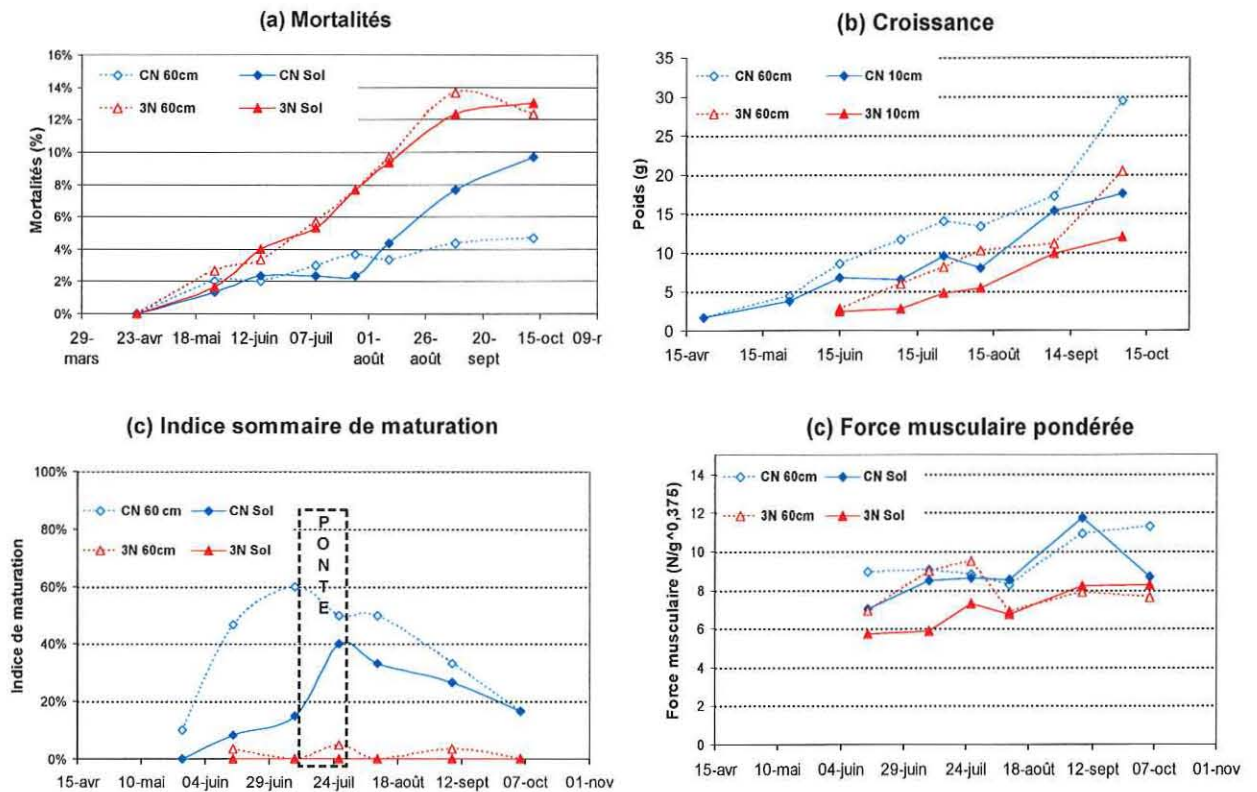


Figure 6 : Température de l'eau de mer en baie de Quiberon

La température de la baie de Quiberon (figure 6) a eu une évolution proche de la normale jusqu'à la mi-juin, puis est repassée assez nettement en dessous. La température de 19°C n'a été atteinte que vers le 10 août pour se maintenir ensuite jusque vers la mi-septembre. La mortalité importante de juvéniles qui a eu lieu début juin sur les zones d'estran n'a pas affecté la baie (à l'exception de certaines déclarations imputables aux pratiques culturales).

## Résultats sur les juvéniles



Figures 7 : Suivi des juvéniles diploïdes et triploïdes en eau profonde

La mortalité sur les deux lots de naissain reste faible (< 14%) avec une mortalité relativement plus forte sur les lots triploïdes (figure 7a). Aucune différence n'apparaît entre les deux niveaux d'élevage par rapport au sédiment jusqu'à début août, date à laquelle on note une rupture dans la courbe de mortalité pour le lot de captage naturel au niveau bas. La température de 18,6°C est atteinte le 02 août en baie, puis le 09 août (figure 6). A cette date, les huîtres sont en cours de ponte (figure 7c).

La proximité du sédiment induit d'autres différences:

- la maturation du naissain de captage apparaît plus précoce et plus importante à +60 cm qu'à +10 cm, la ponte ayant lieu progressivement, respectivement à partir des prélèvements du 09 et du 26 juillet (figure 7c);
- la croissance présente un avantage à +60 cm respectivement de +67% et +69% pour les lots diploïdes et triploïdes, avec cependant des pentes similaires pour les deux génotypes (figure 7b);
- les indices de force musculaire sont supérieures à +60 par rapport à +10cm; quel que soit le lot 2N ou 3N. (figure 7d);
- des mesures de SFG (non présentées), effectuées entre le 17 juin et le 21 juillet à la station de Bouin (J. Haure) en milieu expérimental, révèlent des différences significatives et un écart croissant dans les SFG entre les deux niveaux. Dans les conditions expérimentales, les animaux à +10 présentent un SFG supérieur à ceux à +60 cm.

### Discussion

En 2004 et dans l'environnement de l'eau profonde, la proximité du sédiment induit une différence de mortalité sur le lot diploïde à partir de début août, confirmant ainsi la dynamique déjà observée dans cet environnement. Le début de cette mortalité coïncide avec le début de ponte de ce lot et à une température d'environ 19°C. Les valeurs faibles de mortalité sont à remettre dans un contexte

de mortalité faible sur l'ensemble de la baie, les lots de naissain positionnés chez les professionnels n'ayant pas montré non plus de mortalité significative. On notera également l'évolution du SFG qui montre un écart croissant jusqu'au 21 juillet, en faveur du lot à +10cm, traduisant une différence croissante dans les états physiologiques des 2 lots. Le fait que les SFG soient supérieurs en niveau bas traduisent vraisemblablement un "rattrapage" des animaux à +10 cm dans les conditions expérimentales.

Les suivis chimiques et écotoxicologiques montrent que les valeurs des composés réduits n'ont jamais atteint des valeurs importantes dans le sédiment (données J.R. Knoery, DEL/PC Nantes), ce que confirment les mesures d'embryotoxicité (données F. Quiniou, DEL/PC Brest).

L'ensemble de ces résultats montrent que, même en l'absence de stress chimiques aigus, la proximité du sédiment induit des différences dans la physiologie des animaux qui ne se sont pas traduites, dans les conditions environnementales de 2004, par des niveaux de mortalité importants.

On notera également le comportement des triploïdes qui présentent, à taux de croissance égal, une plus grande mortalité relative, ainsi que des valeurs de force musculaire inférieures à celles des diploïdes, même en l'absence de maturation.

### *Sous-Tâche 2.2.11 - Influence du site de captage (CANARD)*

*Intervenant : P.G. Fleury*

L'objectif de la sous-tâche CANARD est de tester, en site sensible pour le "1 an" (rivière d'Auray), des lots de captage naturel précoce et tardif en les comparant à des lots de naissain "R" et "S" produits à la même période que le captage naturel. L'hypothèse d'une relation entre la période de captage et le caractère sensible ou résistant a son origine dans les différences de dynamique de maturation observées dans ces deux phénotypes. Les résultats pourraient s'appliquer à une sélection éventuelle dès le captage (dates ou sites de captage).

L'année 2004 a permis de préparer cette étude, en permettant l'obtention des lots, grâce à la collaboration du laboratoire DEL d'Arcachon pour le captage, des éclosiers de Ronce et d'Argenton pour les lots "R" et "S" et de la nurserie de Bouin pour la maintenance hivernale des lots avant transfert en mer en février 2005. La coordination de cette préparation a été faite par le LCB en 2004.

Les 2 lots de captage d'Arcachon (Comprian) ont été transférés sur Bouin les 08/08/2004 (naissain précoce) et 28/09/04 (naissain tardif) ; les 2 lots d'éclosier les 15/09/04 (Argenton) et 23/09/04 (Ronce). Ces lots devraient être transférés à Fort Espagnol en février 2005.

## **WP 4 - Tests *in situ* pour s'affranchir des mortalités estivales**

### **Tâche 4.2 - Réduction des mortalités de juvéniles**

#### *Sous-Tâche 4.2.2 - Prévention des effets trophiques et de reproduction (RETRO et CHAPO)*

*Intervenants : J. Mazurié et A. Langlade*

Ces 2 tâches reposent sur le même principe de réduction trophique en vue de limiter l'effort de reproduction, l'une par augmentation de l'exondation, l'autre par augmentation de la densité. Elles ont été intégrées à un protocole expérimental commun et sont présentées conjointement.

Le protocole utilise 3 facteurs croisés :

- exondation : 3 modalités définies par le coefficient d'exondation 30, 40, 70 (ou les hauteurs au dessus du niveau des plus basses mers testées : 1,20m, 2m, 2,40m);

- densité : 4 modalités (400, 800, 1600, 3200 en nombre rapporté à une poche standard), complétées par une série à plus faible densité en huîtres fixes (collées sur la maille) : 60, 112, 270, 560 en équivalent huîtres par poche.
- enceinte d'élevage : 2 modalités : demi-poche ou quart de poche mise en forme cylindrique et pivotant avec la marée.

**Effet de l'exondation et de la densité sur la maturation gonadique**

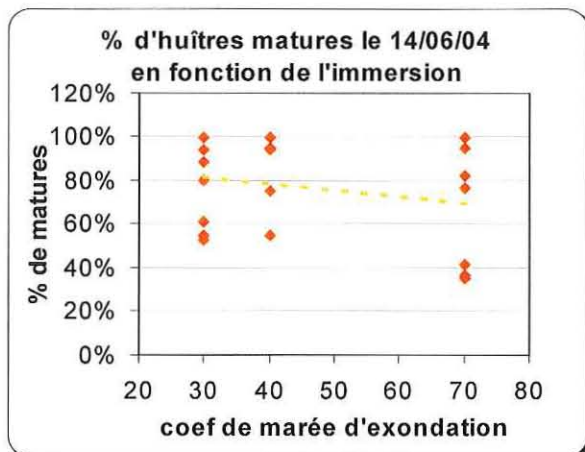


Figure 8 Effet de l'exondation sur la maturation sexuelle

Le niveau d'exondation n'a pas eu d'influence significative sur la maturité sexuelle lors de cette expérience 2004.

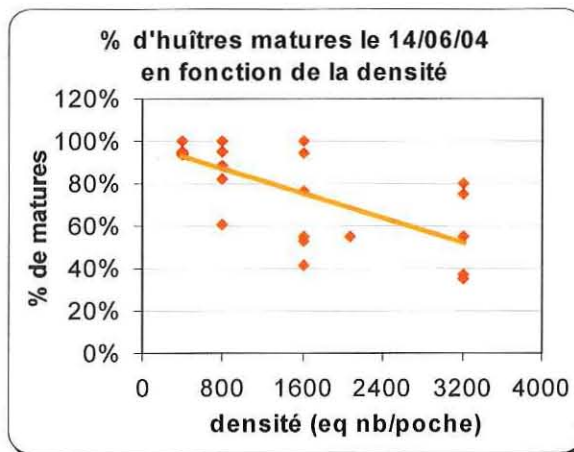


Figure 9: Effet de la densité sur la maturation sexuelle

Plus que l'exondation, la densité a influé significativement sur l'indice de condition et la maturité sexuelle.

**Effet de l'exondation et de la densité sur la mortalité**

Contrairement à ce que pouvait laisser prévoir l'effet observé sur l'effort de reproduction (densité plus influente qu'exondation), c'est l'exondation qui a manifesté l'influence la plus favorable sur la survie (moins marquée cependant qu'en 2003) ; la densité au sein des poches standard (huîtres libres) a eu par contre peu d'effet apparent sur la mortalité, même aux très fortes densités.

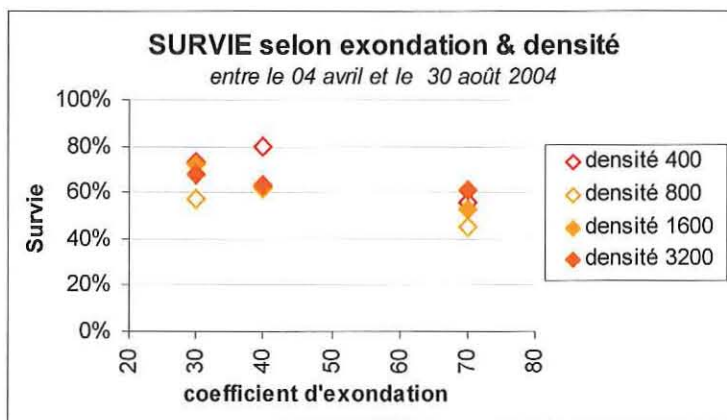


Figure 10: Évolution de la survie selon l'exondation et la densité

Si on incorpore à la série de densités, un essai complémentaire réalisé sur le même site, avec des huîtres collées, à plus faible densité, on peut avancer une hypothèse explicative à ce faible effet densité.

- tant que les densités sont suffisamment faibles pour n'avoir aucune incidence sur la croissance et la maturité, l'augmentation de densité se traduit par une mortalité accrue (épidémiologique ?) : phase 1 de la figure 11.
- à plus forte densité, un « effet protecteur » du bridage de la maturation se fait sentir, mais il ne ferait que contrecarrer l'effet négatif de la densité (phase 3 de la figure 11).

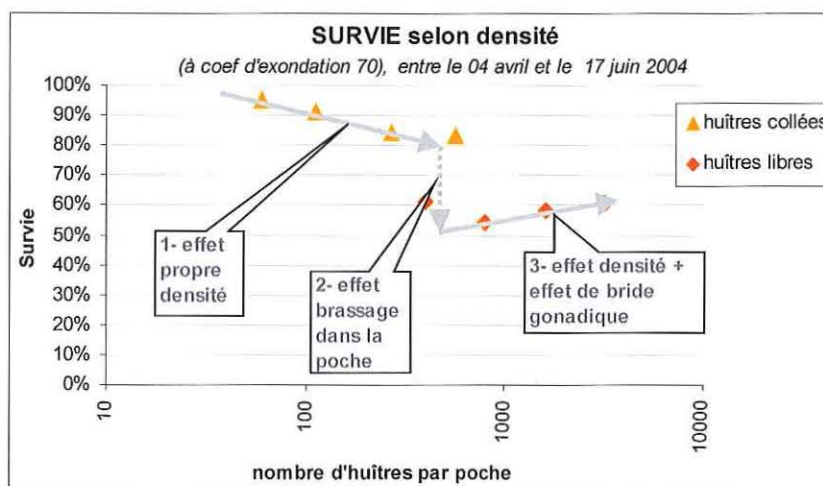


Figure 11: Évolution de la survie la densité

### Examen d'une éventuelle croissance compensatrice après la phase de bridage (de l'été 2003)

On s'intéresse ici à la croissance après « débridage », c'est à dire après que les lots maintenus sur parcs hauts durant la phase sensible aient été redescendus sur parcs bas (le 30 août 2003).

De manière prévisible, les différences d'exondation en phase 1 (jusqu'au 30 août) se traduisent par des différences nettes de croissance d'environ 30% par rapport au témoin à coef 70 pour les huîtres moyennement bridées à coef (50-60) et de 65% pour les huîtres bridées à coef. 30 (première phase de la figure 12).

En phase 2 (tous les lots sont positionnés à coefficient 70), les croissances apparaissent grossièrement parallèles (figure 12). Au printemps suivant, la perte de 65% est réduite à 30% pour les plus fortes exondations initiales (30-40) et au troisième printemps elle est réduite à 15%. On observe un rattrapage total en mars 2005 pour les huîtres ayant été moyennement bridées à (coef 50-60) Il observe donc bien une croissance compensatrice.

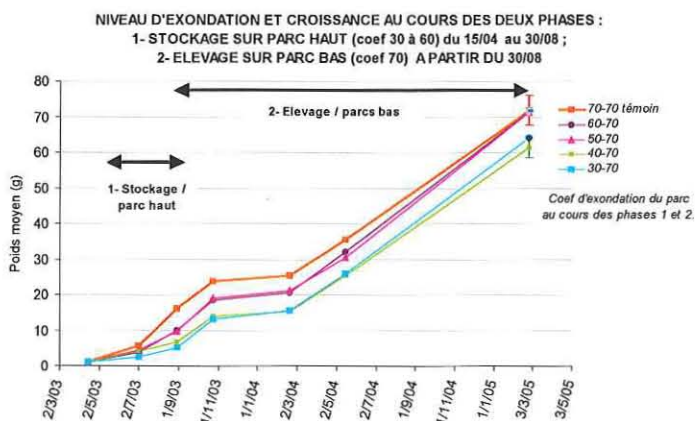


Figure 12 : Evolution de la croissance après la période de bridage

### Récapitulatif des acquis 2004

(1) Des 2 procédés testés pour réduire la croissance et la maturation, la densité s'est révélée nettement plus efficace que l'exondation en 2004 (2 fois moins d'huîtres matures fin juin à forte densité). Pourtant, la prévention des mortalités par l'augmentation de densité se révèle plutôt moins efficace que l'augmentation de la durée d'exondation.

Observant que l'augmentation de densité se traduit initialement (= aux faibles densités) par une augmentation de mortalité, on peut émettre l'hypothèse que cette influence négative intrinsèque de la densité continue de se manifester aux plus fortes densités, venant contrecarrer l'essentiel de l'amélioration attendue de la diminution de l'effort de reproduction.

(2) La suite de la croissance des lots différemment exondés en 2003 entre avril et octobre, révèle un début de croissance compensatrice, après repositionnement en conditions d'élevage normales en fin de 1<sup>er</sup> été : ceci sera confirmé (à préciser).

## WP 5 - Synergies REPAMO – MOREST - REMORA

### Tâche 5.1 - Analyse des épisodes de mortalité

#### Sous-Tâche 5.1.3 - REMORA

Intervenants : P.G. Fleury et S. Claude

Le réseau REMORA montre que l'année 2004, en moyenne sur les zones conchylicoles françaises, est une année de bonne croissance (57,4g en moyenne fin septembre) et de faible mortalité (10% pour les juvéniles et 7% pour les "2 ans", entre mars et septembre).

Plus précisément, sur les sites Morest, on obtient :

	Poids (g) des juvéniles juin (septembre)	Poids (g) des 2-ans juin (septembre)	Mortalité (%) des juvéniles juin (septembre)	Mortalité (%) des 2-ans juin (septembre)
BV02 (Géfosse)	5,6 (19,5)	34,8 (54,0)	3 (4)	3 (6)
AY01 (Fort-Espagnol)	10,7 (37,1)	43,3 (56,2)	0 (26)	1 (12)
MA05 (Ronce)	4,3 (14,5)	31,6 (49,2)	2 (15)	5 (8)
Men er Roué	8,3 (--)	40,1 (--)	3 (--)	1 (--)

On note la forte croissance des juvéniles sur le site de Fort Espagnol. Ce site présente également une maturation début juin importante (Indice Sommaire de maturité : 60%) et une forte mortalité estivale (26%). Par comparaison, le site AY02, situé en aval de la rivière d'Auray, présente les valeurs suivantes: poids en juin: 8,6g; ISM 3,4%; mortalité: 12%.

En 2004, on peut mettre en évidence, sur les juvéniles, en Bretagne Sud, une forte corrélation entre le stade de maturation atteint début juin et la mortalité estivale (figure 13a), mais pas entre la croissance et le stade de maturation (figure 13c). Chez les "2 ans", la corrélation entre la croissance printanière et le degré de maturation apparaît plus clairement (figure 13d). Le degré de maturation atteint début juin par les adultes semble plus élevé que chez les juvéniles, ce qui a tendance à d'autant plus écraser une éventuelle tendance que les mortalités sont faibles.

Même si les mortalités constatées sur le site de Fort Espagnol ont tendance à "tirer" les corrélations, ces données semblent montrer un comportement différent des juvéniles et des "2 ans" vis-à-vis des conditions environnementales.

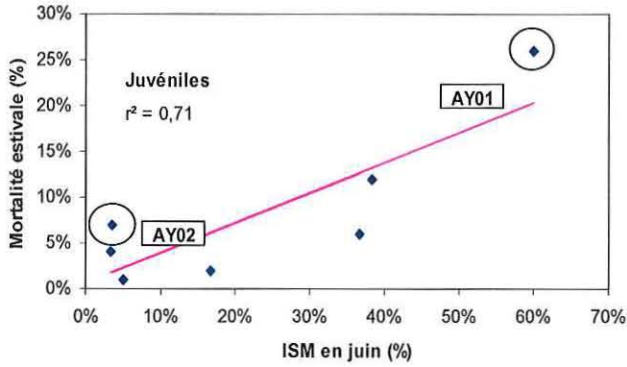


Figure 13a: Relation entre maturité et mortalité chez les juvéniles en Bretagne Sud

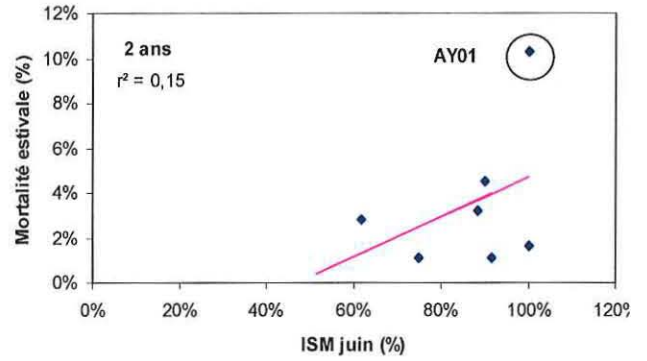


Figure 13b: Relation entre maturité et mortalité chez les "2 ans" en Bretagne Sud

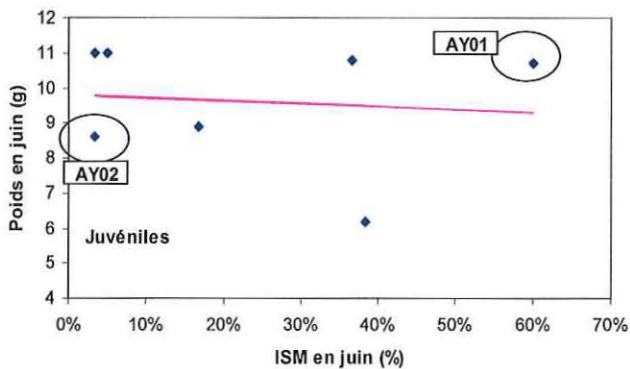


Figure 13c: Relation entre maturité et croissance chez les juvéniles en Bretagne Sud

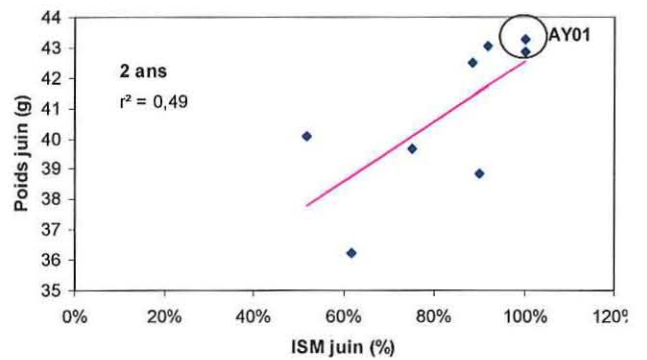


Figure 13d: Relation entre maturité et croissance chez les "2 ans" en Bretagne Sud

## **WP 7 - Gestion des données, information et communication**

### **Tâche 7.1 - Gestion des données**

*Intervenants : A.G. Martin et P.G. Fleury*

Une base de données sous Access avait été créée en début de projet sur le modèle de la base Remora pour la gestion des données terrain de Morest. L'évolution du projet a entraîné un certain nombre de besoins complémentaires qu'il a fallu intégrer dans la base et faire prendre en compte dans le système de saisie associé, inspiré du module de saisie Remora sous Excel. L'ensemble constitue l'application Molluscq.

Durant le 1<sup>er</sup> semestre 2004, plusieurs déplacements ont été effectués par P.-G. Fleury et A.-G. Martin pour installer cette application Molluscq chez les différents utilisateurs : Arcachon, La Tremblade, Bouin, La Trinité, Brest. Il a été expédié par mail en Normandie.

Lors des déplacements, le système a été testé avec des exemples de données de l'équipe concernée et quelques besoins complémentaires ont été identifiés puis intégrés. La dernière version, opérationnelle, a été envoyée aux intéressés mi-juin.

Les utilisateurs ont pu l'utiliser pour saisir les données de terrain 2004 et une partie des données 2002 et 2003.

Fin novembre 2005, les données saisies concernent 65 lots d'huîtres creuses se rapportant à 48 visites de terrain qui se traduisent par, environ, 550 comptages et 55 000 mesures individuelles.

Les données des bases locales sont en cours de récupération sur la base d'archivage sauvegardée par le service RIC à Brest.

La récupération des anciennes données doit se poursuivre début 2005, l'objectif étant d'archiver le maximum de données destinées au partage pour les synthèses MOREST 2005. Un certain nombre de requêtes seront adaptées pour faciliter les extractions.

Précisons toutefois que les données de suivi milieu ne sont pas gérées par ce système.

Ce travail, réalisé pour la première fois sur les données d'un programme conchylicole concernant diverses études et équipes, a contribué à la définition des besoins en gestion de données pour les Ressources Aquacoles, dans la perspective d'une intégration ultérieure dans Quadrigé<sup>2</sup>. Il représente une étape vers un système solide et élargi aux thématiques Aquaculture et Environnement et s'inscrit tout à fait dans la nouvelle programmation Ifremer.

### **Tâche 7.2 - Information, communication et partage**

Les sites Intranet et Extranet ont été mis à jour régulièrement au cours de l'année. Une grande partie des présentations du séminaire de fin novembre étaient en ligne fin décembre.

Le site Internet général prévu n'a pas été mis en ligne en 2004. Toutefois l'information Morest a été développée sur les pages Web de plusieurs laboratoires, les plus documentées étant sur le site du LER Normandie (réalisation Michel Ropert et Anne Boisseaux).

Une centralisation de l'information Morest reste nécessaire en 2005 car l'internaute risque fort de se disperser dans sa recherche. Elle devrait se faire en liaison avec le projet « Expertises, diffusion et transfert des connaissances » et dans l'esprit de la réorganisation du site Internet Ifremer.



## Communications Morest

Bédier\* E., Fleury P-G., Langlade A., Haure J., Le Roux A., Ropert M., Rauflet F., Soletchnick P. (2004). Le risque sédimentaire. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Bédier E., Fleury P-G, Langlade A., Knoery, J.R. Étude des relations mortalités et sédiment en baie de Quiberon. Poster Salon de l'ostréiculture et des cultures marines, La Trinité sur Mer, 11-13 septembre 2004.

Boudry\* P., Dégremont L., Bédier E., Samain J.F. (2004). Selective breeding to improve resistance against summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: results after 3 generations. Communication WAS Aquaculture 2004, Hawaii.

Fleury\* P-G., Mazurié J., Ropert M., Soletchnick P. (2004). Analyse de la base REMORA I: caractérisation des mortalités d'huîtres creuses d'après les données du réseau Ifremer REMORA. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Martin\* A-G., Fleury P-G., Ropert M., Soletchnick P., Rauflet F., Langlade A., d'Amico F., Masson J.C., Checinski G. (2004). La gestion des données de terrain. Etat des lieux. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Mazurié\* J., (2004). Réduire l'accès à la ressource trophique (sans déplacer les cheptels). Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Mazurié\* J., Bédier E., Fleury P-G., Langlade A., Soletchnick P., Ropert M., Costil. K., Maurer D., Auby I. (2004). Le risque reproduction : analyse à partir des observations de terrain. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Ropert\* M., Rauflet F., Soletchnick P., Geairon P., Bédier E., Bouget J-F. (2004). Caractérisation des environnements thermiques des 3 sites ateliers de Morest en lien avec les mortalités observées sur le terrain. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

Soletchnick\* P., Ropert M., Fleury P-G., Mazurié J., (2004). Analyse de la base REMORA II : relation avec l'environnement. Communication Journées Morest, Caen, 24-26 novembre 2004.

## Ifremer - DEL (Ecotoxicologie) - Nantes

Responsable du volet écotoxicologie MOREST : T. Burgeot

Contributions : F. Quiniou, G. Arzul, X. Caisey, J. Bretaudeau, S. Rousseau, B. Averty et J. Knoery

Adresse : DEL/PC, Laboratoire d'écotoxicologie - BP 21105 - 44311 Nantes,

### **Titre : Etude du stress environnemental en période de gamétogenèse**

#### **Introduction**

Les contaminants chimiques présents dans le sédiment et l'eau constituent l'une des multiples sources potentielles de mortalité. Ils agissent sous forme de toxicité directe ou indirecte en fragilisant l'équilibre physiologique des organismes. Les mortalités d'huîtres observées sur les côtes françaises apparaissent pendant une période sensible du cycle biologique qu'est la gamétogenèse. Cette période mobilise une dépense énergétique importante pour assurer le développement des gonades. L'organisme exposé à un stress environnemental se trouve d'autant plus fragilisé qu'il doit également fournir un effort d'adaptation qui se traduit par une consommation d'énergie (Fent 2004). La concordance d'événements naturels (variations de température et de pluviométrie) combinée à des activités anthropiques saisonnières (épandage de pesticides) et la remise en suspension ou diffusion de contaminants issus du sédiment, constituent un environnement stressant.

La contribution des équipes d'écotoxicologie et de biogéochimie du département Biogéochimie et Ecotoxicologie de Brest et Nantes avait pour objectif d'étudier :

- 1) Les sources de stress chimiques dans l'eau et le sédiment
  - 1.a) La production de substances réduites et toxiques ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{H}_2\text{S}$ ) par le sédiment
  - 1.b) La présence de pesticides dans l'eau, l'eau interstitielle et le sédiment
  - 1.c) La toxicité potentielle des sédiments et des eaux de sub-surface pour le développement embryo-larvaire d'huîtres
  - 1.d) La sensibilité de populations de phytoplancton aux apports de pesticides
- 2) L'effort d'adaptation de familles résistantes et sensibles placées en condition de stress environnemental à 15 et 70 cm du sédiment pendant la gamétogenèse.

### **WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ***

#### **Tâche 2.2 - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités**

##### **Les sources de stress dans l'eau et le sédiment**

##### **Production de substances réduites et toxiques (ammonium $\text{NH}_4^+$ et sulfures $\text{H}_2\text{S}$ ) par le sédiment**

La production par le sédiment de substances réduites et toxiques ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{H}_2\text{S}$ ) a été déterminée en 2004 sur 4 sites (Baie des Veys, rivière d'Auray, baie de Quiberon et Marennes). En Baie de Quiberon, on a de plus suivi dans la colonne d'eau les concentrations en sulfure proche du sédiment en fonction du temps.

## Sous-tâche 2.2.6 – FORMER04

### 1.a.1) Evolution saisonnière des sulfures (H<sub>2</sub>S) dans la colonne d'eau

Les données montrent une évolution saisonnière, mais pas de fortes concentrations en H<sub>2</sub>S en 2004 (Fig 1). L'existence de ces données montre que pour ce WP, les outils de prélèvement et d'analyse ont été développés avec succès.

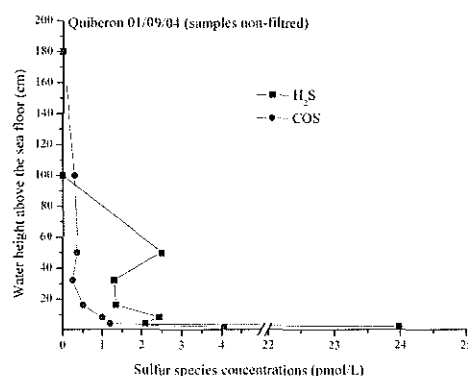


Figure 1 : Concentrations de sulfures dans la colonnes d'eau en Baie de Quiberon.

## Sous-tâche 2.2.6 et 2.2.9 – FORMER04 et DYNAMBDV

### Ammonium et sulfures dans le Sédiment et à l'interface eau et sédiment

A tous les sites échantillonnés (Bassin Marennes-Oléron, Baie de Quiberon (4 stations), Fort Espagnol, et Baie des Veys (2 stations), les résultats sont semblables, suggérant que les processus sont les mêmes sur l'ensemble des zones de prélèvement (Fig 2). Par contre, ils s'y produisent avec des intensités variables car on note des concentrations très différentes d'un site à l'autre.

Pour l'ammonium, les concentrations maximales rencontrées dans le sédiment sont (μmol/L).

- BMO : 2600 le 14 juin (10 fois plus qu'aux échantillonnages précédant et suivant qui ont eu lieu 2 semaines avant le 14 juin)
- BdV : 11000 le 20 août (2 fois plus que les 17 août et 20 septembre)
- Quiberon (QB2) le 16 juin (2 fois plus que le 3/6 et 20 fois plus que le 12 juillet, idem pour les autres stations QB1 à QB5)
- Fort Espagnol : même pic d'ammonium au 16 juin.

Les concentrations d'ammonium à l'interface eau/sédiment (IES) observées sur l'ensemble des sites sont liées à la température. La remontée des substances réduites dans la colonne sédimentaire apparaît au printemps quand la température atteint 18°C.

Le décalage des dates du maximum de concentration d'ammonium entre les stations est sensible entre les sites Atlantique et le site Manche. A la fréquence de l'échantillonnage près, il est identique pour les sites BMO, Quiberon et FE. L'exemple le plus représentatif est celui de la station QB2 ci dessous (Fig 2).

## Ammonium dans les sédiments baie de Quiberon (QB2)

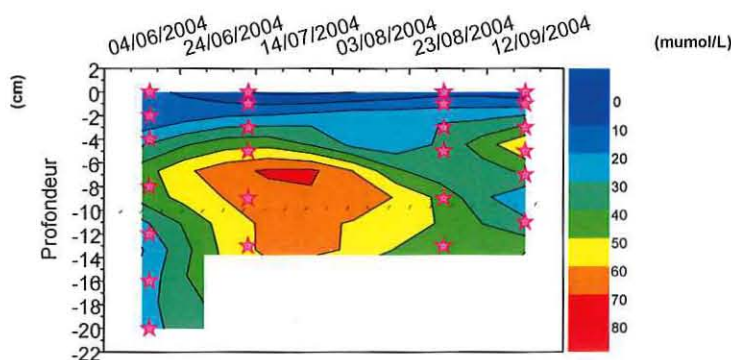


Figure 2 : Profil d'ammonium dans les sédiments à Quiberon entre juin et septembre 2004

Pour le sulfure, les données indiquent aussi une cyclicité dans les concentrations sédimentaires. Les teneurs aux différents sites sont plus hétérogènes dans le temps et l'espace, reflétant la complexité des processus gouvernant les concentrations de sulfure. Cette variabilité rend difficile l'interprétation station par station et date par date. Toutefois, les tendances globales sont fortes. En effet, les concentrations les plus élevées sont observées en BdV en fin d'été alors que dans les sites Atlantique, les concentrations les plus élevées sont décelées en juin 2004. En 2004, les concentrations maximales observées aux 4 sites varient de moins de 40 µmol/L (Quiberon) à plus de 10000 (BdV). L'inventaire en sulfure, moyenné sur l'été suit la progression BMO < Quiberon < FE < BdV.

## WP6 - Caractérisation de l'environnement

### Tâche 6.2 – Acquisition de données

#### Sous-Tâche 6.2.1 – Herbicides sédiment ou/et particulaire comparatif eau

#### Présence des herbicides pesticides dans l'eau, l'eau interstitielle et le sédiment à Marennes Oléron

##### a) Herbicides dans l'eau du bassin sud de Marennes Oléron

Les principaux déterminants conditionnant le transfert des herbicides à l'échelle du bassin versant de la Charente ont été mis en évidence (pluviométrie, réserve utile en eau des sols et périodes d'épandages). Les périodes à risque sont les périodes d'épandage lorsque le niveau de saturation des sols est faible et hors périodes d'épandages lorsque les niveaux de saturation en eau des sols sont élevés (Munaron 2004). Dans le bassin Sud de de Marennes Oléron, le site atelier de Perquis est influencé par l'estuaire de la Seudre. Un point de suivi a été échantillonné dans l'estuaire à Mus de Loup. Celui-ci est également sous l'influence de multiples chenaux drainant les marais voisins qui constituent une zone de confinement des molécules actives d'herbicides. En 2003, neuf molécules avaient été observées dans les eaux superficielles de la Seudre et seulement quatre de ses molécules actives ( isoproturon, glyphosate, mécoprop et carbaryl) étaient retrouvées dans l'estuaire en zone marine proche de Perquis. Les concentrations cumulées des matières actives déterminées en 2003 montraient un pic de concentration ( $0.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) dans la semaine du 9 au 13 juin (Fig 3). Le suivi des matières actives en 2004 dans l'estuaire de la Seudre met en évidence la présence de trois molécules actives le mécoprop, le glyphosate et la trifluraline. Le profil de matières actives est différent entre 2003 et 2004. Seul le mécoprop est retrouvé pendant les deux années. Une concentration élevée de glyphosate ( $1,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) est cependant détectée du 7 au 18

juin 2004. Cette élévation de glyphosate dans le bassin Sud en juin n'est pas associée à une période de forte pluviométrie. L'élévation du glyphosate pourrait être liée directement à des pratiques domestiques dans les communes bordant le bassin Sud. En effet, les municipalités et les habitants des communes environnantes profitent de cette période printanière pour traiter les voiries et jardins avant la venue des touristes.

Malgré des profils de matières actives différentes, le suivi réalisé en 2003 et 2004 met en évidence des concentrations maximales en juin (Fig 3). Le risque de toxicité des herbicides apparaît maximal en juin en concordance avec la période active de gamétogenèse et l'apparition des mortalités.

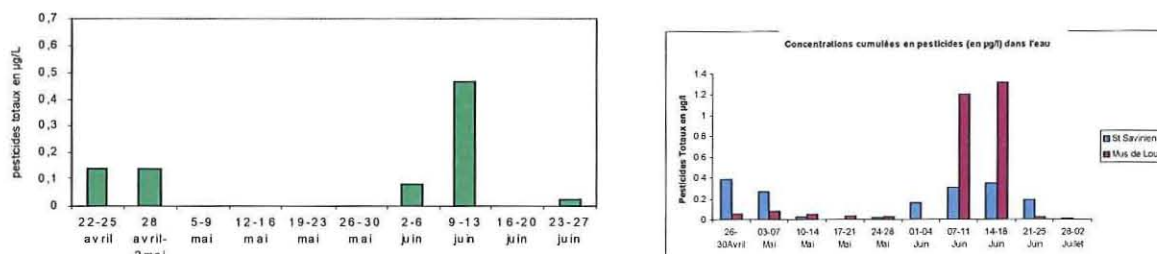


Figure 3 : Quantification d'herbicides en  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (fraction cumulée de molécules actives) pendant la période d'épandage active en 2003 et 2004 sur le site de Mus de loup situé au voisinage du site de Perquis dans le bassin sud.

### b) Herbicides dans l'eau interstitielle

Dans les eaux interstitielles le glyphosate a été détecté le 25 mai, le 9 et 22 juin 2004 à raison de  $0,05 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Le métabolite du glyphosate, l'AMPA est également détecté le 9 et 22 juin à la concentration de  $0,122 \mu\text{g.l}^{-1}$ . La concentration supérieure de l'AMPA traduit une accumulation temporaire dans l'eau interstitielle. La présence d'AMPA confirme un potentiel d'action toxique différé du glyphosate récemment dégradé.

### c) Herbicides dans le sédiment

Dans le sédiment, seule la trifluraline est détectée à raison de 2 à  $6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Cette matière active peu dégradable possède un log de Kow de 4,83. Elle présente donc une plus grande capacité d'adsorption sur le particulaire que les herbicides ayant un log de Kow inférieur. La toxicité de la trifluraline sur le développement du phytoplancton est démontrée pour une concentration dans l'eau de  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Arzul et Durand, 2000) La présence de trifluraline dans le sédiment durant toute la période d'avril à juin 2004 fait apparaître une contamination chronique du sédiment.

## Sous-Tâche 6.2.3 – Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes, (Phyto/phytobenthos)

### Toxicité potentielle des pesticides sur la composition phytopanctonique

La présence de contaminants peut provoquer de manière directe des modifications chez les producteurs primaires et de manière indirecte chez les consommateurs que sont mollusques filtreurs. La modification de la composition spécifique des populations phytoplanctoniques naturelles a donc été étudiée dans le cas d'expositions artificielles à un mélange de pesticides. Le mélange de pesticides est celui utilisé en conditions contrôlées pour étudier le stress combiné hypoxie et pesticides pour l'ensemble des travaux d'exposition réalisés sur les huîtres "R" et "S" à la station Ifremer de Bouin.

Concentration $\mu\text{g.l}^{-1}$	Carbaryl	Métalochlore	Fosetyl Al	Glyphosate	Alachlore	Diuron	Atrazine	Terbutylazine
4,5	0,2	2	2	2	2	4	6	6
24,5	0,05	0,5	0,6	0,7	0,8	0,5	0,7	0,6

Tableau 1 : Deux concentrations d'expositions testées pour le mélange de pesticides. La concentration  $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  représente une forte concentration détectée en Méditerranée et la concentration  $4,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  représente des niveaux détectables dans le bassin de Marennes Oléron.

Les prélèvements ont été réalisés en estuaire de Rivière d'Auray, et sur un site ouvert de la côte Atlantique à Ronce-les-bains. Les résultats obtenus dans la rivière d'Auray (Fig 4) montrent que l'élimination de certaines espèces par les contaminants chimiques peut entraîner un déséquilibre dans la composition floristique. Une diminution des dinoflagellés exposés à un mélange de pesticides est observable à partir du deuxième jour et une disparition est identifiée à partir du quatrième jour. L'exposition d'une population naturelle prélevée à Ronce les Bains au même mélange de pesticides ne provoque pas d'effet significatif sur les dinoflagellés. Ce mélange de pesticides est réalisé à partir d'une sélection des tonnages de substances actives les plus épandues dans le bassin amont de Marennes Oléron. L'absence d'effet sur les dinoflagellés de Marennes Oléron semblerait démontrer une tolérance supérieure des dinoflagellés de Ronce les Bains déjà accoutumés à ces substances actives.

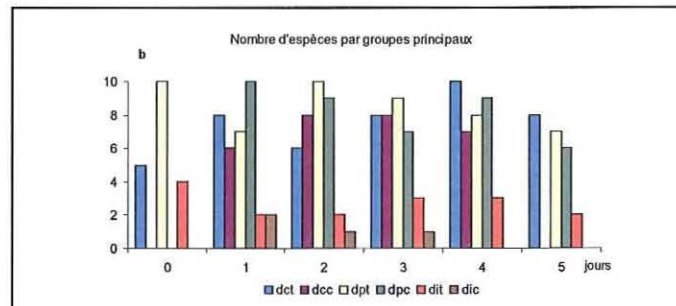


Figure 4 : Variation du nombre d'espèces dans les principaux groupes d'une population naturelles de rivière d'Auray, au cours de l'exposition aux pesticides. Légende: dt : diatomées dans le témoin; dc : diatomées dans le milieu contaminé; dit : dinoflagellés dans le témoin; dic : dinoflagellés dans le milieu contaminé; at : autres groupes dans le témoin; ac : autres groupes dans le milieu contaminé

### Sous-tâches 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9 - Toxicité potentielle des eaux et du sédiment sur des larves d'huîtres

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'existence et l'évolution temporelle, d'une toxicité des eaux et sédiments au niveau des parcs ostréicoles des quatre sites d'étude du projet : Marennes Oléron, Rivière d'Auray (Fort Espagnol), la baie de Quiberon et la baie des Veys.

A Marennes Oléron, 2004 présente une moindre toxicité de l'eau et du sédiment qu'en 2003, cependant cette dernière apparaît au moment des mortalités dès le mois de juin. En baie du Quiberon, les sédiments des parcs en eau profonde ne présentent aucune toxicité potentielle, alors que l'eau à proximité du fond présente un effet non négligeable en automne aux deux points suivis (Beaumer Sud et Men er Roué). En rivière d'Auray, l'eau prélevée n'a montré aucun effet toxique en 2004, alors que les sédiments (Fig 5) présentent une toxicité potentielle corrélée avec leur potentiel à relarguer des sulfures dès juin, période où sont observées les mortalités sur le terrain. En baie des Veys, l'eau (au niveau du point Morest), ne présentait pas de toxicité en 2003 mais induit une forte toxicité en août et septembre 2004 .

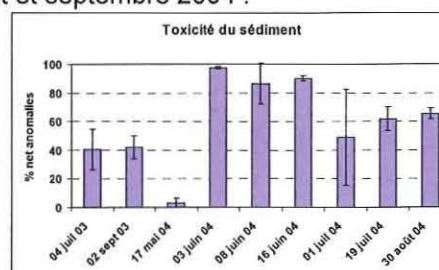


Figure 5 : Toxicité du sédiment en rivière d'Auray évaluée suivant l'apparition du % d'anomalies larvaires identifiées chez des huîtres

### Sous-tâches 2.2.3 - Effort d'adaptation au stress environnemental pendant la gamétogenèse

Les variations de différents biomarqueurs ont été mesurées dans différents organes pour caractériser un effort d'adaptation d'huîtres exposées à un stress environnemental, en condition d'élevage plat-table. L'originalité de cette démarche repose sur la mise en place d'un plan expérimental conduit 1) au laboratoire pour caractériser les réponses de biomarqueurs à un stress combiné hypoxie et pesticides chez un lot "R" et "S" et 2) sur le terrain pour appliquer ces biomarqueurs suivant un plan d'expérimentation visant à évaluer les variations de l'effort d'adaptation d'huîtres "R" et "S" placées à 15 et 70 cm du sédiment. Le suivi de paramètres physiologiques caractérisant la gamétogenèse a été réalisé sur les mêmes lots d'individus afin de comparer l'effort de reproduction des familles "R" et "S" par mesure de la vitelline, des poids de gonades et soma.

#### Caractériser les réponses de biomarqueurs à un stress combiné hypoxie et pesticides

Nous avons reproduit en laboratoire ( station Ifremer de Bouin 2002-2003) des conditions de stress combinant une hypoxie avec un mélange de pesticides dans le but de traduire les réponses biologiques qui seront étudiées sur le terrain. Cette approche nous a permis de développer des biomarqueurs physiologiques pour étudier différents mécanismes précoces répondant à une exposition aux contaminants chimiques. L'étude des mécanismes précoces permet de caractériser l'effort d'adaptation des huîtres soumises à un stress. Deux familles d'huîtres résistantes "R" et sensible "S" ont été exposées en conditions contrôlées suivant trois conditions à 1) un mélange de huit pesticides à deux concentrations, 2) un stress hypoxique (30% oxygène) et 3) à un stress combinant le mélange de pesticides et l'hypoxie.

Le mélange de pesticides (tableau 1) a été sélectionné sur la base des tonnages utilisés dans le bassin versant de la Charente et à partir de concentrations de molécules actives analysées en Seudre et dans la Charente (Léonard 2004). Les molécules actives composant le mélange étaient au nombre de huit (glyphosate, métalochlore, fosetyl Al, glyphosate, alachlore, diuron atrazine et terbutylazine).

Une batterie de sept biomarqueurs physiologiques apportant une réponse précoce après exposition a été mesurée dans les tissus d'huîtres exposées pendant 7 jours. La période de 7 jours est importante dans l'étude des pesticides car elle est utilisée pour évaluer le temps de latence entre une période de pluie et l'arrivée des molécules actives dans l'eau douce (Léonard 2004) ou l'eau de mer (Bocquené 2003). Ces biomarqueurs ont été sélectionnés dans le but de caractériser des mécanismes spécifiquement modifiés ou perturbés par la présence de pesticides et la combinaison d'une hypoxie

Biomarqueurs	Mécanismes physiologiques précoces
Glutamine synthétase	Métabolisme de l'azote
Glycogène	Métabolisme énergétique
Glucose 6-phosphate deshydrogenase	Métabolisme énergétique
Catalase	Stress oxydatif
Lactate et succinate	Métabolisme anaérobie
Transport d'électron	Métabolisme aérobie
Adduits à l'ADN	Altération primaire de l'ADN

Tableau 2 : Mécanismes étudiés suivant les différents biomarqueurs d'exposition

L'expérience réalisée avec de fortes concentrations environnementales de pesticides (24,5 µg.l<sup>-1</sup>) met en évidence l'impact de ces molécules sur les organismes. Les conditions d'hypoxie du milieu sont également perturbantes pour les organismes et modifient les activités enzymatiques de certaines voies de métabolisation. La présence de pesticides amplifie, dans certains cas, les perturbations métaboliques provoquées par l'hypoxie.

### Stress hypoxique : une utilisation des ressources énergétiques plus efficace chez la famille "R" en condition d'hypoxie

La mesure du métabolisme énergétique (G6PDH et glycogène) met en évidence une utilisation des ressources énergétiques différentes entre familles "R" et "S" en condition de stress provoqué par l'hypoxie. L'activité enzymatique G6PDH est supérieure chez les "R" (Fig 7) ce qui signifie une meilleure capacité de la famille "R" à mobiliser son potentiel énergétique en situation de stress hypoxique. La quantité de glycogène est inférieure chez les huîtres "R" car elle semble plus efficacement utilisée que chez les huîtres de la famille "S".

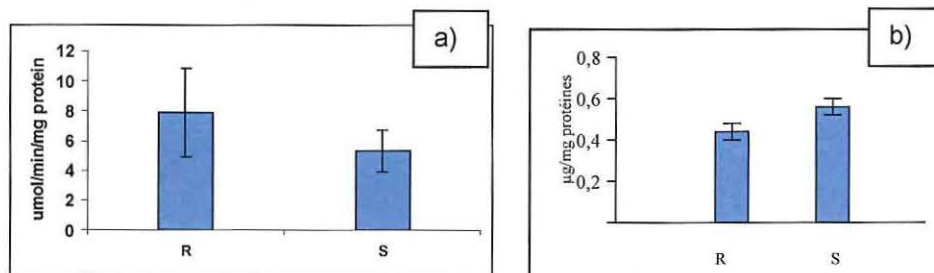


Fig 7 a) : Activité G6PDH dans les branchies d'huîtres réssitantes "R" et sensibles "S" en condition d'hypoxie.

Fig 7b) : Teneurs en glycogène dans les branchies d'huîtres réssitantes et sensibles en condition d'hypoxie

### Stress combiné hypoxie et pesticides

**Un métabolisme anaérobie activé :** Les huîtres accumulent de manière significative ( $p < 0,05$ ) le lactate dans le muscle adducteur après sept jours d'exposition en normoxie ou hypoxie. Cependant, la voie privilégiée de production des succinates chez les bivalves montre une élévation de la production de succinate après sept jours d'hypoxie. La production de succinate est activée plus précocement en présence de pesticides dès le premier jour d'exposition (Fig 8) :

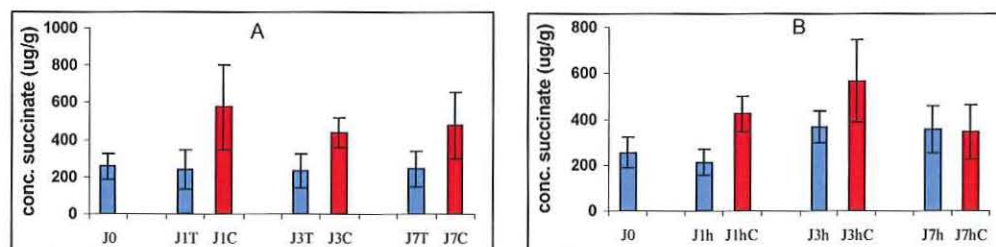


Fig 8 : Teneurs en succinate dans le muscle adducteur des huîtres sensibles en condition de normoxie (A) et d'hypoxie (B).

JXT = Xème jour d'exposition pour les témoins

JXC = Xème jour d'exposition pour les exposées aux pesticides

JXh = Xème jour d'exposition pour les huîtres en condition d'hypoxie

JXhC = Xème jour d'exposition pour les huîtres exposées aux pesticides en condition d'hypoxie

**Une plus grande réactivité des huîtres "R" après trois jours d'exposition :** Parmi les différents biomarqueurs physiologiques étudiés, l'exemple choisi du biomarqueur d'activité enzymatique de la catalase (CAT) démontre une différence de réponse au stress oxydatif entre "R" et "S" placées en conditions d'hypoxie ou exposées à un mélange de pesticides ou exposées à un stress combiné hypoxie et pesticides. Les "S" sont peu réactives aux conditions d'hypoxie en présence ou absence de pesticides (Fig 9). Les "R" sont réactives après un jour d'exposition aux pesticides en normoxie et après un et trois jours d'exposition en hypoxie plus pesticides. L'effet des pesticides est amplifié en condition combinée d'hypoxie et pesticides avec une activité CAT qui atteint un maximum après trois jours d'exposition.



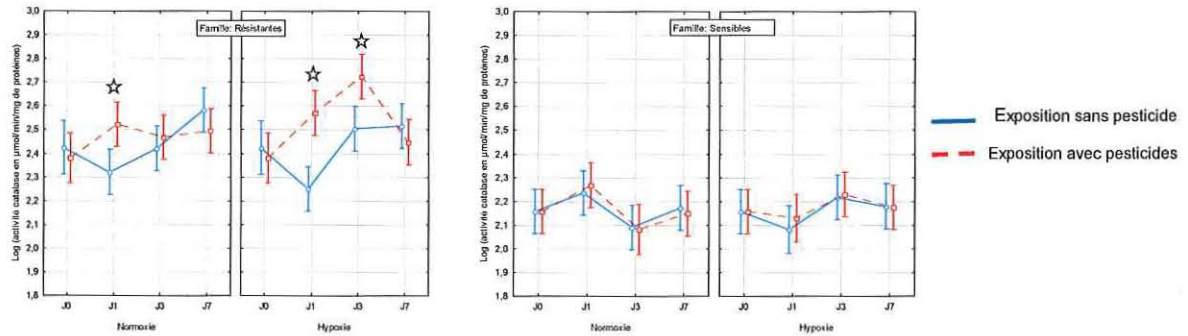
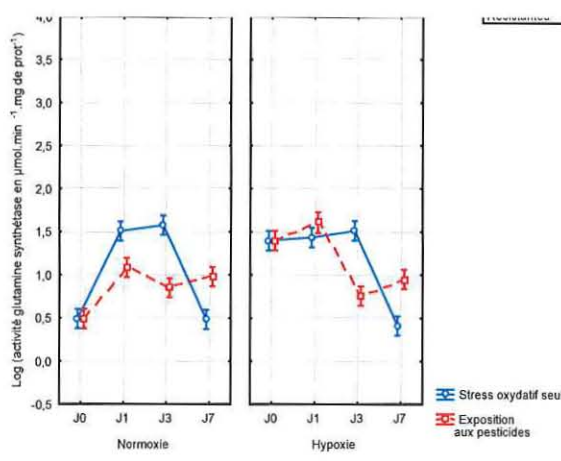


Figure 9 : Etude cinétique de l'activité catalase dans les branchies d'huîtres pendant sept jours d'exposition d'huîtres résistantes « R » et sensibles « S » en condition de normoxie et d'hypoxie (bleu) et après exposition à un mélange de pesticides ( $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) en normoxie ou en stress combiné avec hypoxie (rouge). Pour les résistantes : différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité catalase après un jour d'exposition aux pesticides en normoxie et différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité catalase après un et trois jours d'exposition aux pesticides combiné à l'hypoxie.

**Stress oxydatif : Une cinétique de réponse du stress oxydatif (CAT) plus rapide aux fortes concentrations de pesticides chez la famille résistante et une capacité d'adaptation au stress chronique inférieure à sept jours.**

L'activité catalase (CAT) est étudiée comme biomarqueur de stress oxydatif. Aucune différence significative n'est observée chez la famille sensible en normoxie, en hypoxie ou en présence de pesticides. A la plus forte concentration de pesticide ( $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) et en normoxie, la CAT présente une réponse significativement supérieure au témoin ( $p < 0,05$ ) après un jour d'exposition (Fig 9). Exposée à une concentration plus faible de pesticides ( $4,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), l'activité CAT augmente progressivement jusqu'au troisième jour d'exposition puis elle diminue après sept jours d'exposition. Ce résultat confirme une plus grande réactivité des huîtres R. Il illustre également la cinétique de réponse associée à un effort de régulation physiologique. L'étude de ce mécanisme oxydatif précoce démontre une capacité d'adaptation en moins de sept jours pour retrouver un niveau d'homéostasie.

**Stress nitrique : Un métabolisme de l'azote réduit en présence de pesticides chez les huîtres résistantes à forte et faible concentrations de pesticides.**



La mesure de l'activité glutamine synthétase (GS) permet de caractériser une étape du cycle de Krebs qui concerne la transformation du glutamate en glutamine. Cette activité sensible et précoce est plus généralement utilisée comme biomarqueur de stress nitrique chez les algues et le phytoplancton. Elle met en évidence (Fig 10) une activité métabolique réduite des huîtres « R » après trois jours d'exposition aux pesticides à forte ( $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) et faible concentration ( $4,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ). La réduction d'activité métabolique est supérieure en condition de stress combiné hypoxie et pesticide.

Figure 10 : Activité glutamine synthétase ( $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ) dans la glande digestive d'huîtres résistantes mesurée en condition de normoxie avec et sans pesticides et en hypoxies avec et sans pesticides. (Les pointillés rouges indiquent les effets combinés du mélange de pesticides en condition de normoxie ou en condition d'hypoxie à la concentration de  $24,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ).

## Métabolisation des pesticides et stress génotoxique

### Une capacité des huîtres "résistantes" à métaboliser le glyphosate alors que les "sensibles" en semblent dépourvues.

La mesure de glyphosate et de son métabolite (AMPA) dans les tissus d'huîtres met en évidence une capacité de bioaccumulation et de métabolisation du glyphosate après sept jours d'exposition. Les huîtres "R" et "S" bioaccumulent de manière similaire le glyphosate mais avec une limite de bioaccumulation variant de 2,9 à 3,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Les deux expérimentations conduites avec deux concentrations de 4,5 et 24,5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  montrent que le seuil de 3,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  n'est pas dépassé. Seules les résistantes métabolisent le glyphosate en son métabolite l'AMPA. La bioaccumulation de l'AMPA varie de 2,2 en hypoxie à 9,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  en normoxie à la plus forte concentration de pesticides (Tableau 3). (Ce résultat original mérite d'être discutée suivant la littérature car les résultats obtenus sont pour certains inférieurs au seuil limite de détection LD= 0.5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

Jours d'exposition en hypoxie et normoxie	Concentration d'exposition au glyphosate 24,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$		Concentration d'exposition au glyphosate 4,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$	
	Glyphosate $\mu\text{g.kg}^{-1}$	AMPA $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Glyphosate $\mu\text{g.kg}^{-1}$	AMPA $\mu\text{g.kg}^{-1}$
J0S	<LD	<LD	<LD	<LD
J0R	<LD	<LD	<LD	<LD
J7S normoxie	3,1	<LD	2,9	<LD
J7S hypoxie	2,9	<LD	3,7	<LD
J7R normoxie	3,5	9,8	3,8	6,2
J7R hypoxie	3,7	2,2	3,3	6

Tableau 3 : Concentrations en glyphosate et AMPA (métabolite du glyphosate) dans les deux familles d'huîtres (S sensibles et R résistantes) à (J0) et (J7) jours d'exposition en condition de normoxie et d'hypoxie et suivant deux concentrations à 24,5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (expérience de décembre 2002) et 4,5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (expérience de février 2003)

### Stress génotoxique : une plus grande altération primaire de l'ADN chez les huîtres "résistantes" en présence de pesticides

L'exposition des huîtres sensibles et résistantes au mélange de pesticides (24,5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) démontre l'apparition d'altérations primaires de l'ADN appelées adduits à l'ADN. Les métabolites métabolisés par les huîtres à partir des molécules de pesticides assimilées sont majoritairement excrétés mais une partie reste dans les tissus et s'accroche à l'ADN par liaison covalente. Les adduits à l'ADN (comme l'aneuploidie) permettent de caractériser un stress génotoxique. Un nombre d'adduits à l'ADN a donc été détecté chez les huîtres résistantes et sensibles après sept jours d'exposition à un mélange de pesticides. Le nombre d'adduits par  $10^9$  nucléotides est quatre fois plus élevé chez les huîtres "R". Une forte contamination des huîtres de la Seudre par les HAP (255  $\mu\text{g.g}^{-1}$  poids sec, Miramand et al., 2004) pourrait contribuer à la formation d'adduits à l'ADN.

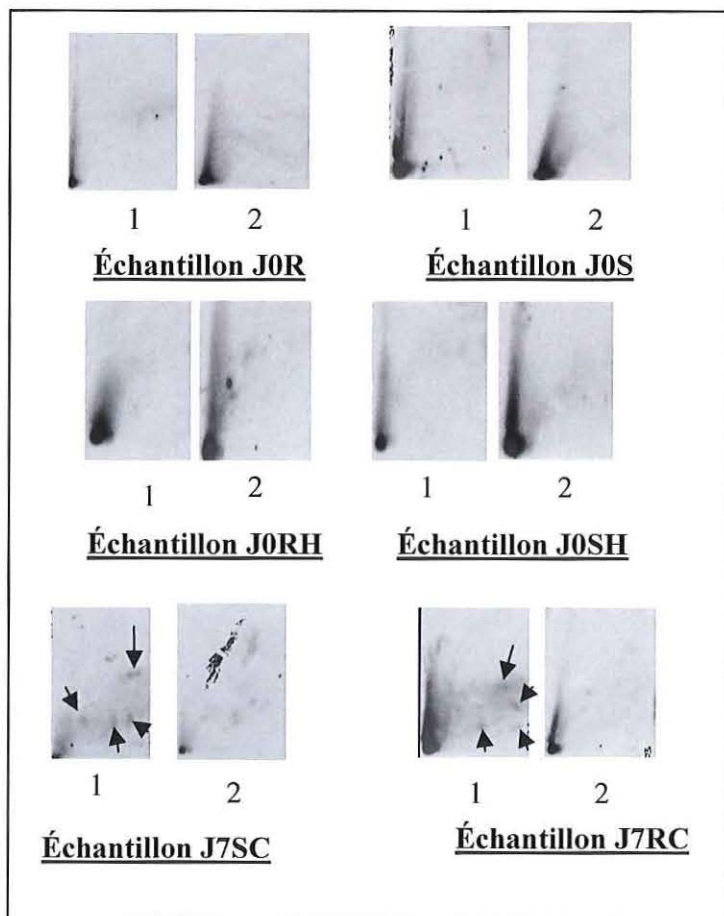


Figure 11 : Autoradiographie montrant des adduits à l'ADN dans les branchies des huîtres témoins (J0R et J0S) ou exposées aux pesticides en condition de normoxie (J7SC : 7 jours d'exposition d'huîtres S au mélange de pesticides à la concentration C de 24,5µg.l<sup>-1</sup> et J7RC : 7 jours d'exposition d'huîtres R au mélange de pesticides à la concentration C de 24,5µg.l<sup>-1</sup>). Deux films radiographiques sont effectués par échantillon. Aucun spot n'apparaît dans les échantillons témoins J0R et J0S et dans les échantillons soumis à l'hypoxie J0RH et J0SH. Sur le plan qualitatif quatre spots sont identifiés (→) chez les résistantes et les sensibles. Ceci indique un même profil qualitatif des adduits ADN entre R et S. La méthode utilisée (post marquage au phosphore 32) ne permet pas de préciser quelles molécules de pesticide sont responsables de la formation d'adduit à l'ADN. Cependant, sur la plan quantitatif, les branchies des huîtres résistantes présentent un taux d'adduits de 2 pour 10<sup>9</sup> nucléotides alors que le taux d'adduits chez les sensibles est de 0,5 pour 10<sup>9</sup> nucléotides.

**Un effort de reproduction différent entre familles "R" et "S"**

**Un indice général de qualité marquant une période critique de prémortalité :** L' indice général de qualité (Walne et Mann 1978) mesuré par Soletchnik et al., 2003 chez les "R" et "S" de mars à septembre, met en évidence une qualité inférieure des S et un amaigrissement des R et des S pendant le mois qui précède les mortalités, du 14 mai au 10 juin. Cette période de prémortalité est marquée par des variations de paramètres environnementaux tels que l'élévation de 1,3 ‰ de la salinité entre 14 mai et le 10 juin et une atteinte de la température de 19°C le 2 juin. Elle se distingue également par des plus fortes fluctuations d'insolation avec deux chutes importantes le 2 et 10 juin. Les écarts journaliers du taux d'oxygène dissous entre les hauteurs 15 et 70 cm du sédiment sont les plus réduits pendant cette période.

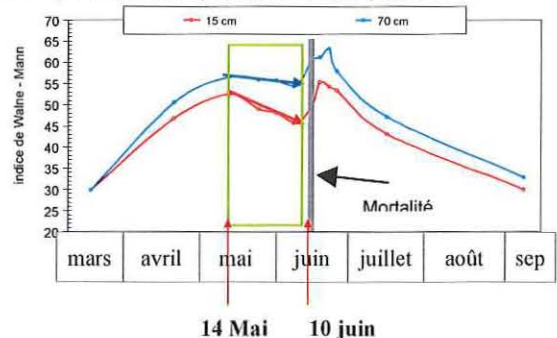


Figure 12 : Indice de Walne et Mann 1978 ( [poids de chair sèche/poids de coquille]x 1000 ) mesuré pendant la période de gamétogenèse (Soletchnik P., 2003)

**Une étude de la vitellogenèse fait apparaître deux événements importants pendant la période du 14 mai au 10 juin.** La mesure de vitelline dans les gonades d'huîtres femelles constitue un marqueur physiologique de vitellogenèse mais il est également utilisé comme biomarqueur de perturbations endocriniennes chez les bivalves (Gagné et al., 2005) sur des sites pollués. L'étude de la vitelline met en évidence deux événements importants le 14 mai et le 2 juin.

- Une chute de la vitelline est mesurée le 14 mai chez les "R" à 15 et 70 cm du sédiment et chez les "S" à 15 cm du sédiment. Les "S" placées à 70 cm du sédiment ne font pas apparaître de chute le 14 mai et ne semblent pas sensibles à cet événement.
- A partir du 2 juin, l'effort de vitellogenèse apparaît plus élevé chez les huîtres "R" que les "S". La vitellogenèse est plus active chez les "R" que les "S". Les femelles S semblent avoir atteint leur maximum de production de vitelline le 2 juin. L'effort de vitellogenèse des femelles "R" placées à 15 cm du sédiment atteint un maximum le 16 mai. Celui-ci est deux fois supérieur au maximum de vitelline produit chez les "S" deux semaines plus tôt. Un décalage de deux semaines apparaît entre l'effort de reproduction des femelles "R" et des "S". La distance du sédiment semble prédominante pour les familles "R" qui réagissent plus activement aux stimuli issus du sédiment.

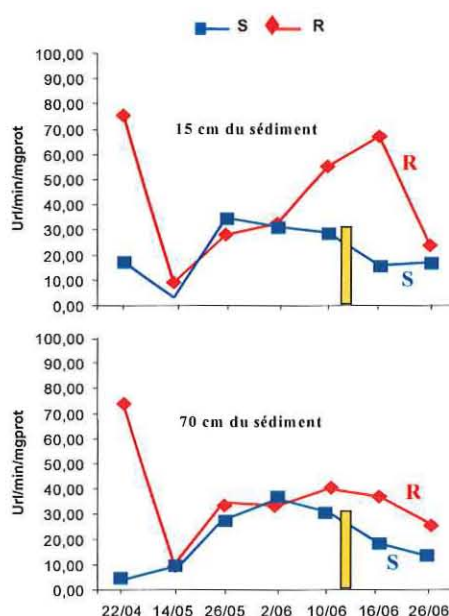


Figure 13 : Mesure de vitelline dans les gonades d'huîtres "R" et "S" placées à 15 et 70 cm du sédiment

### **Effort d'adaptation au stress environnemental pendant la gamétogenèse : Une capacité d'adaptation moins efficace des familles "S" au stress environnemental**

La gamétogenèse et les pontes provoquent des remaniements métaboliques importants. Elles influencent ainsi directement l'effort d'adaptation au stress environnemental. Il apparaît donc intéressant d'interpréter le stress en fonction d'évènements qui apparaissent pendant la gamétogenèse.

### **Deux évènements de stress sont mesurables avec les biomarqueurs enzymatiques qui caractérisent un effort d'adaptation aux stimuli environnementaux, le 14 mai et le 2 juin avant les mortalités.**

L'étude du stress a été réalisée en 2003 en appliquant les biomarqueurs des effets subléthaux développés en conditions contrôlées à la station Ifremer de de Bouin en 2002 et 2003. La mesure de six biomarqueurs dans les glandes digestives et les branchies (catalase CAT, heat shock protéines HSP, métallothionéines MT, glutamine synthétase GS, glutathion-s-transférase GST et espèces réactives de l'oxygène ROS) pendant la gamétogenèse met en évidence des différences significatives entre "R" et "S" suivant les dates de

prélèvements et la distance du sédiment. Les variations de biomarqueurs représentatifs de mécanismes précoces et caractéristiques du métabolisme (GS : métabolisme de l'azote, GST: métabolisme de détoxification de phase 2) de mécanismes de défense ( MT et HSP) ou de stress oxydatif (CAT et ROS) permettent d'évaluer un effort métabolique d'adaptation à un stress environnemental.

**Stress oxydatif issu du sédiment** : Etudiés séparément, chaque biomarqueur permet de caractériser un effet sédiment et/ou un effet famille, avant et pendant les mortalités. La pertinence de chaque biomarqueur a été testée suivant les différentes conditions expérimentales (A) : familles "R" et "S", (B) : distance du sédiment 15 et 70 cm et (C) : dates. La catalase apparaît le biomarqueur le plus pertinent aux trois conditions testées (ANOVA à 3 facteurs). L'exemple de la mesure de l'activité catalase permet de caractériser un stress oxydatif significativement différent suivant la hauteur du sédiment (familles "R" et "S" confondues).

- Dans le mois qui précède les mortalités entre le 14 mai et le 2 juin, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) de l'activité catalase sont observables le 26 mai et le 2 juin entre les hauteurs 15 et 70 cm. Une élévation de l'activité catalase indique un stress oxydatif le 26 mai à 15 cm du sédiment.
- Pendant la période de mortalité (10 au 16 juin) une activation du stress oxydatif est observable à 15 cm du sédiment le 10 et 16 juin, alors qu'il est réduit à 70 cm du sédiment (différences significatives à 15 et 70 cm du sédiment ;  $p < 0,05$ ). Le stress oxydatif des huîtres "R" et "S" confondues apparaît significativement plus élevé au niveau du sédiment pendant les mortalités. Le retour à des valeurs d'activités catalase similaires entre 15 et 70 cm du sédiment le 26 juin, marque la fin de la période de stress oxydatif.

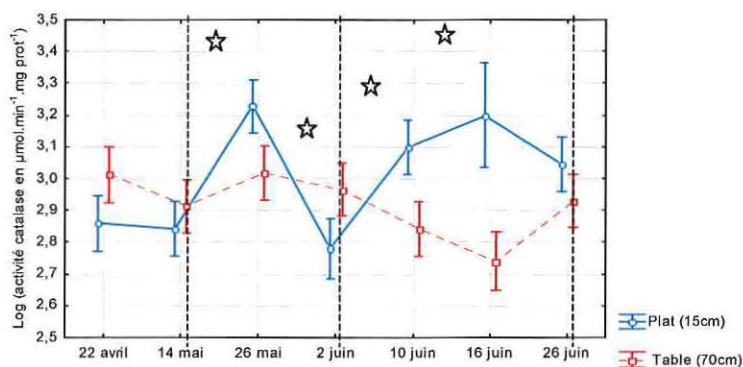


Figure 14 : Activité catalase en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgprot}^{-1}$  mesurée dans les branchies d'huîtres résistantes et sensibles confondues sur le site de Perquis (Marennes Oléron). Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

**Un effet sédiment pendant les mortalités** : Un indice composite intégrant six biomarqueurs (IBR : integrated biomarker response validé chez la moule et le poisson par Beliaeff & Burgeot 2002) a été appliqué pour faciliter une interprétation globale de l'effort métabolique d'adaptation. Un schéma (fig 14) des réponses métaboliques d'adaptation regroupant six biomarqueurs permet de comparer graphiquement les profils dynamiques de réponses entre "R" et "S" placées à 15 et 70 cm du sédiment.

Une différence des "R" et "S" aux stimuli environnementaux est observée. Elle confirme les différences identifiées avec la mesure de la vitelline (fig 12) et de la catalase (fig 13) aux dates clés du 14 mai et 2 juin. L'IBR permet de distinguer deux événements stressants le 14 mai et le 2 juin pendant une période de stress chronique.

**Des profils de réponses associés à l'origine génétique en période de stress chronique** : L'indice composite IBR chute le 14 mai chez les "R" à 15 et 70 cm alors que les IBR augmentent chez les "S" à 15 cm du sédiment. A la date du 2 juin, les IBR des "R" à 15 et 70 cm montrent une activité métabolique qui augmente alors que l'activité des "S" à 15 cm est réduite. La hauteur du sédiment n'apparaît pas prédominante en période de prémortalité.

**L'effet sédiment apparaît prédominant sur l'origine génétique pendant la mortalité** : Pendant la mortalité, la prédominance d'un stress lié au sédiment confirme les résultats obtenus avec la catalase. L'activité métabolique des "S" et des "R" à 15 cm chute alors que celle des R 70 augmentent.

L'indice global IBR permet également de caractériser une capacité d'adaptation très dynamique chez les huîtres résistantes à 70 cm du sédiment et une très faible réactivité des huîtres sensibles placées à 70 cm du sédiment. L'Indice composite IBR mesuré indifféremment chez les mâles et femelles sensibles à 70 cm du sédiment, confirme la faible réactivité des huîtres "S" également observée chez les femelles avec la mesure de la vitelline (fig13). La régulation dynamique a été interprétée comme un signe de bonne capacité d'adaptation de bivalves (*Mya arenaria*, Gagné et al., 2005) dans des travaux menés dans le Saint-Laurent.

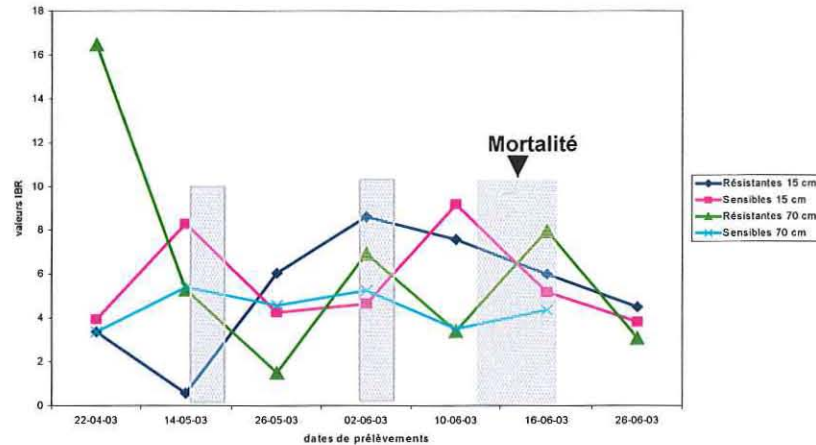


Figure 15 : Schéma global des variations de l'IBR pour les familles "R" et "S" placées à 15 et 70 cm du sédiment. Les variations de l'IBR sont représentatives de l'effort d'adaptation des huîtres au stress environnemental. Le 2 juin, avant les mortalités, les familles "R" et "S" ont une évolution illustrant la prédominance d'un effet cheptel avec une mise en phase des stratégies de réponse suivant les familles. Le 10 juin, début de la mortalité, l'effet distance du sédiment semble prédominant avec une mise en phase des réponses d'adaptations rapprochant les IBR les plus élevés apparaissent pour les familles "R" et "S" à 15 cm et les IBR les plus faibles pour les familles "R" et "S" à 70 cm.

## Conclusion

Le stress environnemental est abordé sur la base du couplage hôte-environnement pendant une période clé du cycle biologique qu'est la reproduction. Dès l'entrée en phase de la gamétogenèse, les processus de constitution des gamètes mobilisent le catabolisme des réserves énergétiques et entraîne un remaniement métabolique. La concomitance d'événements environnementaux stressants pendant cette période affaiblit l'organisme et peut entraîner des mortalités en dépassant les capacités d'adaptation des huîtres.

Un plan d'échantillonnage ciblé sur des conditions d'élevage plat-table de familles résistantes et sensibles permet ainsi d'alimenter l'hypothèse d'un stress chronique avant les mortalités sur la base d'événements stressants apparaissant pendant la gamétogenèse.

- La mesure de l'indice de qualité générale de Walne et Mann indique clairement une période critique du 14 mai au 10 juin provoquant un amaigrissement des "R" et "S". Dans cette période la mesure de vitelline fait apparaître deux événements stressants. Le 14 mai se distingue par une chute de la production de vitelline chez les "R" et "S" et le 2 juin illustre une différence de stratégie entre les femelles des familles "R" et "S". Un effort maximal de production de vitelline est identifié chez les "S" le 2 juin alors que les "R" à 15 cm du sédiment poursuivent un effort de vitellogenèse en produisant deux fois plus de vitelline le 16 juin. La vitellogenèse confirme également un profil de production de vitelline différent entre familles "R" placées à 15 et 70 cm du sédiment.
- Un effet sédiment pendant les mortalités est détectable avec certains biomarqueurs d'exposition comme la catalase qui caractérise un stress oxydatif. Plusieurs sources de perturbations semblent confirmer la contribution du sédiment au stress environnemental. Les flux de substances réduites (sulfures et ammonium) à la surface du sédiment en période printanière à partir de 18°C

Le potentiel toxique démontré à Marennes Oléron (Perquis) sur les stades embryo- larvaires d'huitres

Une contamination chronique du sédiment. Un herbicide sélectif, la trifluraline, est ainsi détectée dans le sédiment pendant la période d'avril à juillet (2 à 6  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de poids sec). S'ajoute également une contamination du sédiment par des hydrocarbures aromatiques polycycliques démontrée dans le rapport produit par Miramand et al., 2004 .

- Pendant la période de stress chronique qui précède les mortalités, l'étude générale de la réponse métabolique des biomarqueurs d'exposition illustre plutôt une influence de l'origine génétique qu'une prédominance de l'effet sédiment ou de la colonne d'eau. Bien qu'il ne soit pas démontré de manière directe, un risque d'exposition chimique lié aux herbicides ne peut être exclu mais il n'apparaît pas prédominant.

Les travaux menés en laboratoire ont démontré la sensibilité différentes de familles "R" et "S" au stress combiné d'une hypoxie et d'un mélange de pesticides.

Sur le terrain, la quantification d'un pic d'herbicides en juin 2003 et 2004 dans le bassin Sud de Marennes Oléron, confirme le risque chimique. La présence majoritaire de l'Isoproturon ( $0,4 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) en juin 2003 et une concentration élevée du glyphosate en juin 2004 ( $1,3 \mu\text{g.l}^{-1}$  dans les eaux superficielles et  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  dans les eaux interstitielles) montre que le profil d'exposition correspond à des cinétiques d'exposition courtes ( quelques heures à quelques jours) et qu'il peut être différent d'une année à l'autre avec des sources de pollution d'origines agricole et non agricole.

## Bibliographie

ARZUL G et G. DURAND, 2000. Effet des herbicides sur la croissance in vitro du phytoplancton marin. Etude CUB. Pollutions diffuses : du bassin au littoral. 86-94.

BELIAEFF, B. & BURGEOT, T., 2002, Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, (6), 1316-1322.

BOCQUENE, G., 2003, Bilan ponctuel de la présence et des effets des pesticides en milieu littoral martiniquais en 2002, Ifremer Délégation des Antilles, 39

FENT, K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 223-240.

GAGNE F and C. Blaise, 2005. Effects of pharmaceutical on aquatic biota. Review. Research trends, current topics in toxicology. *In press*.

LÉONARD, S., 2003, Réseau régional de suivi de la qualité des eaux vis à vis des produits phytosanitaires. Année 2002, GRAP, Fédération Regionale de Défense contre les Organismes Nuisibles Poitou-Charentes, 73.

MIRAMAND P., PIGEOT J., GUYOT T., BUSTAMANTE P., HUET V., FICHET D. et H. BUDZINSKI, 2004. Etude des polluants métalliques (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn), des organochlorés (Lindane, PCB) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les organismes vivants sur une zone intertidale du bassin de Marennes Oléron (Charente-Maritime). Rapport Agence de l'eau Adour Garonne 290/98/0004. 59p.

MUNARON D, SCRIBE P, DUBERNET J.F., KANTIN R., VANHOUTTE A., FILLON A., BACHER C., 2003. Estimation of herbicide inputs in a sensitive area on the Atlantic coast : Marennes Oléron Bay (France). XII Symposium Pesticide Chemistry June 4-6 2003, Italy.

SOLETCHNICK, P. 2003. Rapport d'activité MOREST.

## Ifremer - DRV/RA - Laboratoire Conchylicole Pays de Loire (LCPL) Bouin

---

Responsable : J. HAURE

Le personnel impliqué de la Station de Bouin : M. NOURRY, M. PAPIN, B. DUPUY

Adresse : Polder des Champs - 85230 - BOUIN

### Introduction

Les missions du LCPL sont, dans le cadre du défi MOREST, et depuis 2001 de prégrossir en nurserie le matériel biologique provenant de l'écloserie de Ronce avant d'être positionné sur les différents sites ateliers. En outre, le laboratoire a contribué, en 2003, à l'étude spécifique du modèle de mortalité "plat-table" du bassin de Marennes Oléron (DynamoR) à deux niveaux :

- bilan énergétique des huîtres "R" et "S" à plat et sur table à trois dates situées autour des mortalités,
- synthèse des données physiologiques descriptives de la reproduction (Séminaire Morest : La Rochelle).

En 2004, le LCPL est intervenu essentiellement dans les tâches du WP2 :

- tâche 2.2.11 : CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié),
- tâche 2.2.6 : FORMER04 (Comparaison dynamique de mortalité intra site baie de Quiberon),
- tâche 2.2.3 : DYNAMOR (Suite analyse et traitement des données).

Le laboratoire devait également intervenir dans le WP3 (BETONBLOOM) mais cette étude n'a pu se réaliser à cause de problèmes techniques rencontrés à l'écloserie de Ronce. D'autre part le LCPL a en 2004 pré grossi de nombreuses familles (36) issues de croisement bi-parentaux ainsi que des pools d'individus "R" et "S" indispensables à la poursuite des études de Morest.

## WP 2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

### Tâche 2.2.11 - CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié)

L'origine de cette étude provient d'une hypothèse selon laquelle les animaux qui pondent précocement seraient de nature résistante "R" et transmettraient cette particularité génétique à leur descendance. A l'inverse, les individus qui se reproduisent tardivement tiendraient du caractère génétique sensible "S" dont souffrirait également leur progéniture. Ce constat est régulièrement fait dans le bassin d'Arcachon.

En 2004, l'objectif a été d'obtenir des lots de naissain issus de captage précoce (début août) et tardif (mi-septembre) dans le bassin d'Arcachon (DEL Arcachon). Ces individus ont été récupérés au LCPL respectivement le 19 août et le 28 septembre 2004 pour être pré grossis en nurserie



après détroquage. En parallèle, des animaux en pool "R" et "S" en provenance d'Argenton (15/09/04) et de Ronce (23/09/04) ont été accueillis à Bouin pour y suivre un parcours d'élevage identique et constituer les lots témoins résistants et sensibles.

Ces animaux seront pré-grossis jusqu'à la fin mars 2005, date à laquelle ils seront répartis sur sites naturels pour y être suivi et vérifier si l'hypothèse de départ est vraie.

Les qualités et quantités disponibles (janvier 2005) du cheptel peuvent être appréciées sur les figures 1 et 2.

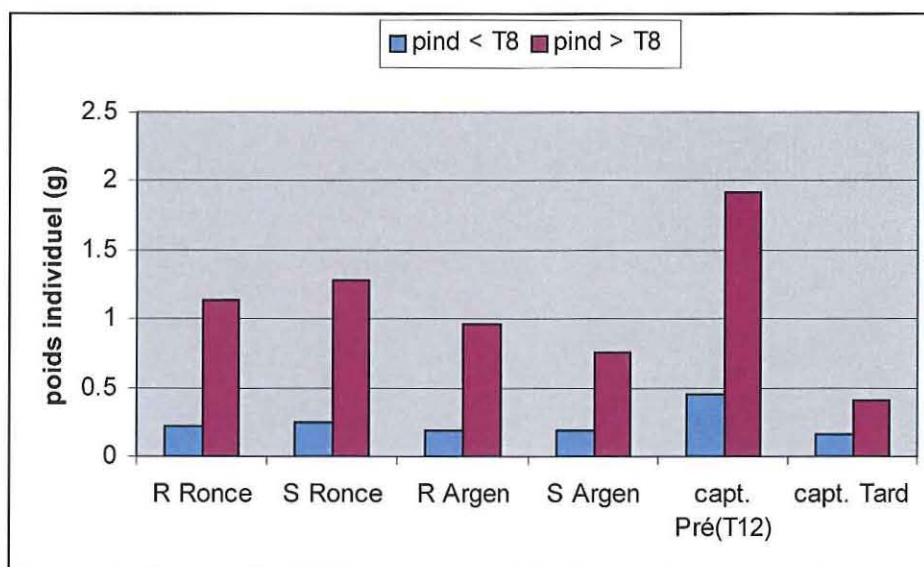


Figure 1 : Poids moyen individuel des individus par classe de taille et origine.

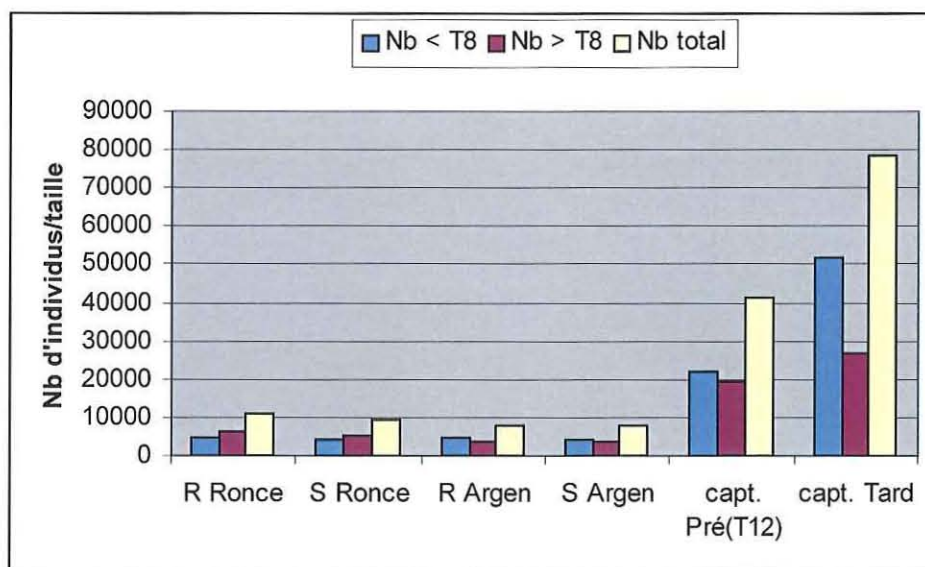


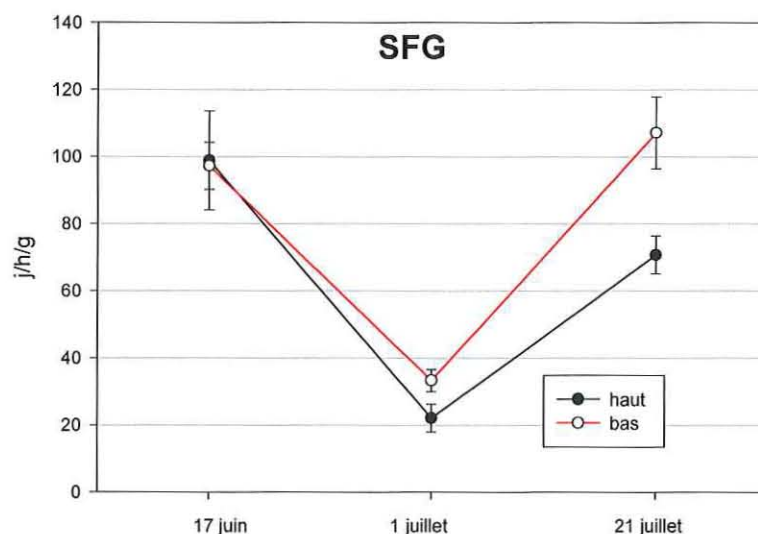
Figure 2 : Nombre total d'individus par classe de taille et par origine.

## Tâche 2.2.6 - FORMER04 (Comparaison dynamique de mortalité *intra* site baie de Quiberon).

Le LCPL a participé, en 2004, à l'étude *intra* site de la dynamique des mortalités en baie de Quiberon. L'objectif de cette étude était de poursuivre les actions initiées en 2003 par le LCB, afin de prendre en compte, dans l'étude des mortalités estivales, la spécificité des pratiques culturales en eau profonde pratiquée en Bretagne sud et de comparer les dynamiques de mortalité survenant dans l'environnement particulier de l'eau profonde (semis au sol, exondation, nourriture, température) et dans celui de l'estran suivi en 2003 avec BERAY, et en 2004 avec DYNAMAURAY.

La participation du LCPL dans cette étude a consisté à l'étude écophysiological 5SFG) d'huîtres juvéniles de captage naturel prélevées à deux hauteurs du sédiment (haut et bas), et à trois périodes de l'étude (17/06, 01/07 et 21/07). Le suivi écophysiological a été réalisé dans des conditions environnementales identiques à chaque date. Le milieu expérimental était constitué d'un mélange d'eau salée souterraine traitée, maintenue à 19 °C et à 1.5 mg/l de matière organique particulaire par ajout de *Skeletonema costatum*.

Les résultats ont montré que les différences entre haut et bas ne se manifestaient qu'à partir du 1 juillet avec des SFG plus importants chez les individus élevés le plus proche du sédiment (bas). Ces résultats qui vont à l'encontre des performances de croissance obtenues sur le site pourraient s'expliquer par l'opportunisme de ces individus à rattraper leur déficit énergétique en présence d'un milieu favorable. De plus, une chute très marquée des valeurs au 1/07 a montré un stress des individus à cette même époque.



Suivi du SFG (Scope For Growth) des huîtres juvéniles élevées à différentes hauteurs du sédiment.

## Tâche 2.2.3 - DYNAMOR (Suite des analyses et traitement des données).

Dynamor est une étude qui a été réalisée en 2003 en collaboration avec différents laboratoires, et notamment ceux de l'Ifremer de Ronces les Bains (LCPC, LGP et DEL/PC/Nantes).

L'objectif de cette étude est de comprendre les causes et mécanismes de la mortalité estivale de *Crassostrea gigas* en fonction, d'une part, de l'origine des lots ("R" et "S") et de la situation de l'élevage en fonction de la proximité du sédiment (15cm ou 70cm).

Parmi les différentes approches étudiées par de nombreux laboratoires, le LCPL s'est attaché tout particulièrement à comprendre quelles pouvaient être les stratégies distinctes de l'utilisation de l'énergie durant la période de stress chronique.

Pour se faire, les paramètres biométriques tels que le poids sec, le poids de gonade et le poids de soma des animaux ont été suivi de mars à juillet 2003. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 1.

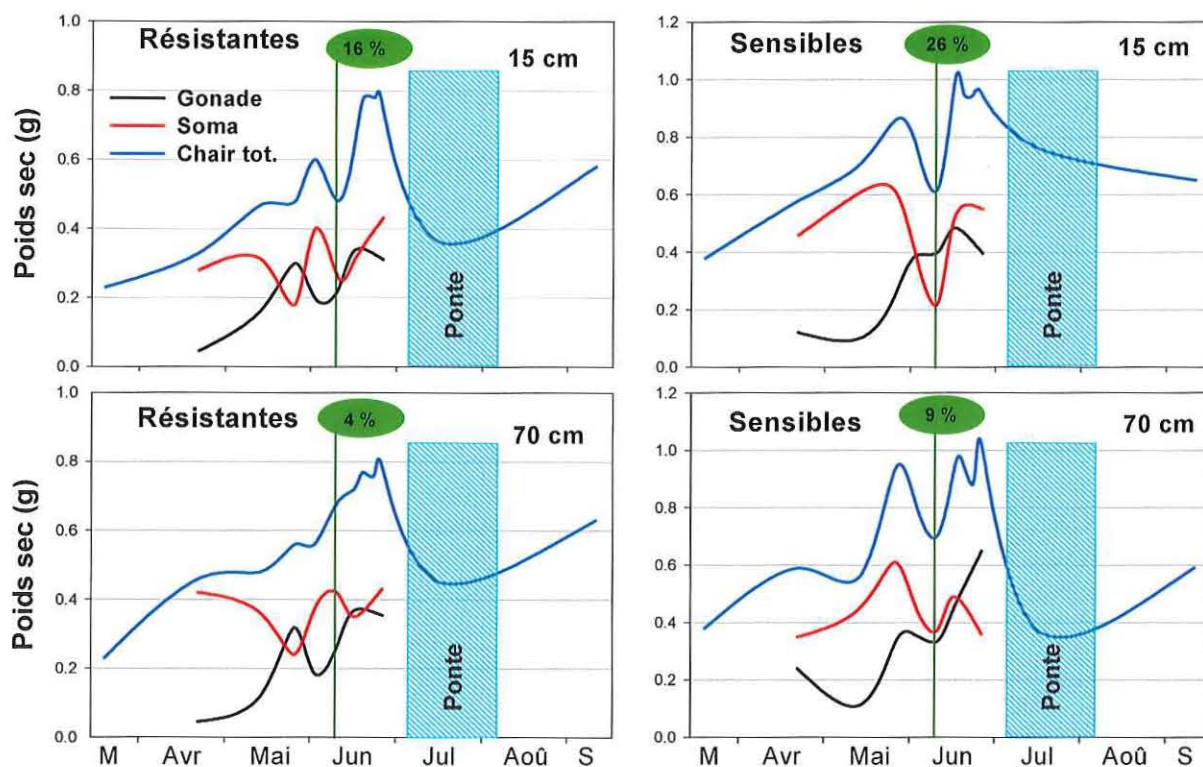


Figure 1 : Résultat de l'évolution des différents paramètres en fonction du site et de l'origine "R" ou "S" des lots d'huîtres.

Ces résultats montrent les points suivants :

- Les mortalités surviennent au moment de la chute du poids sec, sauf pour les résistantes (70 cm) dont la perte d'effectif est seulement de 4 %,
- La perte de poids sec semble proportionnelle à la mortalité,
- Quel que soit le niveau d'élevage, les résistantes semblent cesser le processus de gamétogenèse au profit du soma, en mai (conditions environnementales stressantes),
- Les huîtres sensibles, au contraire, poursuivent leur gamétogenèse durant cette même période et seul le soma chute pendant la crise de mortalité.

Les hypothèses qui peuvent être émises suite à ces résultats sont les suivantes :

Chez les résistantes

- reconnaissance d'événement stressant,
- changement de stratégie de l'allocation d'énergie.

Stratégie : Assurer la survie

Chez les sensibles

- absence visible de réaction à un événement stressant,
- maintien de l'allocation d'énergie à la gonade.

Stratégie : Maintenir l'effort de reproduction.

## Bibliographie

Haure et al., (2003). Reproduction on the physiological functions. Effect on environment and group of oysters. Colloque Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

Soletchnik, P., J. Haure, N. Malet, T. Burgeot et F. Leroux (2003a). étude pluridisciplinaire de la dynamique des mortalités estivales de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes Oléron. (DYNAMOR-2003). Séminaire Morest, 26-29 novembre 2003. La Rochelle.

Haure, J., Soletchnik, P., Burgeot, T., (2004). Stratégie de l'utilisation de l'énergie durant la période de stress chronique. Séminaire Morest, 24-25-26 novembre 2004. Caen.

# Ifremer - DRV/RA Laboratoire Conchylicole de Poitou Charentes (L.C.P.C) - La Tremblade

---

Responsable pour MOREST : SOLETCHNIK Patrick

Adresse : IFREMER / LERPC Ronces les Bains. 17390 - LA TREMBLADE

## Introduction

### Objectifs de 2004

- Poursuite de l'étude de la problématique de la mortalité plat table dans le sud du Bassin de Marennes Oléron par une étude spécifique du stress aigu (suite étude Dynamo & DynamoR) (WP 2.2.8).
- Poursuite de l'analyse en laboratoire des prélèvements (matériel biologique) et des données de dynamoR 2003 (WP 2.2.3).
- Analyses de données sur la caractérisation des mortalités estivales (WP 2.2.1) en relation avec l'environnement.

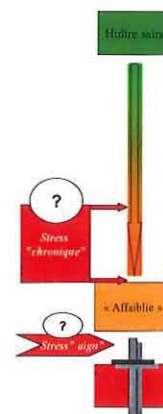
A travers ces tâches, les objectifs sont clairement : (1) de préciser le modèle de mortalité plat table de *Crassostrea gigas* dans le Bassin de Marennes Oléron en précisant les causes environnementales responsables des mortalités estivales, (2) d'apporter une réponse régionale à cette problématique, (3) d'étendre l'étude de la relation mortalité environnement à l'ensemble des zones conchylicoles françaises grâce aux bases de données existantes dans une approche globale de la problématique.

## WP. 2. - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

### Tâche 2.2. - Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités

*Sous-Tâche 2.2.8 - Etude du modèle de mortalité plat-table dans le sud du Bassin de Marennes Oléron (Soletchnik, Malestroit, Blouin, Bouchet, Seugnet et Co.)*

Dans le cadre de l'étude du modèle de mortalité plat-table dans le sud du Bassin de Marennes Oléron (Soletchnik et al., 1999, Soletchnik et al., 2005), l'hypothèse d'un stress aigu, "ultime" déclencheur des épisodes de mortalité du mois de juin, apparait comme un résultat de l'étude pluridisciplinaire menée en 2003 (Dynamor - figure ci contre).



L'objectif en 2004, est de chercher à préciser la nature de ce stress grâce à l'analyse physico-chimique du sédiment (Eh, pH, Sulfure et Azote ammoniacal), la charge en matière organique et chlorophylle "a" en surface du sédiment entre Avril et Juillet. Les herbicides sont par ailleurs mesurés au niveau de la colonne d'eau dans le sud est du bassin (Seudre) durant la même période (action Burgeot, GIRPA).

Un "faible" pic de mortalité survient durant la 1<sup>ère</sup> semaine de juin quand la température moyenne de l'eau de mer est encore inférieure à 18°C. Quoique faible (Figure 1), ce pic de mortalité est concomitant avec un pic d'azote ammoniacal important et une chute de l'indice chlorophylle a de 300 à 80 mg m<sup>-2</sup> en début juin (Figure 2). Un pic de nitrite sera identifié un peu plus tard au cours du mois de juin.

L'hypothèse actuellement formulée est la suivante: Au terme d'une élévation saisonnière et progressive de la température interne du sédiment, les processus de minéralisation liés à la décomposition de la matière organique, atteindraient leur maximum vers les 19°C (action bactérienne), libérant alors soudainement un fort flux d'ammonium dans la colonne d'eau. Ces composés en excès provoqueraient une mortalité brutale, du phytobenthos (observation récurrente depuis plusieurs années sur ce site), et probablement également d'une partie des cheptels d'huîtres, déjà affaiblis par un premier stress antérieur (période mi-mai à mi-juin). Cette épisode observé depuis des années en marée de "mortes eaux", toujours associé à un changement dans la stabilité du sédiment (observation terrain), s'apparenterait ainsi à une "mini-maladie" (P.G. Sauriau).

Cette "disparition" brutale du phytobenthos (estimée par la chlorophylle "a") sur la vasière de ce site atelier est également simultanée avec un pic de glyphosate identifié dans la colonne d'eau durant la deuxième semaine du mois de Juin (Burgeot et al. - com. Pers.); glyphosate dont les produits de dégradation se retrouvent également dans l'eau interstitielle des sédiments du sud du Bassin de Marennes Oléron. Toutefois, les faibles concentrations observées (~1 µg/L en sortie de Seudre) ont probablement peu d'effet direct sur le phytoplancton ou le phytobenthos du site de Perquis (cf travaux de G. Arzul).

Si ces éléments ne peuvent être négligés dans l'approche pluridisciplinaire engagée sur ce site, ces pesticides mesurés ne doivent pas directement contribuer au stress aigu provoquant l'épisode de mortalité du mois de juin.

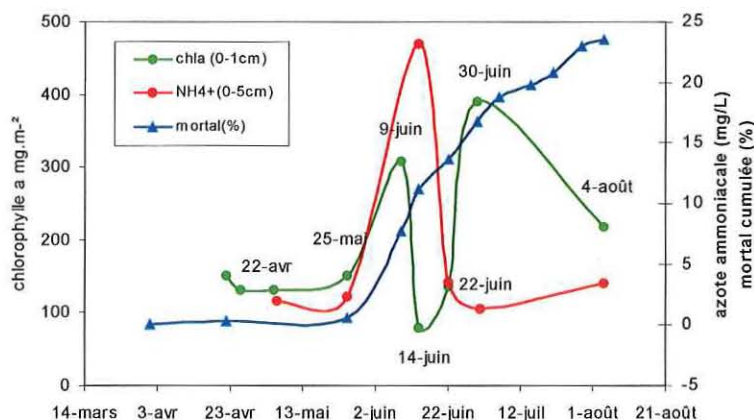


Figure 2. Analyse descriptive de l'évolution de la Chlorophylle a, azote ammoniacale et mortalité.

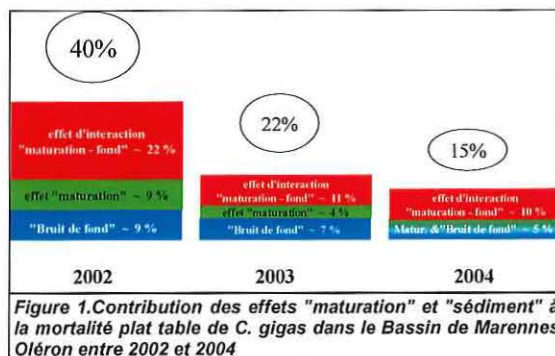


Figure 1. Contribution des effets "maturation" et "sédiment" à la mortalité plat table de C. gigas dans le Bassin de Marennes Oléron entre 2002 et 2004

## Sous-Tâches 2.2.1. Actions d'étude des écosystèmes conchylicoles et relation avec les mortalités.

### 1 - Etudes hydrologiques du Bassin de Marennes Oléron (Soletchnik, Struski)

Cette étude fait suite à celle menée en 1998 à partir de l'analyse de la base hydrologique du Bassin de Marennes Oléron (5 stations échantillonnées depuis 1977) (Soletchnik et al., 1998), prolongeant ainsi l'analyse de quelques années. La comparaison de 2 périodes successives de 12 ans laisse apparaître quelques changements importants (Figure 3). La pluviométrie (données Météo France) présente une saisonnalité décalée d'un mois durant la deuxième période, avec globalement plus de précipitation en été et automne de cette deuxième période. La salinité plus élevée de près de 2 unités en fin d'hiver et printemps, laissant imaginer des apports plus réduits en eau douce des panaches des grands fleuves durant ces saisons.

L'amplitude des cycles saisonniers de la matière particulaire totale en suspension (TPM) et des phéophytines dans la colonne d'eau se réduit considérablement ces dernières années (Figure 3).

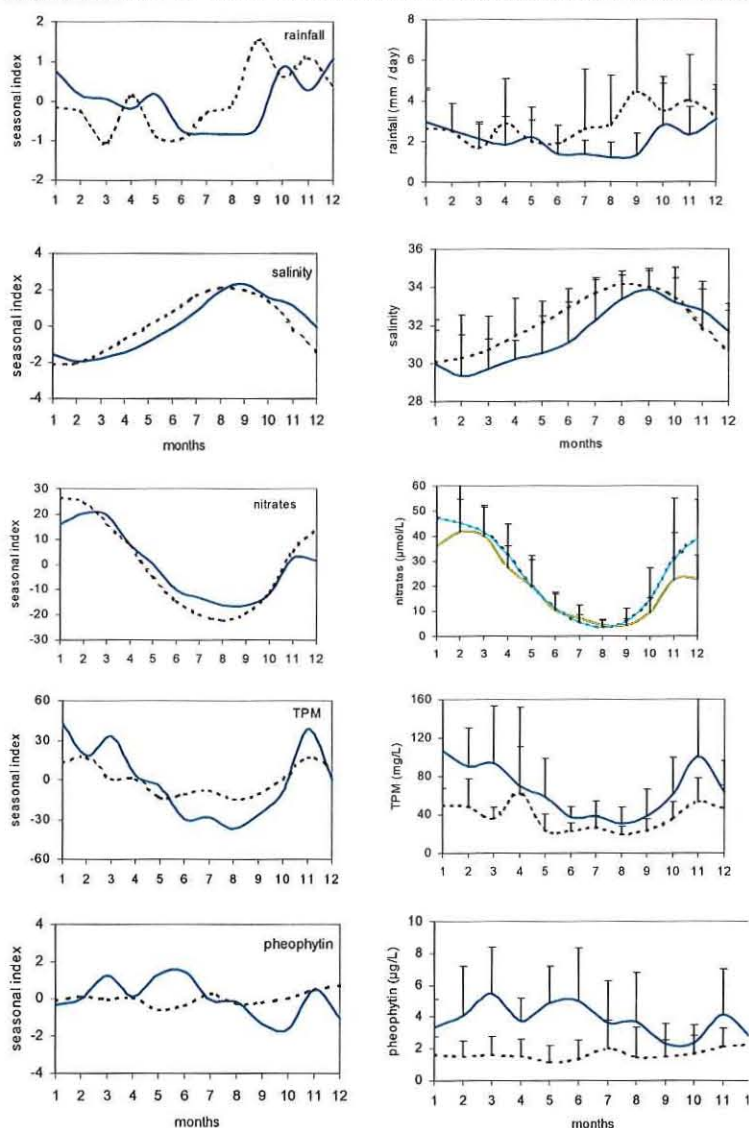


Figure 3 : Etude hydrologique du Bassin de Marennes Oléron comparant "saisonnalité" (gauche) et "valeurs" (droite) de pluie, salinité, nitrates, matière particulaire totale et phéophytine de deux périodes successives : 1977-1989 (trait plein) et 1990-2002 (trait pointillé).

Dans le même temps, la concentration de ces deux descripteurs diminue considérablement, confortant l'hypothèse d'une réduction significative des apports par les panaches des grands fleuves, riches en matière particulaire et phéopigments issus de la décomposition de la chlorophylle "a".

## **2 - Etude du problème sédimentaire en relation avec la mortalité plat table du Bassin de Marennes Oléron . Reprise d'une étude de 1997 (Soletchnik, Lambert, Costil, 2005 - sous presse).**

L'objectif est d'étudier les mortalités estivales en relation avec les pratiques culturales traditionnelles du Bassin de Marennes Oléron. Les quatre conditions d'élevage croisent (1) le type d'élevage - sur le sédiment ou en poches et tables ostréicoles - et (2) le degré d'immersion des sites : 65-80% pour la condition "profonde" et 45-65% pour les conditions "hautes".

Les mortalités de 25% surviennent en Juin-juillet pour les huîtres en élevage sur le sédiment. Elles atteignent juste 10% pour les huîtres sur table. Les performances de croissance sont meilleures pour les huîtres sur table et l'effort de reproduction, deux fois supérieur pour les huîtres sur table, ne peut donc être directement corrélé aux phénomènes de mortalités estivales dans le cas cette étude.

La faible teneur en glycogène de la chair des huîtres, pour les différentes conditions, confirme bien le problème de limitation trophique récurrent dans le Bassin de Marennes Oléron, mais ne permet pas de caractériser les conditions d'élevage. Par contre, croissance, effort de reproduction et survie, significativement réduits au niveau du sol, laissent supposer un effet direct du sédiment sur les performances biologiques. Les mesures d'oxydo réduction, de matière organique et d'azote ammoniacale ne suffisent pas, seules, à expliquer les épisodes de mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

## **3 - Groupe d'étude sur la mortalité comparée de *Crassostrea gigas* au niveau des écosystèmes conchylicoles français. Analyses et publications en cours (Soletchnik, Ropert, Mazurié, Fleury, Bédier et al.,)(Fleury et al., 2001)**

L'objectif est de préciser les relations entre mortalités et environnement, en déclinant cette relation à travers les "risques environnementaux". Température, bassins versant et/ou l'eau douce, ressource trophique, le compartiment sédimentaire, sont autant de facteurs impliqués directement ou indirectement dans les processus de mortalité.

L'étude présente d'abord la caractérisation de la mortalité sur une 30aine de sites couvrant les principales zones ostréicoles du littoral français, entre 1993 et 2003 pour les huîtres de 2 ans, 1995 à 2003 pour les 1 an (Réseau REMORA).

La variabilité de la mortalité de chaque classe d'âge (1 an et 2 ans) est présentée selon les années et selon les sites ostréicoles. La mortalité des huîtres de 1 an est plutôt "estivale" et très marquée à Marennes et sur quelques sites bretons. La mortalité des 2 ans est essentiellement printanière, forte en Baie des Veys et également sur quelques sites bretons.

Une deuxième partie est ensuite consacrée à l'étude des relations existantes entre les mortalités et l'environnement hydrologique (bases RePHY : température, salinité, turbidité, chlorophylle "a" et phéophytine) et climatique (Bases Météo France : température de l'air, pluviométrie et insolation) sur 11 secteurs conchylicoles du littoral Français (Figure 4).



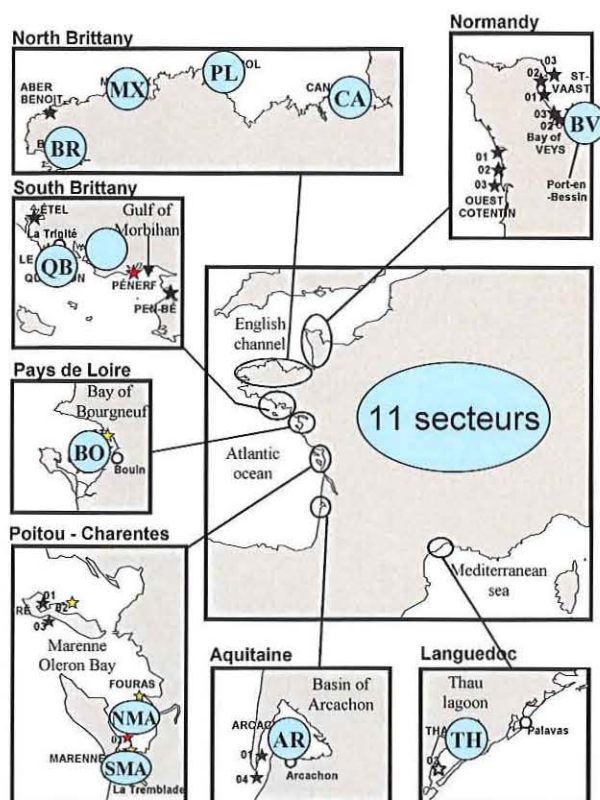


Figure 4. onze sites ostréicoles regroupant tout à la fois des données de mortalité, hydrologie et météorologie (Météo France).

Sur les onze environnements étudiés, deux se démarquent : (1) Thau par une "sur salure" associée à l'évaporation estivale de la lagune, et (2) Brest par de fortes dessalures.

La mortalité des huîtres de 1 an est plus corrélée à de fortes concentrations en chlorophylle "a" et à des températures élevées; celle des 2 ans est plus liée aux variables pluie et dessalure (Figure 5).

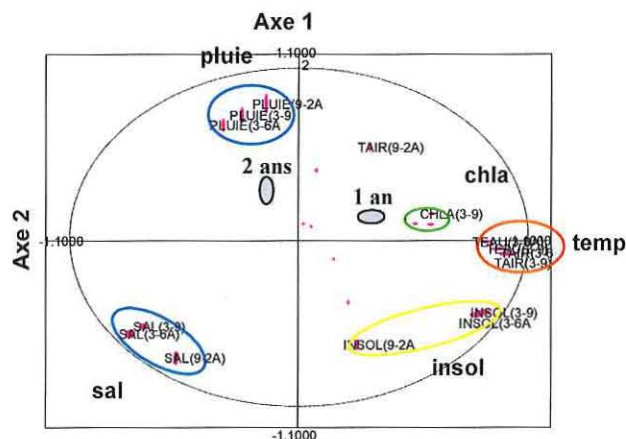


Figure 5. Analyse en Composantes principales des environnements (secteur x ans) avec projection de la variable mortalité 1 an et 2 ans.

La suite de l'analyse tente de préciser ce qui oppose : (1) des années de faible niveau de mortalité comme 1993, 2002, 2003 à des années de plus forte mortalité : 1994, 1995, 1999, 2000 et (2) des sites de fortes mortalités de 1an : Quiberon, de 2ans Baie de Veys ou de 1 et 2 ans : Morlaix et le Bassin de Marennes Oléron, aux autres sites sans forte mortalité (Cancale, Paimpol, Baie de Bourgneuf et bassin d'Arcachon).

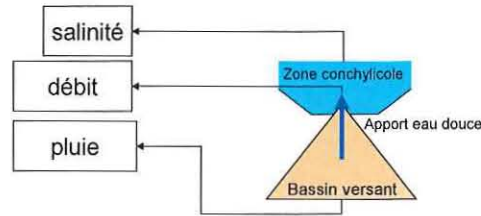
Les années de plus fortes mortalités des huîtres de 2 ans sont des années caractérisées par des fortes pluies (1994), de fortes températures (1995) ou une forte influence de ces deux paramètres (1999, 2000).

En conclusion de cette analyse et dans le cadre des descripteurs disponibles et analysés, les facteurs environnementaux dont l'influence se manifeste (à un certain niveau) sur les mortalités des huîtres de 1 et 2 ans sont (1) la pluie (surtout pour les huîtres de deux ans) et (2) une "interaction" des facteurs : chlorophylle "a" - température (surtout pour huîtres de 1 an).

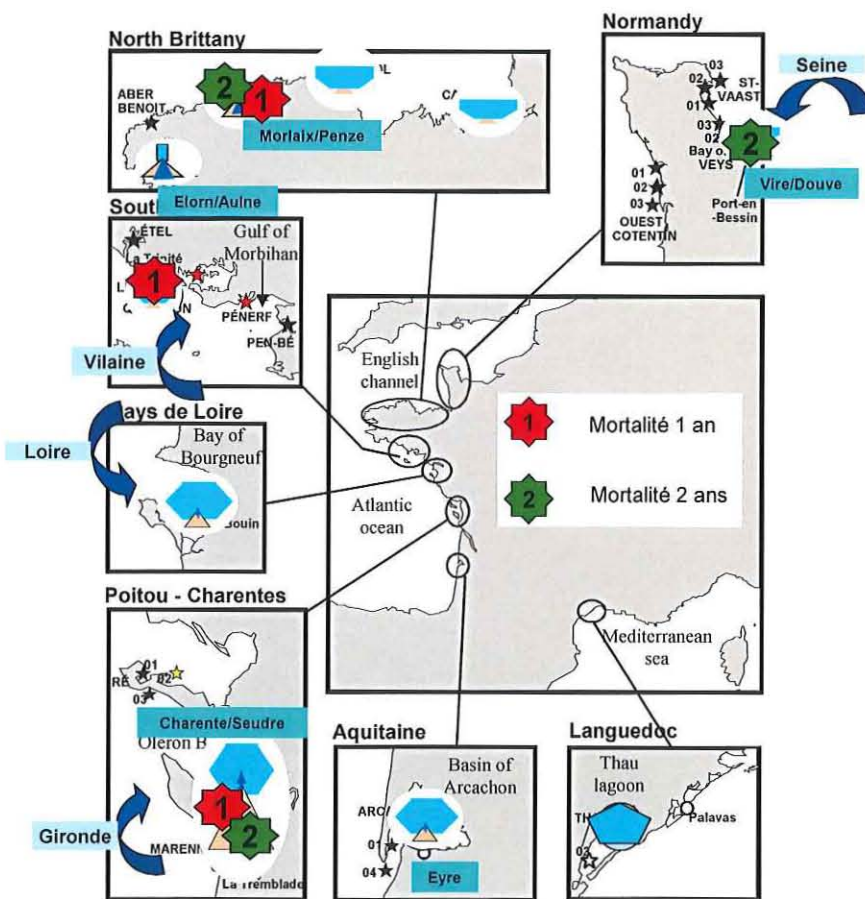
L'abondance de phéopigments agirait plutôt comme un facteur (ou un indicateur) corrélé positivement à la mortalité en cas d'excès pour les deux ans, et en cas de déficit pour les 1 ans ! Ces résultats demandent à être précisés et explicités.

Ces résultats "globaux" reflètent une tendance observée dans notre champ d'expérience défini par les zones ostréicoles et années étudiées. **Ils ne sont en aucun cas généralisables à tous les sites ostréicoles (et non applicables à chaque site ostréicole en particulier). Des études spécifiques doivent être menées site par site pour rechercher ou préciser dans chaque secteur ostréicole, les facteurs d'influence sur les mortalités.**

Le "risque eau douce" est fortement lié au "bassin versant" (figure ci-dessous) à travers les risques de rejets anthropiques de diverses natures qui peuvent affecter les écosystèmes estuarien.



Si la mortalité touche des sites à "grand" bassins versants (eg, Marennes, Morlaix, Baie des Veys), elle peut aussi affecter des sites sans bassin versant (eg, Quiberon) (Figure 6). Les apports (eau douce, matières dissoutes et particulaires) pourraient aussi provenir des panaches des grands fleuves. Là encore avec la relation "mortalité-apports" n'est pas encore étudiée (Figure 6). Enfin, des sites beaucoup plus "fermés" (eg, Bourgneuf, Arcachon et Thau) ne présentent pas plus de mortalités que d'autres extrêmement "ouverts" sur la façade manche (Paimpol ou Cancale).



Cette étude typologique "grossière" montre que l'ampleur des apports au niveau des différents sites ostréicoles, par les bassins versants ou par les panaches des grands fleuves est encore à préciser.

De plus, les cycles saisonniers de salinité sur l'ensemble de ces sites, font apparaître une opposition entre une façade Manche au cycle de dessalure très peu marqué et une façade Atlantique au cycle beaucoup plus prononcé, alors que les bassins sensibles aux mortalités estivales de *Crassostrea gigas* sont distribués sur les deux façades.

Figure 6 – Présentation des 11 sites ostréicoles. Typologie des sites. Influence des panaches des grands fleuves et sensibilité aux épisodes de mortalité des huîtres de 1 et 2 ans.

## Bibliographie

Fleury, P.G., Goyard, E., Mazurie, J., Claude, S., Bouget, J., Langlade, A., Le Coguiç, Y., 2001. The assessing of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing performances by the IFREMER / REMORA network: method and first results (1993-98) in Brittany (France). *Hydrobiologia* 465, 1-3.

Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Gouletquer, P., 1998. Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386, 131-146.

Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12, 131-143.

Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K., 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shell. Res.* 24, sous presse.

# Ifremer - DRV/RA Laboratoire de Génétique et Pathologie - équipe Génétique La Tremblade

---

Responsable : Pierre Boudry

Adresse : Mus du Loup – Station Ifremer – 17390 La Tremblade

## Introduction

L'un des objectifs principaux des travaux en génétiques des mollusques au sein du LGP est d'identifier les possibilités d'amélioration des productions. Deux voies d'amélioration sont étudiées : la polyploïdisation et l'amélioration par la sélection. Les résultats obtenus ces dernières années, dans les travaux réalisés avant le lancement de MOREST puis ceux obtenus dans le cadre du Défi MOREST, ont montré que ces deux voies peuvent apporter des gains significatifs en terme de survie des huîtres au cours de la période estivale (voir les rapports précédents). La valorisation de ces résultats (rédaction d'articles et transfert des résultats vers le secteur productif) est en cours.

Suite à ces travaux, les efforts se sont portés en 2004 dans les directions suivantes :

- La mise en place d'un programme collectif de sélection au niveau national.
- Le développement de tétraploïdes « R »
- Production de « pools » R et S pour la manip « CANARD »
- La recherche de marqueurs génétiques liés à la résistance aux mortalités estivales (approche QTL).

Il est important de noter ici que l'écloserie de La Tremblade a subi au cours du printemps et de l'été 2004 des problèmes de mortalité aux stades larvaires et post-larvaires, associés à la détection du virus OsHV-1 (voir résumé des actions 2004 de l'équipe « patho » du LGP), qui ont sérieusement remis en cause les expérimentations et production de matériel biologique prévus initialement.

## Résultats

### WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

#### Tâche 2.1 - Effet génétique

##### *2.1. Vers un programme national et collectif de sélection ?*

Afin de permettre l'émergence d'une « sortie de crise » génétique, une série de réunions de travail ont eu lieu en 2004. Ces réunions ont été co-animées par le SYSAAF et notre équipe afin de définir, avec l'ensemble des partenaires potentiels (CNC, écloseries, organismes régionaux de développement aquacole, Régions, un projet de mise en place d'un programme national et collectif de sélection de *Crassostrea gigas*. Ce travail a abouti à la présentation lors des journées MOREST à Caen d'un document intitulé «Sortie de crise génétique – projet collectif de sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas*». Les discussions et recherches de financement se poursuivent.

## 2.2. Développement de tétraploïdes « R »

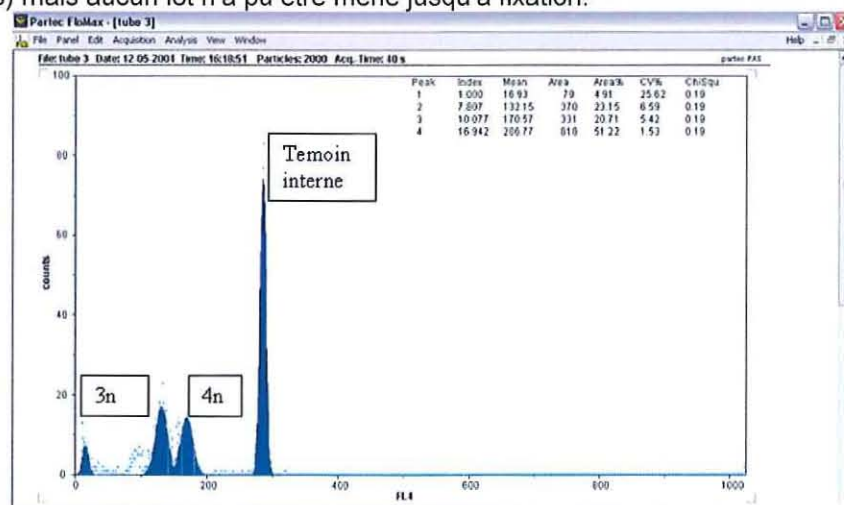
Les résultats MOREST acquis au cours des années précédentes ayant permis de montrer les points suivants :

- 1 - Il est possible de sélectionner pour améliorer la résistance aux mortalités estivales chez le naissain (voir résultats MOREST 2002, confirmés en 2003),
- 2 - Le naissain triploïde « naturel » (c'est-à-dire issu de croisements entre diploïdes et tétraploïdes) présente, en général, des taux de survie supérieurs à celui du naissain diploïde (voir résultats MOREST 2001, 2002, 2003),
- 3 - Le naissain issu de croisements entre femelles diploïdes "R" ou "S" et des tétraploïdes (non sélectionnés pour ce caractère) montre la transmission du caractère chez les triploïdes (résultats MOREST 2003),

Le développement de tétraploïdes "R" permettrait de produire des triploïdes issus de diploïdes et de tétraploïdes sélectionnés. Plusieurs approches sont possibles afin de produire des tétraploïdes "RRRR" :

1. Méthode basée sur la rétention du premier globule polaire sur des ovocytes de femelles triploïdes (Guo et Allen, 2004). Disposant de triploïdes "RTT" (un génome résistant "Résistant", deux génomes "Témoin") produits en 2003, des tétraploïdes "RRTT" peuvent être obtenus en croisant des femelles "RTT" par des mâles diploïdes "RR". Pour produire des tétraploïdes "RRRR" par cette méthode, il faut produire des triploïdes par induction chimique (6-DMAP ou CB) à partir de géniteurs diploïdes "RR", puis les utiliser comme décrit précédemment (2 générations soit 4 ans car la maturation de triploïdes d'un an est très limitée).
2. Méthode basée sur la rétention d'un globule polaire sur des ovocytes de femelles diploïdes "RR" fécondés par les mâles tétraploïdes "TTTT" (McCombie et al., sous presse). Cette méthode permet d'obtenir des « hybrides » tétraploïdes "RRTT". La méthode doit en suite être répétée plusieurs générations afin d'obtenir des tétraploïdes "RRRR". Le développement de marqueurs génétiques liés à la résistance (approche QTL ou gènes candidats) prend ici tout son intérêt.
3. Méthode d'induction directe de tétraploïdes "RRRR" par traitement chimique à partir de géniteurs diploïdes "RR". Cette méthode est la plus rapide puisqu'elle permet d'obtenir le matériel biologique souhaité en une génération. C'est également, jusqu'à présent, la plus difficile à mettre en œuvre.

Sept tentatives ont été réalisées en 2004 en utilisant cette dernière méthode (soit 12 lots traités) à partir de géniteurs de différentes familles "R" de la G3SD. Des larves tétraploïdes ont été obtenues (voir figure ci-dessous) mais aucun lot n'a pu être mené jusqu'à fixation.



### 2.3 - Production de « pools » "R" et "S" pour la manip « CANARD »

Dans le cadre de la manip « CANARD » (coordination P.G. Fleury, LERMPL), la production de pools "R" et "S" a été réalisée selon le plan de croisement ci-dessous :

<b>Lignée haute de la G4SD (PoolR)</b>			<b>Mâle G0</b>	<b>9</b>		<b>15</b>	
			Famille G1	F9-35	F9-36	F15-57	F15-58
			G2C1	J2	O2	R2	W2
<b>Mâle G0</b>	Famille G1	G2C1	<b>G3C1</b>	<b>JJ2</b>	<b>OO2</b>	<b>RR2</b>	<b>WW2</b>
<b>2</b>	F2-5	<b>A2</b>	<b>AA2</b>	<b>AAJJ2</b>	<b>AAOO2</b>	<b>AARR2</b>	<b>AAWW2</b>
	F2-8	<b>G2</b>	<b>GG2</b>				
<b>9</b>	F9-35	<b>J2</b>	<b>JJ2</b>			<b>JJRR2</b>	<b>JJWW2</b>
	F9-36	<b>O2</b>	<b>OO2</b>				

<b>Lignée basse de la G4SD (PoolS)</b>			<b>Mâle G0</b>	<b>7</b>		<b>14</b>	
			Famille G1	F7-25	F7-26	F14-54	F14-54/F14-55
			G2C1	E2	L2	M2	P2
<b>Mâle G0</b>	Famille G1	G2C1	<b>G3C1</b>	<b>EE2</b>	<b>LL2</b>	<b>MM2</b>	<b>PP2</b>
<b>4</b>	F4-16/F4-15	<b>B2</b>	<b>BB2</b>	<b>BBEE2</b>	<b>BBLL2</b>	<b>BBMM2</b>	<b>BBPP2</b>
	F4-15/F4-16	<b>Y2</b>	<b>YY2</b>				
<b>7</b>	F7-25	<b>E2</b>	<b>EE2</b>			<b>EEMM2</b>	<b>EPPP2</b>
	F7-26	<b>L2</b>	<b>LL2</b>				

Les tentatives de reproduction réalisées à l'écloserie de La Tremblade n'ayant pas donné les résultats escomptés (mortalités en phase larvaires ou post-larvaires) les croisements ont également été réalisés à l'écloserie d'Argenton. Chaque croisement a été réalisé à partir d'une moyenne de 25 géniteurs par lot de la GDC1 afin de représenter au mieux la constitution génétique de chaque pool.

Début 2005, les effectifs à la nurserie de Bouin étaient les suivants :

Pools "R" d'origine La Tremblade :	11000 individus
Pool "S" d'origine La Tremblade :	9200 individus
Pools "R" d'origine Argenton :	8000 individus
Pool "S" d'origine Argenton :	7800 individus

## 2.4 - Recherche de marqueurs génétiques liés à la résistance aux mortalités estivales : approche QTL

Les travaux précédents menés au laboratoire et au sein de MOREST ont permis de constituer des familles présentant des performances contrastées en terme de survie estivale. Ces familles représentent un matériel particulièrement adapté à la recherche de marqueurs génétiques associés à ce caractère. Cette recherche apparaît particulièrement intéressante pour les raisons suivantes : La forte héritabilité du caractère étudié laisse espérer un nombre relativement faible de gènes impliqués et donc l'identification de marqueurs liés à ces gènes.

Des familles consanguines présentant des performances contrastées étant disponibles, la production de F2 ségrégeantes (indispensable à la recherche de marqueurs liés à ce caractère) est aujourd'hui possible.

Une carte de liaison, basée sur une centaine de marqueurs microsatellites, et une autre avec une centaine de marqueurs AFLP ont été récemment publiées.

Le développement récent de nombreux ESTs (Expressed Sequenced Tags) permet le développement d'un nombre important de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) qui permettront de « saturer » cette carte grâce à l'apport de nouveaux marqueurs. Le développement d'AFLP est également envisagé.

Dans cet objectif, des croisements biparentaux (F1) entre individus issus de familles caractérisées dans le cadre du défi « Morest » ont été réalisés en 2004 suivant le plan de croisement suivant :

Mix (RS) = Lignée basse* Lignée haute et Lignée haute* Lignée basse			Mâle G0	4 et 14		4 et 14	
			Famille G1	F4-15*F4-16 / (F14-54) <sup>2</sup>	(F4-16) <sup>2</sup> / (F14-54) <sup>2</sup>	F4-15*F4-16 / F14-55*F14-54	(F4-16) <sup>2</sup> / F14-55*F14-54
			G2C1	B2*M2	D2*M2	B2*P2	D2*P2
Mâle G0	Famille G1	G2C1	G3SD	BM2 (K)	DM2 (Q)	BP2 (R)	DP2 (AC)
2 et 9	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	A2*O2	AO2 (Y)	Y1K (R)	Y1Q (Z)	R1Y (N)	AC1Y (C)
	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	G2*O2	GO2 (Z)	Z1K (B)	Z1Q (J)	R1Z (E)	AC1Z (H)
2 et 9	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-35) <sup>2</sup>	G2*J2	GJ2 (H)	K1H (F)	Q1H (V)	H1R (AC)	H1AC (O)
	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9/35) <sup>2</sup>	A2*J2	AJ2 (V)	K1V (L)	Q1V (T)	V1R (Q)	V1AC (X)
Lignée haute (R)			Mâle G0	2 et 9		2 et 9	
			Famille G1	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-35) <sup>2</sup>	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9/35) <sup>2</sup>
			G2C1	A2*O2	G2*O2	G2*J2	A2*J2
Mâle G0	Famille G1	G2C1	G3SD	AO2 (Y)	GO2 (Z)	GJ2 (H)	AJ2 (V)
2 et 9	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	A2*O2	AO2 (Y)	Y2Z (AB)			
	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-36) <sup>2</sup>	G2*O2	GO2 (Z)	H2Y (S)	H2Z (D)		
2 et 9	(F2-8) <sup>2</sup> / (F9-35) <sup>2</sup>	G2*J2	GJ2 (H)	V2Y (A)	Z2V (U)	V2H (I)	
	(F2-5) <sup>2</sup> / (F9/35) <sup>2</sup>	A2*J2	AJ2 (V)				
Lignée basse (S)			Mâle G0	4 et 14		4 et 14	
			Famille G1	F4-15*F4-16 / (F14-54) <sup>2</sup>	(F4-16) <sup>2</sup> / (F14-54) <sup>2</sup>	F4-15*F4-16 / F14-55*F14-54	(F4-16) <sup>2</sup> / F14-55*F14-54
			G2C1	B2*M2	D2*M2	B2*P2	D2*P2
Mâle G0	Famille G1	G2C1	G3SD	BM2 (K)	DM2 (Q)	BP2 (R)	DP2 (AC)
4 et 14	F4-15*F4-16 / (F14-54) <sup>2</sup>	B2*M2	BM2 (K)	K2Q (G)			
	(F4-16) <sup>2</sup> / (F14-54) <sup>2</sup>	D2*M2	DM2 (Q)	R2K (P)	R2Q (K)		
4 et 14	F4-15*F4-16 / F14-55*F14-54	B2*P2	BP2 (R)	AC2K (W)	Q2AC (M)	AC2R (Y)	
	(F4-16) <sup>2</sup> / F14-55*F14-54	D2*P2	DP2 (AC)				

Suite aux difficultés rencontrées à l'écloserie de La Tremblade, ces familles ont été produites à l'écloserie d'Argenton. Vingt familles sont actuellement en élevage à la nurserie de Bouin.

## Ifremer - DRV/RA Laboratoire de Génétique et Pathologie - Equipe Pathologie - La Tremblade

---

Responsable : T. Renault (Volet Pathologie)

Adresse : Station de La Tremblade - Ronce Les Bains  
BP133 - LGP - 17390 La Tremblade

Responsable : T. Renault

### Introduction

L'un des objectifs principaux des travaux en pathologie des mollusques est d'identifier et d'étudier des agents infectieux capables d'induire des maladies et des mortalités chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ces travaux semblent d'autant plus indispensables qu'il n'existait pas, jusqu'à ces dernières années, de pathologies identifiées chez l'huître creuse en Europe. Aujourd'hui, deux types d'agent ont été mis en évidence : des bactéries du genre *Vibrio* et des virus apparentés à la famille des *Herpesviridae*. En effet, les études menées dans le but d'identifier les causes des épisodes de mortalité de *Crassostrea gigas* ont révélé l'existence d'un agent viral de type herpès sur des larves et naissains. Par ailleurs, de nombreuses études ont établi le caractère pathogène de certaines souches de bactéries pour diverses espèces de bivalves dont l'huître creuse.

Si aucun pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités estivales au cours des dernières années chez les huîtres creuses, des bactéries du genre *Vibrio* ainsi qu'un virus de type herpès (Ostreid Herpesvirus type 1 ou OsHV-1) sont à l'origine de certaines mortalités. Ces observations laissent suspecter que les mortalités estivales ne correspondent pas à une épizootie faisant intervenir un agent infectieux unique. Cependant, différents agents pathogènes apparaissent associés à ce phénomène et doivent donc faire l'objet d'études plus approfondies.

### Résultats

#### ***Développement et validation d'outils de diagnostic pour rechercher le virus OsHV-1 (anticorps poly et monoclonaux anti OsHV-1)***

Des anticorps « spécifiques » du virus avaient été produits dans le cadre du programme européen VINO en 2002. Des travaux ont été réalisés afin de préciser leur utilisation à des fins diagnostiques. Afin de qualifier ces anticorps déjà disponibles au laboratoire (produits par Eurogentec dans le cadre de VINO) et ceux produits en 2004 (Clean-cells et Covalab), deux séries de purification du virus OsHV-1 ont été réalisées pour obtenir un antigène relativement pur (extraction à partir de larves ou naissain positifs en PCR : détection d'ADN viral). Cet antigène a servi de base au coating des plaques pour le test des différents anticorps en ELISA. Les 22 clones disponibles ont été testés plusieurs fois avec différents protocoles. Un seul a été sélectionné, remis en culture et a servi à la production d'une ascite sur souris. Les sérums polyclonaux lapin, produits dans le cadre du programme européen VINO, ont été également testés dans les mêmes conditions.



- 1- Les sérums polyclonaux lapin ne donnent pas de signal spécifique anti OsHV-1 en ELISA.
- 2- Les surnageants d'hybridomes et liquides d'ascites testés ne donnent pas de signal spécifique anti OsHV-1 significatif (hormis un seul, LG 5E5, très faible DO) en ELISA.
- 3- L'ascite produite en 2004 à partir de LG 5E5 ou les IgG purifiées de cette ascite, n'ont pas donné de signal spécifique significatif en ELISA.

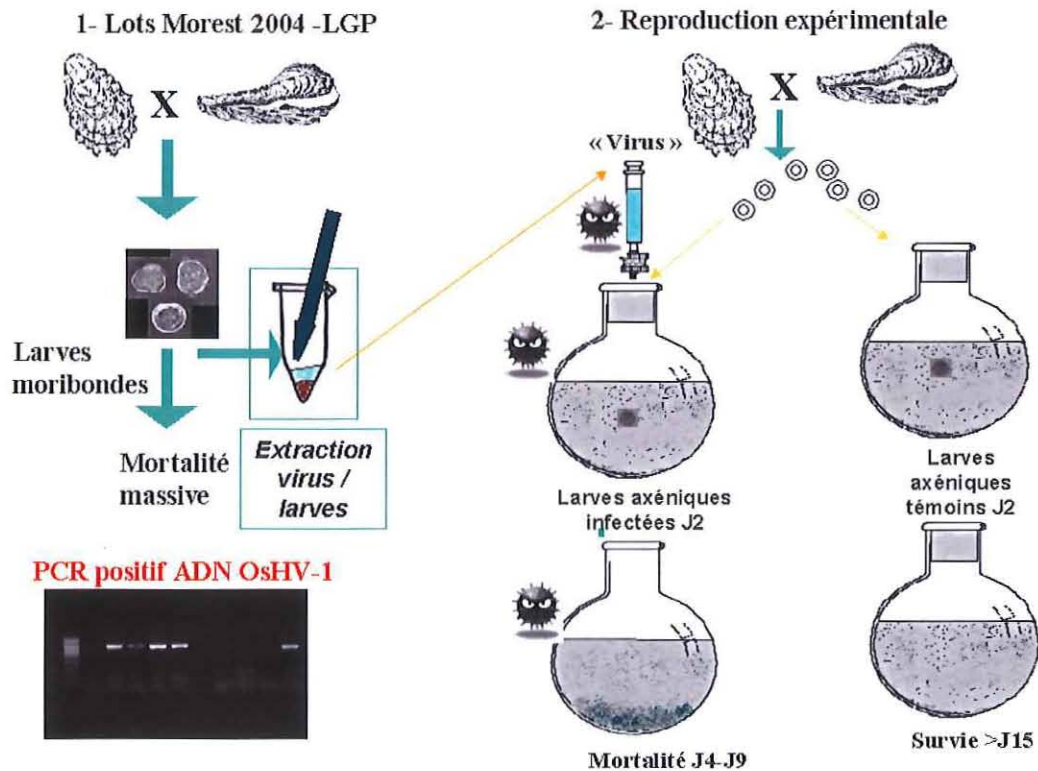
Le LGP ne dispose donc pas aujourd'hui d'anticorps spécifiques anti OsHV-1 exploitables en ELISA pour le développement d'un outil de diagnostic immunologique.

### **Analyses des productions MOREST 2005 (larves et naissain)**

Des mortalités anormales ont été observées au cours des productions Morest 2004 à l'écloserie de La Tremblade aussi bien au stade larvaire qu'au stade naissain. Les analyses réalisées ont permis de mettre en évidence la présence répétée d'OsHV-1 dans les larves et le naissain de micro nursery. Un échantillonnage et un suivi serré a été mené sur l'ensemble des lots Morest LGP produits entre avril et juin 04. Les lots suivis G4SD et G4F1 ont donné 7 bandes. Sur les 7, 6 ont présentées des mortalités très fortes associées à la détection OsHV-1 par PCR.

Des larves positives en PCR (présence d'ADN viral) issues de ce suivi ont été utilisées comme matériel infectant et ont permis de confirmer le pouvoir pathogène du virus détecté par PCR. Ces reproductions expérimentales de la maladie avec des larves « axéniques » donnent une pertinence sur le suivi de ce pathogène et sur le modèle qu'il représente pour l'étude de la réponse immunitaire de *Crassostrea gigas*.

### **Reproduction expérimentale des mortalités**



## Pesticides et immunotoxicité

Dans le cadre de Morest, des expériences menées en 2003 à Ifremer Bouin ont permis de démontrer l'effet d'un mélange de huit pesticides à concentrations environnementales sur les paramètres hématocytaires d'huîtres "R" et "S" après un contact de 7 jours. L'activité principalement diminuée était la phagocytose pour les deux types de familles. Des expériences similaires ont été réalisées en 2004 à Ifremer La Tremblade pour tenter de reproduire cet effet. Trois expériences menées dans les mêmes conditions qu'à Bouin sur des "R" et des "S" ont permis de conforter ce résultat. Nous disposons ainsi aujourd'hui d'un modèle permettant d'observer une modification de paramètres hématocytaires en présence de polluants (mélange de 8 pesticides) chez l'huître creuse (modèle d'immunotoxicité).

Afin de déterminer un éventuel impact des pesticides sur la sensibilité aux maladies infectieuses, des essais d'infection avec des bactéries du genre *Vibrio* (Mel 31 et Mel 31) ont été réalisés et sont toujours en cours. Il s'agit d'injecter un mélange de bactéries pathogènes à différentes concentrations après un contact de 7 jours avec les pesticides afin d'observer l'effet des pesticides sur la maladie. L'apparition de la mortalité est suivie, et des échantillons d'ARN sont extraits des hémocytes afin d'observer s'il existe une expression différentielle de gènes impliqués dans l'immunité. Ces expériences sont réalisées sur des huîtres "R".

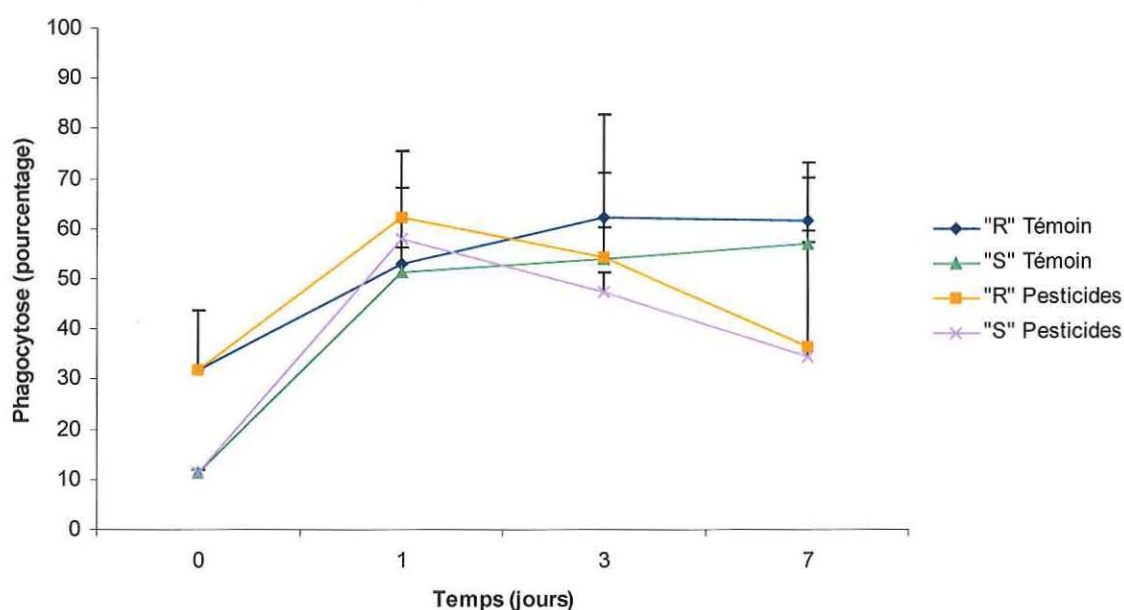


Figure 1 : évolution du pourcentage de phagocytose chez les famille « R » et « S » témoins ou contaminées par le mélange de pesticides lors de l'expérience à Ifremer Bouin en 2003

Tableau 1 : pourcentage de phagocytose lors des 3 expériences réalisées en 2004. \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$ . (T : Témoin ; P : Pesticides)

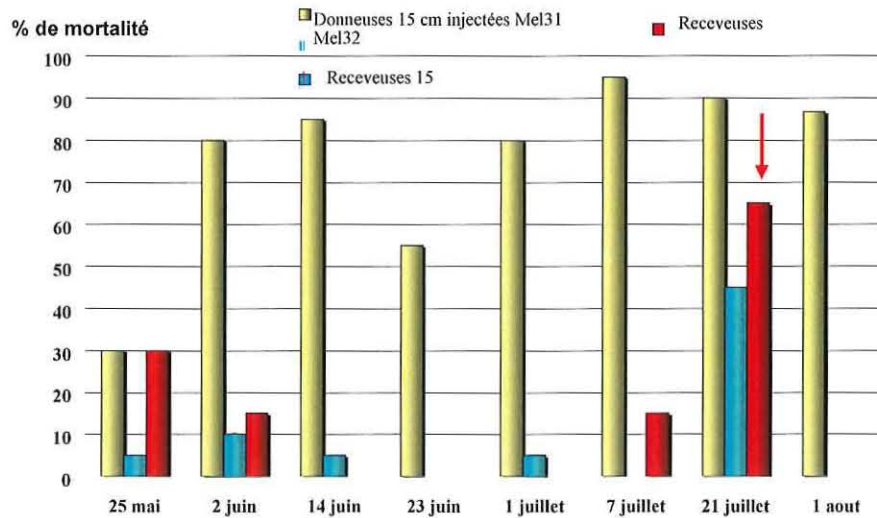
	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
R	T>P à 7 jrs *	T>P à 7 jrs *	T>P **
S		T>P *	T>P à 7 jrs *
ANOVA 2 facteur	R>S à 7 jrs *	T>P *	T>P à 7 jrs **      *

**Reproduction des mortalités au laboratoire (confirmation des résultats obtenus dans le cadre de DYNAMOR en 2003)**

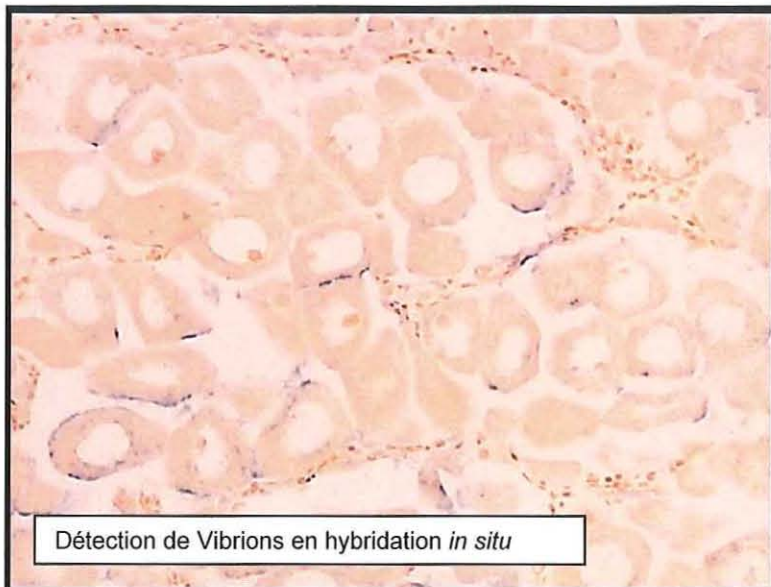
En 2003 des huîtres élevées à 15 ou 70 cm au dessus du sédiment ont été injectées avec des souches de vibrions virulentes (« donneuses ») et placées en cohabitation avec des huîtres non injectées de même origine (« receveuses »). Une transmissibilité de la mortalité a été observée de façon plus importante chez les huîtres élevées à 15 cm que chez les huîtres placées à 70 cm donneuses ou receveuses. L'expérience a été réalisée tous les 15 jours de mi-mai à mi-août 2003. La transmission était nulle en mai, forte en juin et juillet, moindre en août.

En 2004, nous avons évalué la reproductibilité de ces résultats et tenté de déterminer si l'effet 15 cm agissait au niveau des donneuses et/ou des receveuses. En d'autres termes, si le fait d'élever des huîtres à proximité du sédiment augmentait la sensibilité de ces animaux (effet sur les receveuses) ou stimulait la virulence du pathogène (effet sur les donneuses). Malgré une année atypique (peu de phytobentos oxydé dans le sédiment, températures globalement plus fraîches, très faibles mortalités sur ce site) nous avons observé un cas de transmission, le 21 juillet (les mortalités en 2004 ont été réduites et sont survenues mi-juin), entre des huîtres donneuses élevées à 15 cm et des huîtres receveuses élevées à 15 ou 70 cm. Aucune transmission n'a été observée aux autres dates ou dans le cas d'huîtres donneuses élevées à 70 cm. Ces résultats laissent suggérer que l'état de ces animaux, en phase de pré-ponte, joue un rôle important dans la stimulation des vibrions, leur permettant alors de coloniser les animaux voisins non injectés.

### Transmissibilité : un effet des receveuses ?



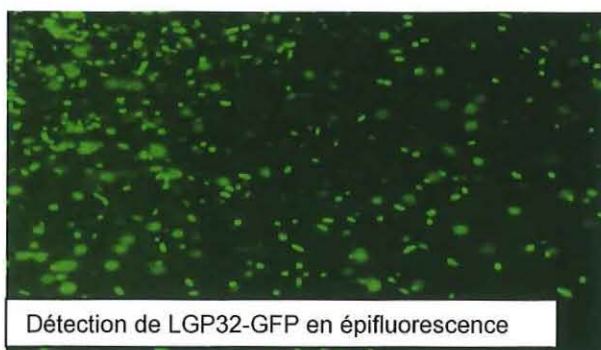
Nous avons donc tenté d'évaluer le rôle des gamètes dans la stimulation de vibrions. Des gamètes males ou femelles ont été incubés en présence ou non de vibrions pendant 4 heures, le mélange a été ajouté aux huîtres en aquariums pendant 12h, les animaux ont été rincés et la viabilité des huîtres a été évaluée quotidiennement. Des numérations réalisées sur TCBS à partir d'eau des aquariums ont montré une amplification de la flore *Vibrionaceae* quel que soient les conditions testées (+/- vibrions) témoignant du fait que les gonades utilisées étaient probablement déjà colonisées par des vibrions bien que l'on ne puisse exclure également la présence résiduelle de *Vibrio* dans l'eau de mer, même si celle-ci est filtrée. Pour étayer cette première hypothèse des vibrions ont été mis en évidence au niveau de la gonade par hybridation *in situ* à l'aide de sondes spécifiques de LGP31 ou LGP 32 obtenues à partir des banques soustractives SSH (Figure ci-dessous - Détection de la bactérie LGP32 chez une huître receveuse issue d'une expérimentation de cohabitation réalisée en 2003). Ces résultats confirment ceux déjà avancés par d'autres auteurs.



Afin d'évaluer le rôle des gamètes sur la virulence des vibrions, il apparaît nécessaire de «purger» les gamètes de leur flore associée par un traitement antibiotique et d'utiliser des souches génétiquement modifiées exprimant une résistance pour cet antibiotique.

#### **Approche de mutagénèse chez les souches apparentées à *V. splendidus***

Des essais de conjugaison ont permis de transférer un plasmide répliatif d'une souche donneuse d'*E. coli* vers les souches LGP31, LGP32 et LMG20012 (vir-). Ce plasmide permet l'expression conditionnelle ou constitutive de la GFP et porte un gène de résistance au chloramphénicol. Ces souches fluorescentes facilement identifiables en épifluorescence ou par un anticorps constituent d'ores et déjà un outil précieux pour l'histologie et la description de la pathogenèse. Des expériences de baignation avec des souches virulentes ou non en présence ou non de gamètes traitées par du chloramphénicol pourront donc être réalisées.



#### **Variation temporelle de la flore Vibrionaceae dans le milieu marin et l'huître en 2004 à Marennes-Oléron**

L'objectif de l'étude réalisée en 2004 était d'étudier les variations spatio-temporelles de la flore Vibrionaceae par rapport à la flore totale, et de la proportion des souches apparentées à *Vibrio splendidus* parmi cette flore cultivable.

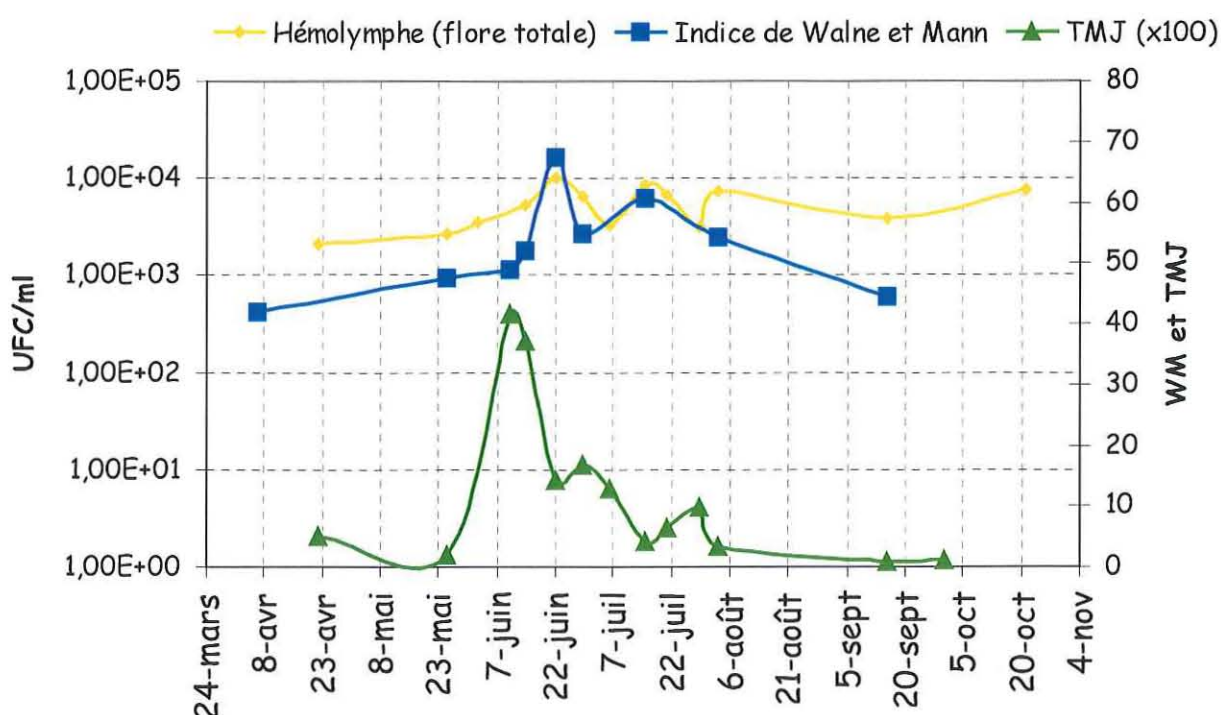
En mars 2004, des huîtres de 18 mois, obtenues par captage naturel à Bonne Anse (17), ont été placées à 15 cm du sédiment sur le site de Ronce les Bains. Un échantillon de 25 huîtres a été prélevé une fois par mois d'avril à octobre 2004. En juin et juillet, période de pré-ponte et de ponte, le pas d'échantillonnage a été porté à une fois par semaine. Suivant la même fréquence et simultanément, un échantillon d'eau de mer a été récupéré dans des coupelles placées dans les poches ostréicoles.

Des analyses bactériologiques ont été réalisées dans l'eau de mer échantillonnée (3 réplicats), l'eau intra-palléale et l'hémolymphe des huîtres (pool de 5 animaux, 5 réplicats). La population bactérienne cultivable a été quantifiée par numération sur marine Agar (incubation à 20°C pendant 48 h) et la fraction vibrions cultivable après repiquage sur TCBS (incubation à 20°C pendant 24h). Par ailleurs, la fraction de souches apparentées à *V. splendidus* a été évaluée par la technique d'hybridation sur colonies.

L'année 2004 a été caractérisée par une faible mortalité estivale des huîtres. Les résultats analytiques ont mis en évidence des concentrations bactériennes (flore totale et flore *Vibrionaceae*) faibles dans tous les compartiments étudiés ( $10^3 - 10^4$ /ml en 2004 versus  $10^5 - 10^6$ /ml observés en 2003). Plusieurs hypothèses ont été évoquées : les températures ont été moins favorables en 2004 par rapport à celles observées l'année précédente ; par ailleurs, le protocole méthodologique était différent (temps de transport et durée d'incubation).

L'évolution de la flore bactérienne et *Vibrionaceae* dans l'eau est indépendante des fluctuations de température observées dans l'eau. Nos observations ont confirmé cette tendance identifiée en 2003.

Nous avons observé une augmentation de la flore totale et de la flore *Vibrionaceae* dans le liquide intra palléal peu avant l'émission de gamètes. Des résultats expérimentaux obtenus lors de cohabitations ont montré que les gamètes pouvaient constituer un substrat favorable au développement des bactéries (Saulnier et Le Roux, résultats Morest 2004).



TMJ : Taux de mortalité journalière - WM : Indice de Walne et Mann

Par contre, contrairement aux résultats présentés en 2003 nous n'avons pas observé d'augmentation de la flore bactérienne ou Vibrionaceae dans l'hémolymphe avant la ponte.

Les expériences d'hybridation sur colonies ont souligné que les vibrions apparentés à *V. splendidus* constituaient 70 à 100% de la flore Vibrionaceae cultivable. Cependant, ils doivent être considérés avec réserve cette technique est encore au stade de développement méthodologique.

Les perspectives faisant suite à ce travail auront pour but de caractériser qualitativement les souches apparentées à *V. splendidus*, isolées de différents compartiments anatomiques d'huître élevées à 15 cm uniquement dans le cas où des mortalités sont observées sur le terrain.

### **Synergies REPAMO – MOREST**

Les mortalités anormales de mollusques tant sur les concessions en mer (estran, eaux profondes), en écloserie et nurseries, en bassins à terre et claires, qu'au niveau des gisements naturels exploités doivent faire l'objet de déclaration à l'Autorité Compétente (cf. directive européenne 95/70/EEC et article R236-14 du code rural). Les mortalités anormales en élevage sont définies comme toutes mortalités subites affectant plus de 15 % d'un stock dans un intervalle maximal de 15 jours. En écloserie, elles sont définies comme des mortalités telles, que l'écloqueur ne peut obtenir de larves pendant une période supérieure à un mois et couvrant les pontes successives de plusieurs reproducteurs. En nurserie, elles se définissent comme des mortalités soudaines et importantes.

En pratique, tout cas de mortalité considéré comme anormal par le professionnel doit être déclaré auprès de l'Autorité Compétente (Affaires Maritimes), quelle que soit la cause suspectée. Des prélèvements et des analyses sont alors réalisés par le réseau REPAMO. Les informations concernant ces épisodes de mortalités sont enregistrées sous la base de données REPAMO.

Les analyses réalisées par la cellule d'analyse de La Tremblade en cas de mortalités anormales d'huîtres creuses sont : la PCR pour la détection d'herpèsvirus (sur le naissain uniquement), l'histologie et si besoin, la microscopie électronique à transmission. Un isolement de souches bactériennes est également réalisé pour chaque lot prélevé selon un protocole établi après concertation avec le LPI (IFREMER, Brest) et le LGP. L'étude des mortalités anormales dans le cadre du REPAMO a pour but premier d'écarter une hypothèse infectieuse ; elle permet de relever la présence éventuelle d'agents pathogènes connus (OsHV-1 et *Vibrio* sp.) ou nouveaux tout en reliant ces résultats à des facteurs environnementaux et à des pratiques culturales. La carte spatio-temporelle des mortalités sur le terrain permet de relativiser et compléter les résultats acquis dans le cadre de MOREST.

Le bilan 2004 sera publié dans le rapport annuel REPAMO. En 2004, 17 événements mortalités d'huîtres creuses ont été déclarés, soit 33 lots analysés par la cellule analytique de La Tremblade. Sur ces 17 événements, 5 concernaient des adultes, 11 du naissain de moins de 1 ans et 1 cas concernait à la fois du naissain et des adultes. Ces mortalités ont principalement affecté le naissain en période estivale alors que les adultes ont été affectés tout le long de l'année. Ces mortalités ont touché la plupart des bassins de production mais plus particulièrement la Bretagne sud (Morbihan) et le secteur d'Arcachon. Peu de mortalités ont été déclarées en Normandie et en Charente Maritime.

L'herpèsvirus OsHV-1 a été détecté par PCR dans 7 événements de mortalités de naissain sur 11. Des souches majoritaires du genre *Vibrio* ont été isolées chez du naissain de manière concomitante à la détection d'OsHV-1 dans 1 événement mortalité. Des souches majoritaires du genre *Vibrio* ont

également été isolées dans 4 évènements mortalités d'adultes sur 5 déclarés. Un évènement mortalité d'adultes a été attribué à un problème zootechnique. Finalement, la détection d'agents pathogènes, relativement fréquente en 2003 et 2004 est liée entre autre à l'amélioration de l'échantillonnage, des techniques de diagnostiques et surtout à une meilleure réactivité des professionnels.



# Université de la Rochelle - LBEM (Laboratoire de Biologie et Environnement Marins)

---

Responsable : Pr. Gérard BLANCHARD

Participants : Nathalie IMBERT et Hélène THOMAS-GUYON

Adresse : Université de La Rochelle, Laboratoire de Biologie et Environnement Marins - Avenue Michel CREPEAU, 17042 La Rochelle, France

## Introduction

L'équipe 'Réponses physiologiques des organismes aux stress environnementaux en systèmes littoraux et pélagiques' du LBEM, est spécialisée dans l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires des processus adaptatifs développés par les organismes marins (invertébrés et vertébrés marins) en réponse aux fluctuations de leur environnement. Dans ce contexte, elle développe notamment des outils moléculaires d'évaluation des effets des divers stress environnementaux sur la structure génétique des populations de bivalves.

Au cours de l'année 2004, dans le cadre du programme Morest, l'équipe 2 du LBEM s'est proposée d'étudier les capacités immunitaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (1) en explorant une activité enzymatique de type phénoloxydase, suspectée d'intervenir dans la réponse immunitaire des bivalves marins et (2) en étudiant les mouvements calciques impliqués dans l'activation des hémocytes, cellules immunocompétentes.

## Résultats

### WP 1 - Mise au point d'outils

#### Tâche 1.3 - Mise au point d'outils immunologiques

##### Deux actions

**1<sup>ère</sup> Action : Détection et quantification de l'activité enzymatique de type phénoloxydase dans l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas***

*Participants : H Thomas-Guyon (MC) B Gagnaire (Thèse) A Bado-Nilles (Master Recherche)*

Le but de notre action est de mieux connaître le système Pro-Phénoloxydase (Pro-PO), soupçonné d'intervenir dans le fonctionnement du système immunitaire des huîtres creuses, d'une part, en réalisant le suivi de l'activité de type phénoloxydase (PO) pour caractériser le potentiel immunitaire de différentes familles d'huître et d'autre part, en évaluant les effets induits sur ce paramètre hémolympatique notamment par des variables forçantes (température, salinité, polluants) chez *Crassostrea gigas*.

Dans ce contexte, l'étude de l'activité enzymatique de type PO à divers stades du développement de l'huître creuse (embryon 6h, larves, juveniles 6 mois et adulte) a été poursuivie. Une recherche de l'expression de ce paramètre hémolymphatique a été effectuée en spectrophotométrie pour confirmer la diminution significative de l'activité PO au stade larvaire J11 de l'huître creuse (Figure 1). Ces résultats suggèrent que l'activité de type phénoloxydase est exprimée de manière précoce chez l'huître creuse, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant, notamment pour des échantillons d'embryons de *Crassostrea gigas*. La PO est une enzyme impliquée dans la réponse immunitaire des coquillages. La période du développement de la larve d'huître creuse (J8 et J13) correspond à la période de mortalités massives des larves infectées par des agents pathogènes comme le virus de type Herpès chez *Crassostrea gigas* (Arzul I et al., T. 2001).

Dans ce contexte, on peut émettre l'hypothèse que les huîtres creuses, présentent de manière précoce, au stade larvaire, une diminution des mécanismes de défense susceptible de fragiliser les coquillages et de les rendre ainsi plus sensibles à l'effet de facteurs environnementaux tels que les agents pathogènes et les polluants. Ces résultats laissent supposer également que "l'embryon 6h" d'huître utiliserait une partie du matériel d'origine maternelle (phénoloxydase) détecté sur la face externe de son enveloppe et assurerait de cette manière un développement larvaire optimal ultérieur. Des travaux réalisés en microscopie et menés en collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade (T.Renault) ont permis de confirmer l'existence d'une activité de type PO à ces stades du développement chez *Crassostrea gigas* : les granulocytes d'huîtres adultes présentent une faible coloration brune correspondant au produit de dégradation du substrat de l'enzyme (L-dopa). Nous avons également noté la présence d'un faible dépôt brun localisé sur la face externe de l'enveloppe d'embryon 6h'.

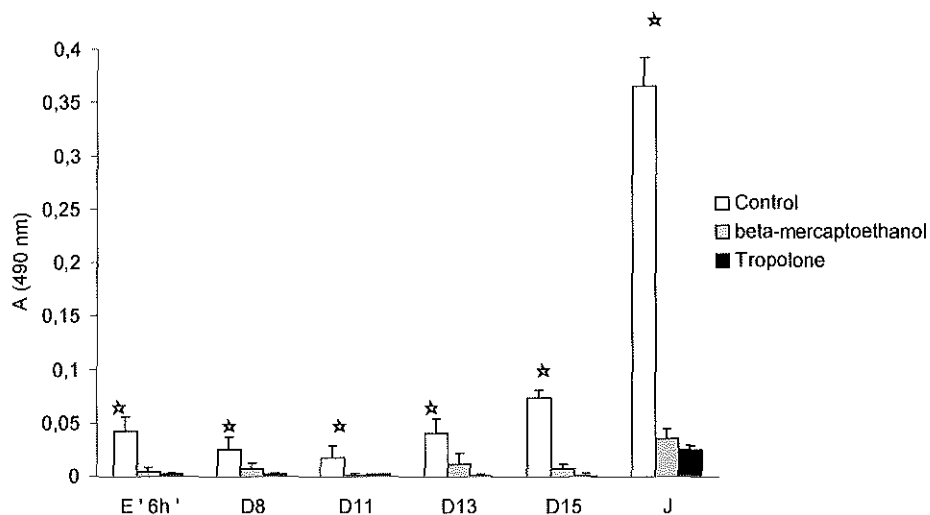


Figure 1: PO-like activity tested by spectrophotometry at different developmental stages of *Crassostrea gigas* after 21 h incubation. Values are averages of three replicates. \*= statistical difference for  $p=0.05$ .

Publication en cours de rédaction 'Detection of phenoloxidase like activity during the development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)' H Thomas-Guyon, B Gagnaire, K. Bouilly, S Lapègue and T Renault.

L'étude du clonage du gène codant pour la pro-phénoloxydase de l'huître creuse a été menée en collaboration avec l'unité FRE2706 CNRS de La Rochelle (C.Barthelémy) par la technologie d'amplification avec des amorces dégénérées. Le gène de la prophénol oxydase essentiellement cloné chez des invertébrés (insectes et crustacés aquatiques), l'identification de 4 domaines conservés a pu être réalisée. Dans ces domaines conservés, nous avons dessiné plusieurs oligonucléotides dégénérés et testé parallèlement les PCR dégénérées sur deux matrices différentes

ADN et ARN extraits d'hémocytes d'huîtres creuses adultes. Des expériences sont actuellement en cours de réalisation : les résultats préliminaires nous ont permis d'obtenir plusieurs fragments dont un de taille attendue d'environ 500 pb (par comparaison aux séquences PPO connues). Ce fragment a été cloné dans le vecteur plasmidique pGEM t. Le séquençage a montré qu'une phase de lecture de ce fragment avait une homologie avec des tyrosinases. Ce travail permettra l'étude de la modulation de l'expression du gène codant pour la pro-PO par des facteurs environnementaux (polluants, pathogènes) dans le but de développer un descripteur biologique de type immunologique chez l'huître creuse.

## Objectifs 2005

Réaliser le suivi de l'activité de type PO en spectrophotométrie et de l'expression du gène codant pour la pro-PO sur des cheptels issus d'huîtres sensibles ou résistantes et éventuellement mises en présence de différents polluants (pesticides) et de pathogènes (Vibrio et Herpes virus) (Thèse Béatrice Gagnaire et collaboration avec T. Renault, WP 3, tâche 3.3.1)

### **2<sup>ème</sup> Action : Caractérisation et quantification des flux calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas***

*Participants : N. Imbert (MC, LBEM), B Gagnaire (Thèse, LGP Ifremer, La Tremblade), E. Aton (DEA en 2003) et X. Ambert (DEA en 2005), T Renault (LGP Ifremer, La Tremblade) C. Cognard et B. Constantin (IPBC, UMR 6187, Université de Poitiers)*

Le rôle du calcium dans la réponse immunitaire a été largement décrit, en particulier chez les mammifères (pour revue Winslow et al., 2003). Bien que moins décrit chez les Invertébrés, son rôle a cependant été étudié dans les hémocytes de la moule (*Mytilus galloprovincialis*, Viarengo, 1994) et chez l'ascidie (*Botryllus schlosseri*, Ballarin et al., 1997). Il a en particulier été démontré chez la moule que les métaux lourds induisent une augmentation du calcium interne hémocytaire et une destabilisation des lysosomes (Marchi et al, 2004). Le lien entre cette perturbation et les fonctions immunitaires n'a cependant pas été clairement démontré dans ces cellules. C'est ce que nous cherchons à démontrer dans les hémocytes de *Crassostrea gigas*.

Les objectifs de cette étude étaient par conséquent, de caractériser les flux calciques hémocytaires et de mettre en évidence leur participation potentielle dans la réponse immunitaire afin de déterminer *in fine* si des polluants peuvent affecter la fonction immunitaire en altérant l'homéostasie calcique.

## Principaux résultats obtenus en 2004

### **Quantification du calcium intrahémocytaire**

En 2004, des expérimentations menées par le LBEM nous ont permis grâce à la cytofluorimétrie sur cellule isolée de quantifier le calcium sous forme libre chez différentes populations d'huîtres et dans différents milieux d'incubation. En effet, des précédents résultats (rapport 2003) obtenus en cytométrie de flux démontraient que certains paramètres hémocytaires (activités enzymatiques, mortalité, phagocytose, type cellulaire) étaient significativement modifiés lorsque les cellules étaient incubées dans l'ASW (Artificial Sea Water) en comparaison de ceux obtenus en hémolymphe. Les mesures de calcium ont été effectuées comparativement dans l'hémolymphe et dans l'ASW. La figure 1 montre que la concentration intra-hémocytaire du calcium sous forme libre mesurée en cytofluorimétrie sur cellule isolée, est significativement plus importante lorsque ces cellules sont incubées dans l'ASW.

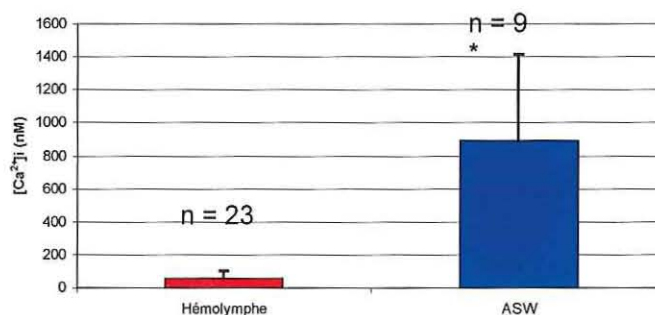


Figure 1 : Mesure du calcium intracytoplasmique sous forme libre (en nM) à l'aide de la sonde Indo-1/AM (Kd = 458 nM) en fonction du milieu d'incubation des hémocytes pendant la mesure (Hémolymphe (H) ou eau de mer artificielle (ASW)). Moyenne ± écart type (\*, p<0,05). Cellules triploïdes et diploïdes confondues.

Les expériences d'électrophysiologie privilégient l'utilisation de milieux de composition ionique simple et définie telle que l'ASW. Cette étude démontre cependant que lorsque les hémocytes sont incubés dans l'ASW, un certain nombre de paramètres hémocytaires sont modifiés par rapport à l'hémolymphe. Le niveau de calcium de base plus élevé en ASW peut être synonyme d'une activation de ces cellules dans ce milieu, ne facilitant pas par conséquent les études quantitatives du calcium. Par contre, l'utilisation de certains modulateurs calciques (rapport MOREST 2003) est plus aisée dans l'ASW. En effet, le comportement de certaines des substances utilisées, peut-être modifié dans l'hémolymphe.

#### Quantification des flux de calcium

Les précédents résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse de l'existence de stocks calciques internes pouvant participer au fonctionnement de ces cellules. L'utilisation de substances pharmacologiques appropriées (caféine, ryanodine) nous a permis de mobiliser le calcium contenu dans ces stocks (rapport MOREST 2003). L'analyse quantitative de ces flux est en cours.

#### Caractérisation des canaux calciques internes

Des marquages immunohistochimiques ont été entrepris afin de caractériser les canaux calciques (récepteurs) responsables de la libération du calcium de ces stocks vers le cytoplasme des hémocytes.

L'utilisation d'anticorps primaires anti-récepteur aux IP3 de type 1 et de type 2 montre un marquage positif périphérique pour les deux types de récepteurs (figure 2).



Figure 2 : marquage immunohistochimique des récepteurs IP3 de type 1 (A) et de type 2 (B) utilisant des Ac primaires polyclonaux anti-récepteur IP3 de lapin et des Ac secondaires de souris fluorescents (Alexa 488).

Ce type de récepteur a, au préalable, été mis en évidence dans les lymphocytes de vertébrés (Wedel et al., 2003) mais également dans les granulocytes de crabe (*Limulus polyphenus*, Solon et al., 1997). Bien que nous n'ayons pas utilisé d'Ac primaire d'huître, il est donc possible d'envisager l'existence de récepteurs de type IP3 dans les hémocytes de *Crassostrea gigas*. Il a été démontré

dans les lymphocytes que ces récepteurs étaient sensibles aux IP3 et également aux variations de calcium interne ; ces deux stimuli induisant la libération du calcium contenu dans les stocks internes. Afin de confirmer cette voie de signalisation calcique, la caractérisation de ce type de récepteur est également actuellement réalisée grâce à la technique du western blot.

### Modulation du calcium interne – étude en cytométrie de flux réalisée au LGP

L'étude en cytométrie de flux a été poursuivie en collaboration avec le LGP (stage maîtrise de X. Ambert) afin de déterminer les conditions d'étude du calcium intra-hémocytaire en cytométrie de flux. Les résultats suivants (figure 3) montrent qu'il semble possible de moduler le calcium intrahémocytaire suivant le milieu extracellulaire. L'utilisation de l'EGTA, chélateur calcique extracellulaire, semble diminuer significativement la fluorescence interne liée au calcium. Ceci est observé lorsque les expérimentations sont réalisées dans l'hémolymphe mais pas dans l'ASW. Ces résultats, s'ils se confirment (stage de DEA 2004 de X. Ambert), permettront de définir des conditions d'étude où le calcium interne est considérablement diminué.

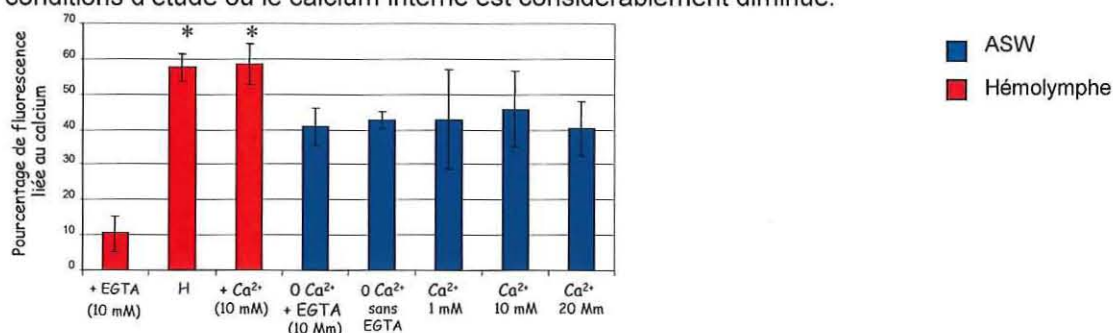


Figure 3 : Suivi de la fluorescence liée au calcium avec le Fluo-3/AM en cytométrie de flux dans des hémocytes incubés dans différents milieux, ASW et hémolymphe, dont la concentration en calcium varie. 10 mM de calcium est considérée comme la concentration physiologique. L'EGTA est un chélateur de calcium. (\*,  $p < 0,05$  indique une différence significative par rapport à H + 10 mM d'EGTA).

## Conclusion

Nous avons déterminé des conditions d'étude de l'homéostasie calcique intra-hémocytaire. Il nous est ainsi possible de moduler la concentration calcique intra-hémocytaire en utilisant des substances pharmacologiques appropriées (voir rapport 2003 et résultats 2004).

A partir de ces résultats, les objectifs 2005 sont :

- de déterminer comment la modulation du calcium interne peut affecter les fonctions hémocytaires,
- de déterminer si des polluants peuvent affecter l'homéostasie calcique et par conséquent les fonctions hémocytaires.

Ce travail sera principalement réalisé en cytométrie de flux au LGP et grâce à des techniques de biologie moléculaire dans le cadre du DEA de X. Ambert mené en co-direction entre le LBEM et le LGP.

La caractérisation des voies de signalisation calcique et des molécules impliquées sera également poursuivie.

Ce travail a fait l'objet en 2004 d'un stage de maîtrise (X. Ambert, 2004), d'une communication orale (Imbert et al., 2004) et d'une communication par affiche à un congrès international (Imbert N. et al., 2004). Une publication est en cours de soumission (Aton et al., soumis).

## Publications

Aton E. Renault T. Cognard C. Gagnaire B., Thomas-Guyon H. & Imbert N. A flow cytometric approach to the study of intracellular-free  $Ca^{2+}$  in *Crassostrea gigas* haemocytes *Fish and Shellfish Immunology (soumis)*.

Bado-Nilles A., Thomas-Guyon H 2004 : Activation of prophenoloxidase in acellular fraction and hemocytes of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *European Journal of Biochemistry*, 1 Supplement 1 July. P3.3-26.

Gagnaire B., Thomas-Guyon H. & T. Renault (2004). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes (2004). *Fish and Shellfish Immunology*. 16 : 501-512.

Gagnaire B., Renault T., Bouilly K., Lapègue S. & H. Thomas-Guyon (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 8: 99-110.

## Communications scientifiques

Aton E. Cognard C. Renault T. Thomas-Guyon H. et Imbert N. (2004) Calcium signalling in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes: a first approach. SEB annual meeting, Edinburgh UK. (Affiche)

Aton E. Cognard C. Renault T. Thomas-Guyon H. et Imbert N. (2003) Etude des mouvements calciques dans les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* lors de leur immunostimulation : 1<sup>ères</sup> approches expérimentales. III<sup>e</sup> Congrès International des Sociétés Européenne de Malacologie. La Rochelle 24-27 juin 2003 (*Communication orale par E. Aton*)

Gagnaire B., Thomas-Guyon H. & T. Renault. Etude *in vitro* des effets de métaux lourds sur la réponse hémocytaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : développement de techniques évaluant les impacts de la pollution estuarienne. Journées Conchylicoles, Ifremer, juin 2003, Nantes, France

Gagnaire B., Renault T. & H. Thomas-Guyon. Effet de l'exposition aux pesticides sur les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Colloque d'Immunologie des Invertébrés, septembre 2003, Banyuls, France

N. Imbert, <sup>1</sup>E. Aton, <sup>1</sup>X. Ambert, <sup>2</sup>B. Gagnaire, <sup>3</sup>C. Gognard, <sup>1</sup>H. Thomas-Guyon, <sup>2</sup>T. Renault "Homéostasie calcique intrahémocytaire : un outil en développement" Colloque de restitution des résultats du PEVs « Zones ateliers PEVs/INSU ». 3-4 nov. 2004

## Publications citées

Arzul I., Nicolas JL., Davision AJ., Renault T. 2001. French Scallops : a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290 : 342-349

Ballarin, L, Lima, F, and Sabbadin, A. (1997) Calcium Homeostasis and Yeast Phagocytosis in Hemocytes of the Colonial Ascidian *Botryllus schlossery*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*; 118(1), 153-158.

Marchi, B, Burlando, B, Moore, MN and Viarengo A. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on  $[Ca^{2+}]_i$  dependent phospholipase A2 activation. *Aquat Toxicol.* 2004; 66(2):197-204

Solon E, Gupta AP and Gaugler R (1997) Localization of a putative inositol 1,4,5-triphosphate receptor in the *Limulus* granulocyte. *Dev. & Comp. Immunology*, 21(3)277-285.

Viarengo, A, Cenesi, L, Moore, MN, and Orunesu, M. (1994) Effects of Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on the cytosolic Ca<sup>2+</sup> level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Marine Biology*; 119, 557-564.

Wedel BJ, Vazquez G, McKay RR, Bird G and Putney JW (2003). A calmodulin/Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process. *J. Biol. Chem*, 278 (28), 25758-25765

Winslow MM, Neilson JR and Crabtree GR (2003) Calcium signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 15, 299-307

## Laboratoire CREMA L'Houmeau (UMR 010 CNRS-IFREMER)

Coordinatrice des actions Morest du laboratoire : M. ALUNNO-BRUSCIA

Liste des différents acteurs du laboratoire dans Morest : M. Alunno-Bruscia, C. Bacher, V. Bouchet, Y. Bourles, N. Malet, P.-G. Sauriau, & C. Struski

Adresse : Place du Séminaire - B.P. 5 - 17137 L'Houmeau

Responsable (du laboratoire) : Patrick GENTIEN

### Introduction

Les objectifs du laboratoire pour 2004 étaient d'étudier les interactions trophiques huître/milieu dans le but de :

- 1) quantifier la réponse adaptative des huîtres, en terme d'écophysiologique (filtration, respiration, assimilation, croissance), aux variations des facteurs environnementaux (température, matières en suspension, phytoplancton),
- 2) caractériser par des bio-indicateurs foraminifères, en complément de l'approche biogéochimique, des indices de stress aigu trouvant leur origine dans la fermentation de la matière organique des sédiments ostréicoles lors des périodes de mortalités estivales,
- 3) proposer un schéma conceptuel des échanges trophiques huîtres - environnement au travers des cinétiques des signatures isotopiques pluri-organes sur les huîtres de l'expérience Dynamo 2002 (fin d'analyses isotopiques, P.G. Sauriau et N. Malet, collaboration avec le LER/PC),
- 4) déterminer par modélisation le rôle des huîtres dans les flux de matières à l'échelle de l'écosystème Marennes-Oléron,
- 5) modéliser et analyser la variabilité spatiale et temporelle des conditions trophiques.

### Résultats

#### WP1 - Mise au point d'un outil en écophysiologie

- *Intervenant : M. Alunno-Bruscia*

Cet outil (= automate de mesures et d'enregistrement de la physiologie des bivalves) est destiné à la mesure des taux de filtration, de biodéposition et de respiration des huîtres en conditions semi-naturelles (*i.e.* avec du seston naturel). L'année 2004 a surtout été consacrée à terminer la mise au point et la validation de l'outil, plus longue et difficile que prévu. Les points suivants ont notamment été solutionnés : pertes de charges importantes au niveau des débits dans les enceintes, fuites de courant altérant le signal de certains capteurs, problème de dégazage à l'intérieur des enceintes, pouvant affecter la concentration en oxygène. Par ailleurs, une interface LabView a été développée et permet à la fois de piloter, de suivre en temps réel et d'enregistrer des paramètres clefs (*e.g.* température, salinité, turbidité, fluorescence, oxygène dissous). Les premiers enregistrements en



conditions semi-naturelles, réalisés à Arcachon sur des lots R, S et des huîtres témoins, ont donné des résultats préliminaires satisfaisants sur la mesure des taux de filtration et de respiration. Un système de mesures kinési-valvaires, pour enregistrer l'activité valvaire des huîtres simultanément à leurs consommations en oxygène et nourriture, reste à être mis en place, ainsi qu'un nouveau capteur à oxygène de type « optode » (« optical electrode »).

## WP2 - Caractérisation des mortalités estivales *in situ*

### Tâche 2.2 – Etude inter-disciplinaire *in situ* des mortalités "R" et "S" versus triplos

#### 2.2.1. Variabilité temporelle et spatiale à microéchelle des ressources trophiques de l'huître : analyse par traçage isotopique naturel

Intervenants : P.G. Sauriau et N. Malet

Appliquée à l'expérience Dynamo 2002, la technique d'analyse des isotopes stables a permis de caractériser sur les différents organes des huîtres diploïdes et triploïdes mises en élevage à 15 et 70 cm du sol :

#### 1- Un basculement estival du régime trophique

Le régime trophique des huîtres du banc de Perquis à Ronce-les-Bains (année 2002) présente un basculement saisonnier très significatif. Il est dominé par l'utilisation de ressources pélagiques pendant la fin de l'hiver et le printemps - la glande digestive possède une signature entre -22 et -23 ‰ - puis bascule vers une utilisation d'une plus grande proportion de ressources benthiques sur l'été et l'automne - la glande digestive possède une signature isotopique variant entre -18 et -20 ‰ (Figure 1).

Une tendance similaire se révèle sur l'ensemble des organes analysés (Figure 2) mais avec un certain retard vis-à-vis de la glande digestive qui intègre en direct le signal isotopique des ressources trophiques alors les différents organes, du fait de leurs turn-over plus lents intègrent plus lentement ce changement.

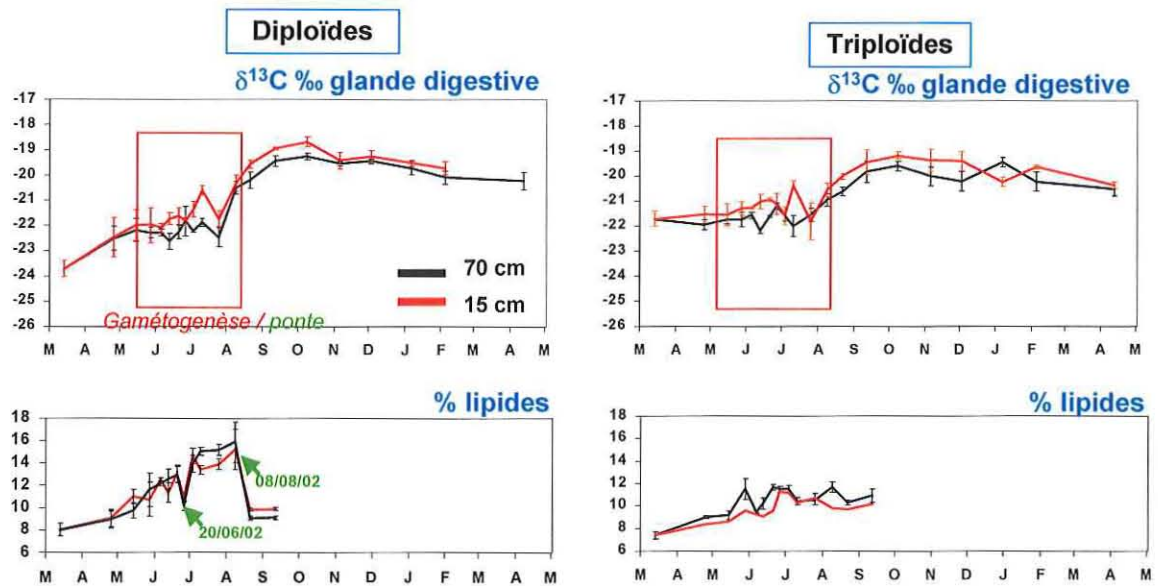


Figure 1 : Changement mensuel des signatures isotopiques de la glande digestive chez les huîtres à 15 cm et à 70 cm pour les diploïdes et les triploïdes.

## 2- Une influence majeure des processus de gamétogenèse et ponte

La confrontation des résultats de l'analyse en isotope stable avec ceux des analyses classiques de biométrie et de biochimie (Figure 1) s'avère tout à fait primordiale et irremplaçable pour bien distinguer la part respective de la croissance et de la gamétogenèse dans l'évolution temporelle de la signature isotopique des huîtres.

- En effet, en phase de croissance printanière - mars à mai (Figure 3), la signature isotopique des huîtres va s'équilibrer progressivement avec celles des ressources utilisées.
- Au contraire, dès l'entrée en phase de gamétogenèse, les processus aboutissant à la constitution des gamètes, peuvent d'autant plus modifier la signature isotopique de tissus que les processus de catabolismes des réserves énergétiques dominent sur les processus d'anabolisme des ressources trophiques. Ainsi de juin à juillet, pontes partielles et pontes totales peuvent apparaître (Figure 3) et génèrent des variations brusques de la signature isotopique (Figure 2). Le fait que ces variations brusques affectent tous les organes laissent supposer des remaniements métaboliques intenses qui seraient pour partie découplés de l'environnement trophiques.
- Enfin, en période estivale de post-ponte et ce jusqu'en automne (août - mi octobre), les processus de croissance somatique reprennent. De façon concomitante, les changements de signatures isotopiques dans tous les organes sont extrêmement graduels et caractéristiques d'une intégration majoritaire d'une nourriture benthique remise en suspension dans la colonne d'eau.

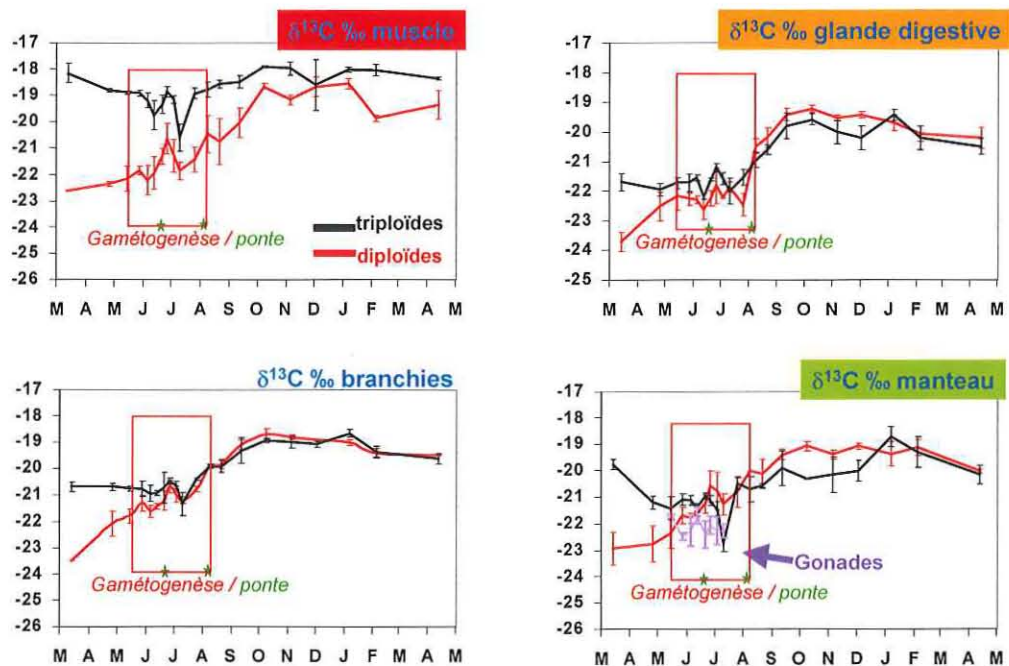


Figure 2 : Changement mensuel des signatures isotopiques du muscle, de la glande digestive, des branchies et du manteau chez les huîtres diploïdes et triploïdes placées en culture à 70 cm du sol.

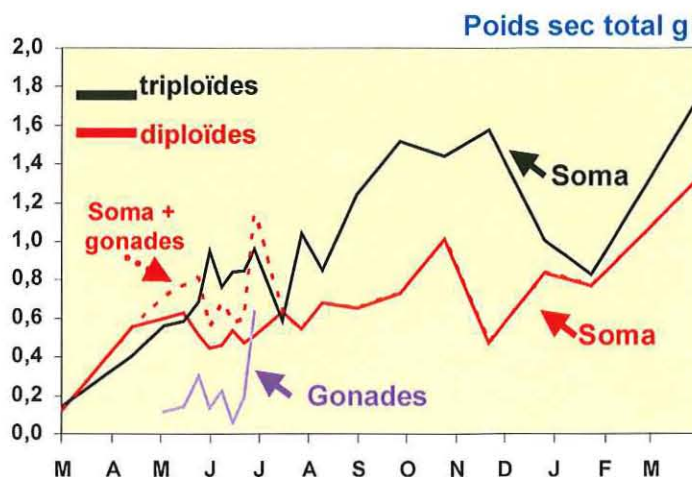


Figure 3 : Changement mensuel des masses corporelles du soma et de la gonade chez les huîtres diploïdes et triploïdes placées en culture à 70 cm du sol.

### 3 - Une influence du mode de culture sur la signature isotopique des huîtres

Dans le contexte d'une disponibilité de deux sources majeures de nourriture, l'une pélagique (phytoplancton néritique et détritus de la colonne d'eau) et l'autre benthique (microphytobenthos remis en suspension), il semblait logique *a priori* d'attendre une plus grande contribution des sources benthiques à la nutrition des huîtres placées à 15 cm du fond vis-à-vis des huîtres situées à 70 cm du fond. Les observations des variations mensuelles de la signature en isotope stable du carbone confirment cette hypothèse (Figures 1 & 2) avec une plus grande contribution des ressources benthiques pour les huîtres près du sol. Il faut cependant remarquer que la différence, bien que systématique entre les deux modes de culture, est assez faible en valeur absolue. Ceci suggère que l'hydrodynamisme local du site d'élevage est très élevé permettant au matériel remis en suspension d'être distribué bien au delà de la seule couche benthique de fond (les premiers décimètres).

#### En conclusion

- Les épisodes de mortalité sont concomitants des phases les plus actives de la gamétogenèse qui génère des changements brusques de la signature isotopique de tous les organes des huîtres.
- Les épisodes de mortalité seraient totalement indépendants du type de nourriture ingérée puisqu'ils sont antérieurs de plus d'un mois au changement de la mi-été de régime trophique des huîtres. Ceci est observé aussi bien chez les huîtres diploïdes que chez les triploïdes que pour les huîtres placées à 70 cm et 15 cm du sol.
- L'amplitude et la fréquence des changements de signature isotopique des organes de l'huître sont faibles et lentes en période de croissance somatique (printemps et automne) alors qu'elles sont élevées et rapides en période de gamétogenèse et ponte estivale, suggérant un découplage énergétique des huîtres du milieu naturel pendant cette période.
- Ces résultats demandent à être confirmés par l'analyse de l'expérimentation DYNAMOR 2003.

#### 2.2.2. Bio-indicateurs d'un stress aigu lié à la fermentation de la matière organique du sédiment en période estivale (P.-G. Sauriau & V. Bouchet en collaboration avec P. Soletchnik, La Tremblade, et J. Knoery, Nantes)

Mis en évidence par dosage des sulfures et de l'azote ammoniacal des sédiments (Figure 4), les processus de dégradation de la matière organique dans les sédiments du site de Perquis à Ronces-Bains sont particulièrement aigus en juin.

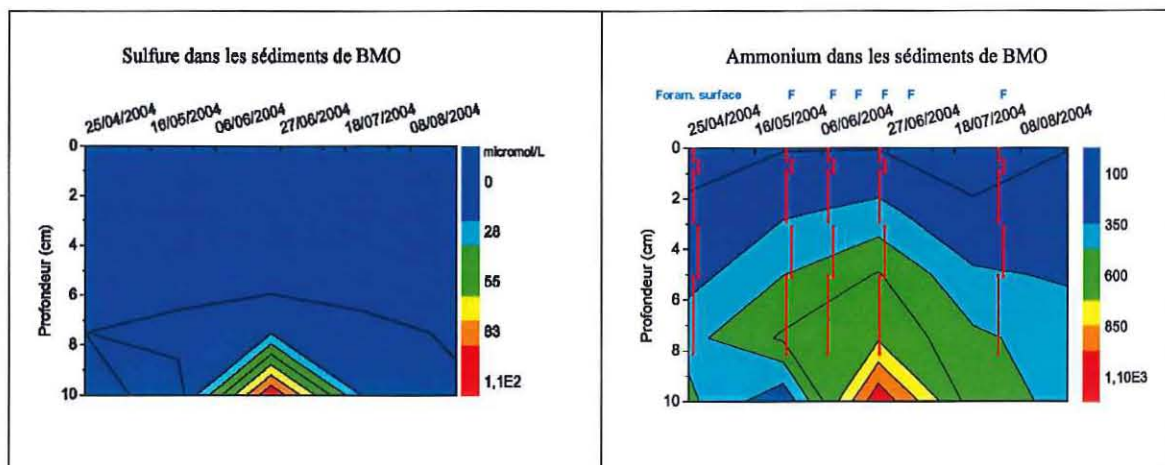


Figure 4 : Changement d'avril à août 2004 des concentrations en sulfures et azote ammoniacal des 10 premiers centimètres de sédiments sur le site de Ronces-les-Bains (d'après J. Knoery).

Partant de ce constat, il a été fait l'hypothèse que ces changements de propriétés physico-chimiques des sédiments devaient s'accompagner de changements concomitants dans les faunes qu'ils abritent. Notre choix s'est porté sur la microfaune des foraminifères, connue pour avoir des temps de renouvellement de générations très courts - mensuels à inframensuels - et notre objectif était de déterminer quelles espèces de foraminifères pourraient servir de bio-indicateurs des conditions physico-chimiques observées.

Le protocole retenu consiste selon le pas d'échantillonnage suivant (tableau 1) à récolter dans les carottes de sédiment la faune de foraminifères, puis à récolter 300 individus selon un protocole standardisé. Sur les 150 premiers individus, la proportion mort / vivant (les vivants étant colorés au rose bengale) est déterminée, puis sur les 150 individus suivants la diversité faunistique est déterminée.

Tableau 1 : dates d'échantillonnage des sédiments pour analyses physico-chimiques (ligne 1) et microfaunistiques (ligne 2)

AVRIL				MAI				JUIN				JUILLET				AOUT			
		22		6			25	9	14		22		1			4			
		F				F		F			F					F			

Les changements physico-chimiques d'avril à juin s'accompagnent d'une diminution de 30% de la proportion d'individus vivants (Figure 5a) et d'une diminution par un facteur 2 en surface à 10 en profondeur du nombre d'espèces vivantes (Figure 5b). Il y a naturellement un gradient de ces deux paramètres avec la profondeur, le maximum d'individus et d'espèces vivantes étant récoltées en surface. La présence de foraminifères vivants en profondeur peut être liée soit à des processus physiques de mélange de la colonne sédimentaire, soit à des processus biologiques actifs, comme la bioturbation, et/ou passifs comme la présence de galeries oxygénées créées par la macrofaune.

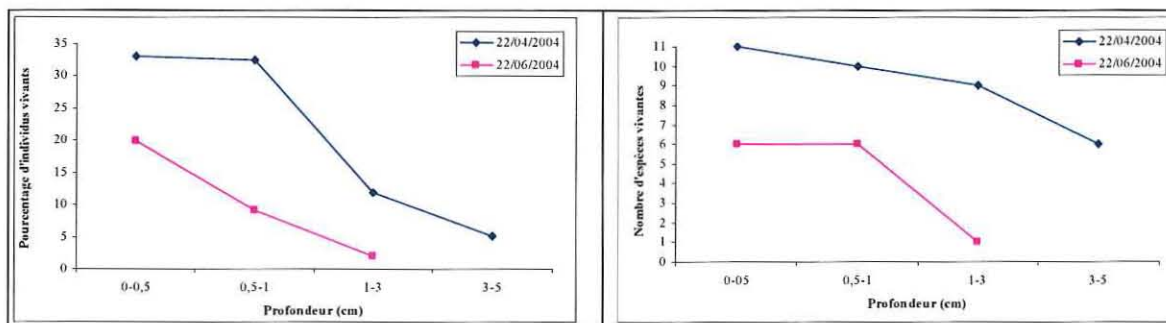


Figure 5 : Changement d'avril à août 2004 de la proportion mort / vivant (a) et du nombre d'espèces vivantes de foraminifères (b) selon la profondeur pour les 22-04 et 22-06 2004.

Aucune espèce de foraminifères parmi les 11 récoltées le 22 avril (Figure 5b), un mois avant le pic de sulfure et d'azote ammoniacal, ne domine réellement le peuplement de foraminifères de surface. Il faut cependant noter que 4 espèces sont mieux représentées : *Haynesina germanica*, *Criboelphidium excavatum*, *Ammonia tepida* et *Brizalina sp.*. En profondeur, vers 1-3 cm, l'espèce *Criboelphidium guntheri* domine.

En revanche, le peuplement de foraminifères est largement dominé par l'espèce *Ammonia tepida* (Figure 6) le 22 juin, date des pics de sulfure et d'azote ammoniacal, avec plus de 80 des abondances des 3 espèces présentes.



Figure 6 : *Ammonia tepida*

## En conclusion

- Les changements physico-chimiques liés à la reminéralisation de la matière organique des sédiments en juin provoquent aussi des changements décelables dans la composition faunistique du peuplement de foraminifères.
- Ces premiers résultats demandent à être consolidés par l'analyse complète en cours des autres dates échantillonnées.
- Ces premiers résultats indiqueraient la validité de l'hypothèse posée, à savoir que les foraminifères peuvent être utilisés comme bio-indicateurs des changements physico-chimiques des sédiments ostréicoles. Reste à déterminer, la typologie des espèces de foraminifères selon un critère de sensibilité et/ou tolérance. Une espèce comme *Ammonia tepida* s'avère a priori être une « espèce très tolérante » vis-à-vis de telles conditions physico-chimiques.

## WP 6 - Caractérisation de l'environnement

### Tâche 6.3 - Modélisation de la variabilité environnementale

Sous-tâche 6.3.1 - Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle (C. Bacher & C. Struski)

#### Échelles de variabilité des paramètres physico-chimiques et hydrobiolo-giques

La connaissance des échelles de variabilité des processus est importante dans les écosystèmes macrotidaux estuariens pour appréhender les ruptures dans les conditions environnementales. Dans la baie de Marennes-Oléron, la variabilité en particules et nutriments est liée à la variabilité des apports en eaux douces dans la baie via la Charente ou la Gironde (échelles inter-annuelle et saisonnière) et/ou liée à la variabilité des flux d'échanges entre les sédiments et la colonne d'eau (flux de particules organiques et inorganiques, flux de sels nutritifs) qui se joue aux échelles de la marée et saisonnière.

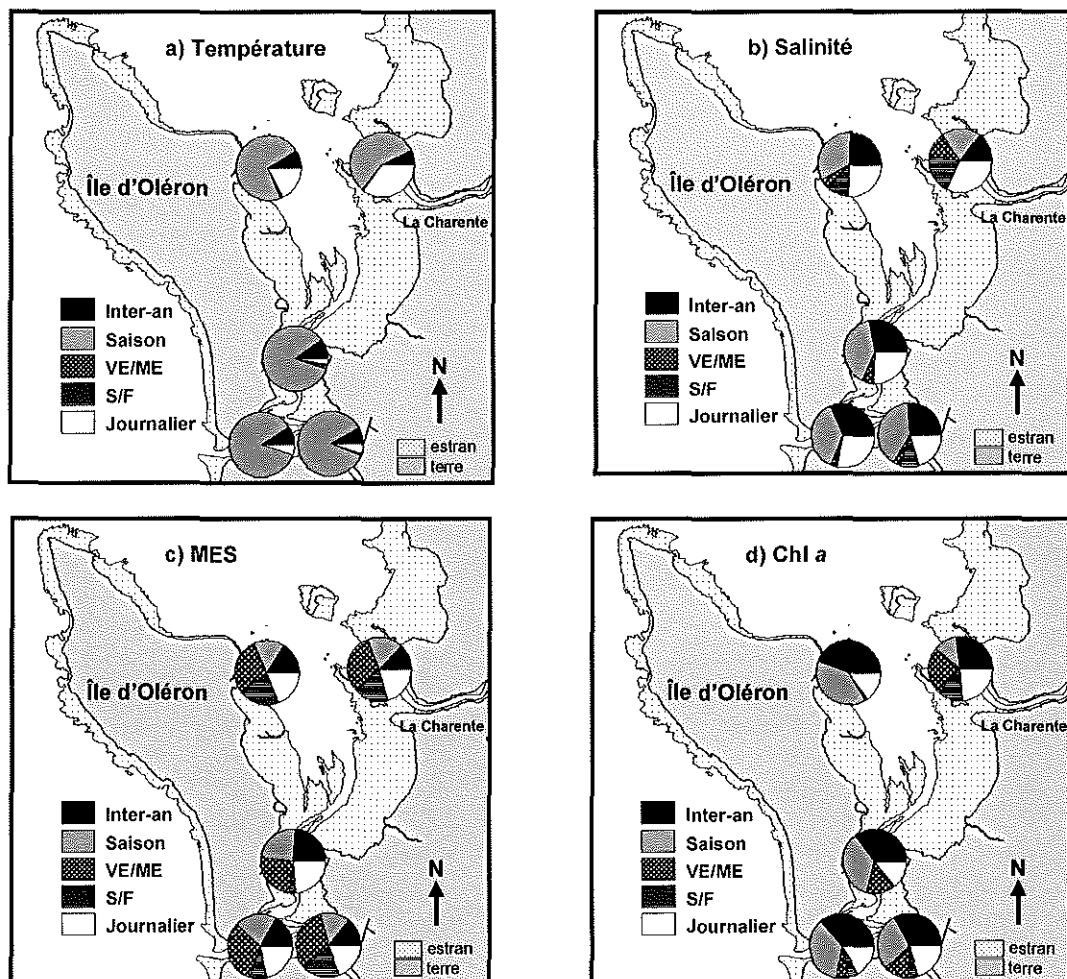


Figure 7 : Contribution de chaque échelle temporelle à la variabilité totale du paramètre considéré pour les 5 stations RAZLEC.

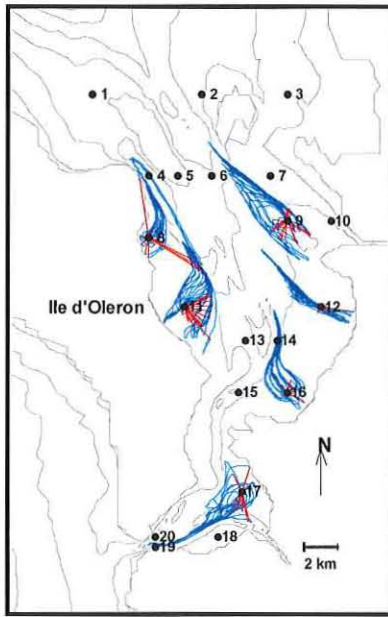
La variabilité de la température s'explique sur l'ensemble de la baie à l'échelle saisonnière (CV  $\approx$  30%), avec localement au niveau de la Charente une variation intra-journalière qui peut atteindre 20% lié à une température différente des eaux douces, et un CV intra-journalier de 10% au niveau de Nord lié à des entrées d'eau océanique. Bien que la baie de Marennes-Oléron soit souvent considérée comme un vaste estuaire, les variations de salinité ne sont pas très importantes à l'échelle de la baie (CV  $\approx$  3%) et seule la zone de dessalure peut présenter des variabilités intra-journalière (liée au flux et au reflux de la marée) et intra-annuelle (liée aux débits) de l'ordre de 10%. Ces variations de salinité dans la baie sont principalement liées aux apports en eaux douces de la Charente. L'utilisation du modèle permet une visualisation rapide des zones de plus fortes variabilités. Ainsi, en ME par faible débit, les CV sont de l'ordre de 10% dans la zone de panache uniquement, alors qu'en conditions de VE associé à un fort débit, les CV sont de l'ordre de 70% en sortie d'estuaire et l'ensemble de la baie est affectée (Figure 7).

### **Simulation des mouvements de masse d'eau**

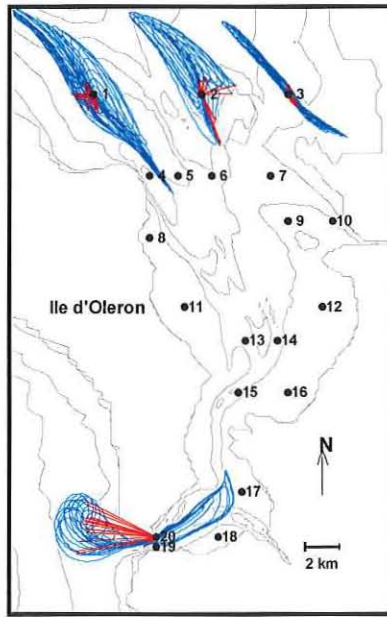
Les mouvements de masse d'eau ont une forte intensité et les excursions de marée ont été estimées par simulation afin d'évaluer les zones d'influence des différentes masses d'eau (figure suivante). En limite océanique Nord les distances parcourues lors d'un cycle de marée varient entre 2,5 et 8,3 km pour une résiduelle de 0,1 à 3,2 km. La direction N-S prédomine et les mouvements sont fortement alternatifs. Les masses d'eau suivent les passes profondes. En embouchure de Charente les particules suivent soit un mouvement alternatif NO-SE dans le panache, soit sont prises au-dessus des vasières entourant l'île Madame. Dans les zones intertidales, les trajectoires varient en fonction des zones. Elles ont être perpendiculaires à la côte sur la grande vasière de Brouage (points 12 et 14) : si elles peuvent parcourir l'estran de haut en bas pendant un cycle, le déplacement résiduel est faible. Du côté de l'île d'Oléron, les particules peuvent être vite reprises dans le courant océanique (point 8) ou parcourir en longueur et en largeur l'estran (point 13) : le déplacement résiduel est alors plus important que sur l'estran continental. Dans la partie Sud de la baie, les particules (point 17 et 18) sont prises dans les courants et évacuées ou parcourent l'ensemble de la zone intertidale. Au pertuis de Maumusson, selon le chenal considéré, une particule peut remonter un peu vers le Nord ou être attirée par le chenal de la Seudre par des mouvements alternatifs. A la fin du cycle de marée, elle va, dans la majorité des cas, être évacuée hors du bassin dans un mouvement tourbillonnaire (Figure 8).

### **Modélisation des interactions huître/production primaire**

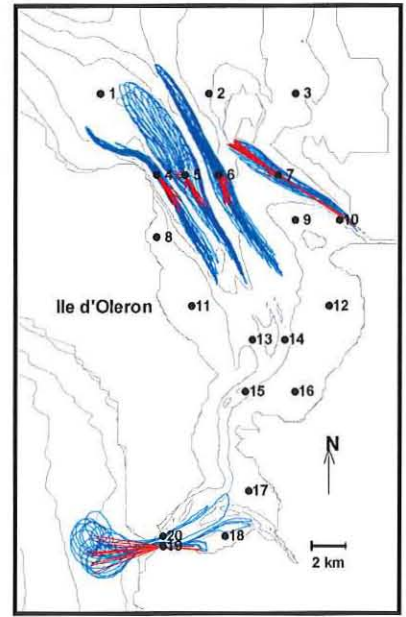
Les mesures de production primaire ont permis la paramétrisation d'un modèle couplant transport des masses d'eau, production primaire (sous le contrôle des sels nutritifs apportés par la Charente et de la turbidité mesurée limitant l'éclairement), la filtration par les huîtres dans les zones cultivées, la production microphytobenthique. Un certain nombre de simulations ont été effectuées selon plusieurs scénarios en vue de la validation du modèle (Figure 9) et un bilan des flux (production, consommation, transport) est en cours d'élaboration.



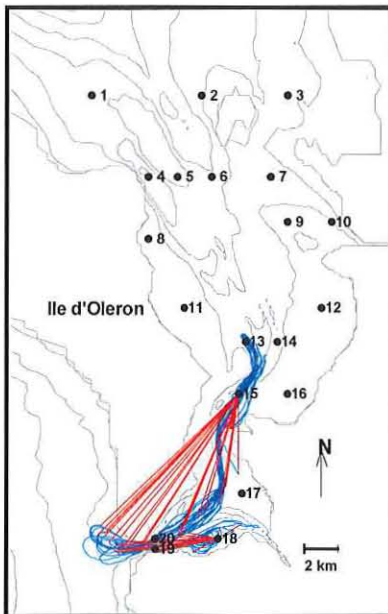
a) Points en zone intertidale (points n°8, 9, 11, 12, 16 et 17)



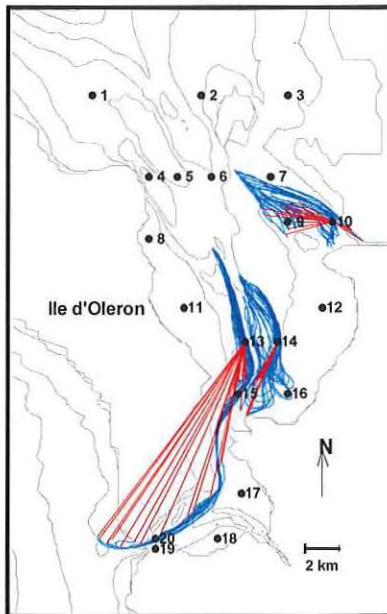
b) Points aux limites océaniques (points n°1 à 3 et 20)



c) Points aux limites océaniques (points n°4 à 7 et 19)



d) Points chenal central (point n°15) et vasière Sud (point n°18)



e) Points en embouchure Charente (point n°10) et chenal central (points n°13 et 14)

Figure 8 : Faisceaux de trajectoires (traits verts) et de résiduelles lagrangiennes (traits rouges)



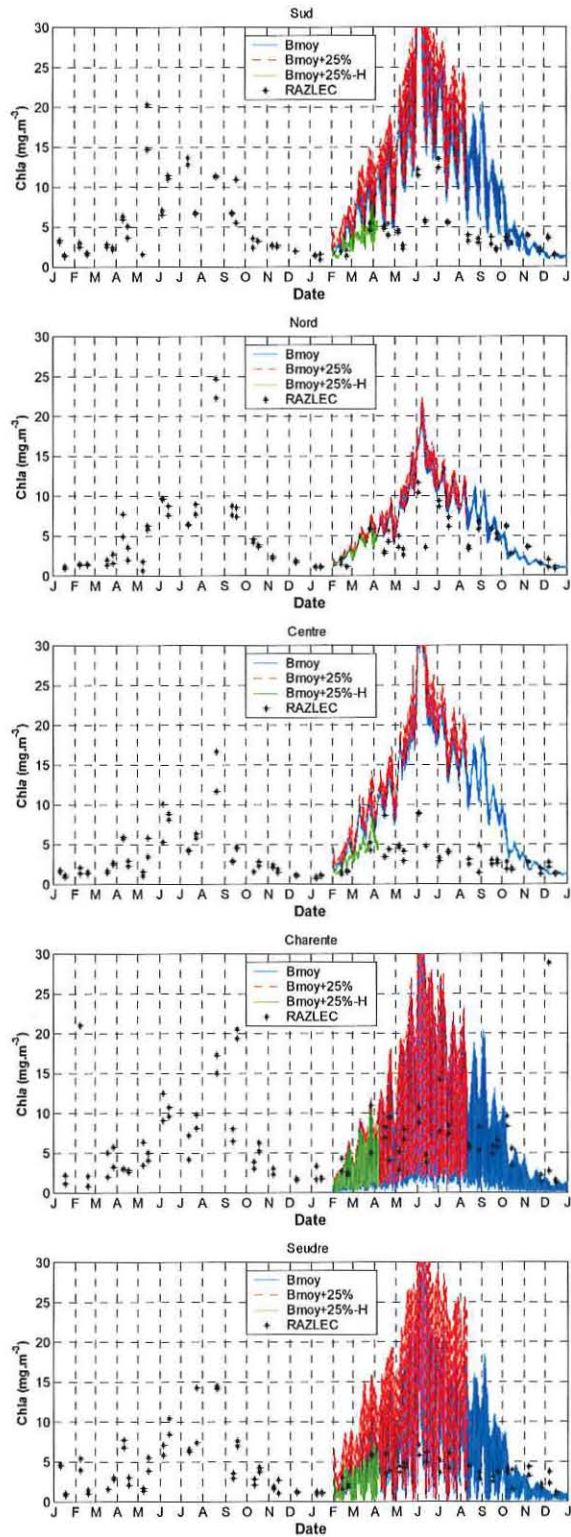


Figure 9 : Comparaison de la Chl a (en  $\text{mg.m}^{-3}$ ) simulée par le modèle et mesurée dans la baie pour les 5 stations RAZLEC en 2002. En bleu : production primaire pélagique seule. En rouge : prod. Prim. Pélagique + 25% de remise en suspension du microphytobenthos. En vert : prod pél +25% - conso huitres. \* : données RAZLEC.

*Sous-tâche 6.3.2 : Allocation d'énergie et modèle d'écophysiologie générique chez Crassostrea gigas :*

Cf rapport LPI (page 43-68 de ce document)

## **Bibliographie**

**Bayne, B.L., 1976.** Marine mussels : their ecology and physiology. Cambridge Univ. Press. 506 pp.

**Kooijman S.A.L.M., 2000 .** Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge Univ. Press. 424 p.

**Van der Veer, H., Kooijman, S., van der Meer J., 2001.** Intra- and Interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets. J. Sea Reseach 45, 303-320.

## Ifremer – Laboratoire GPIA-UMR5171 - Montpellier

Responsable laboratoire : François BONHOMME

Responsable local Morest : Viviane BOULO

Adresse : IFREMER-CNRS-Université de Montpellier II,  
UMR 5171 - GPIA  
2 Place E. Bataillon, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5,  
France

Intitulé de votre action dans le projet : Evaluation de la réponse immunitaire de l'huître creuse  
*Crassostrea gigas* (contribution aux tâches WP1)

### Introduction

Les activités des recherches du laboratoire pour l'année 2004 se classent en deux champs d'activités qui sont la caractérisation d'effecteurs de la réponse immunitaire et la mise au point d'outils d'analyse globale de l'expression de gènes. Les recherches ont été focalisées sur la mise au point et la validation des méthodes d'évaluation de la réponse immunitaire et de l'état de santé des huîtres, ainsi que sur l'identification de nouveaux gènes marqueurs :

- Recherche d'effecteurs anti-microbiens chez l'huître et étude de l'expression et de la localisation d'effecteurs en réponse à des infections.
- Standardisation et automatisation des techniques macroarrays et utilisations des banques EST, SSH existantes (collaboration avec le laboratoire PE2M de Brest). Application de ces techniques dans l'expérimentation VALI.

### WP1 - Mise au point d'outils

#### Tâche 1.3- Immunologie

##### a) Caractérisation d'effecteurs de la réponse immunitaire

***Cg-Timp* : un homologue des inhibiteurs de métalloprotéinases caractérisés chez les vertébrés.**

Les TIMPs (Tissus Inhibitors of Metalloproteinases) sont non seulement des éléments essentiels du contrôle de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMP) (Jaworski and Fager, 2000), mais sont aussi impliqués dans la réponse inflammatoire et dans l'immunité innée (Griesch et al., 2000). L'analyse de l'expression de *Cg-timp* chez l'huître a permis de montrer que ce gène n'est présent que dans les hémocytes et que son expression est inductible par des lésions de la coquille et par des infections bactériennes (Montagnani et al., 2001). De plus dans toutes les analyses deux transcrits *Cg-timp* (1,3 et 1,1 Kb) sont mis en évidence. Au cours de l'année 2004, les travaux concernant le petit transcrit *Cg-timp* ont été poursuivis.

Sur la totalité des Northern que nous avons réalisée avec *Cg-timp*, nous observons la présence de deux signaux d'hybridation. Une bande majoritaire (60 à 70%) correspondant aux transcrits de 1,4 kb (taille attendue pour *Cg-timp*) et une bande minoritaire (30 à 40%) correspondant à des transcrits d'une taille estimée à 1,1 kb. Cependant, tous les Northern blots ont été réalisés à partir de pools

d'ARN issus d'hémocytes de 10 huîtres. De ce fait, deux hypothèses pouvaient expliquer la présence des deux transcrits, soit chaque individu exprime seulement un des deux transcrits ou les deux transcrits sont exprimés par toutes les huîtres. Pour y répondre, des Northern blots ont été réalisés à partir d'ARN issus d'huîtres ponctionnées individuellement. L'étude a révélé que les deux transcrits sont présents au niveau de chaque individu et qu'il y a une grande disparité dans l'abondance des deux transcrits entre les différentes huîtres. Cependant, le ratio entre les deux transcrits est conservé chez tous les individus. Ainsi ils ne semblent pas que les deux *Cg-timp* soient régulés de façon différentielle.

L'expression des deux transcrits de *Cg-timp* a été analysée au cours du développement embryonnaire et larvaire pour rechercher un putatif rôle différentiel. Seul le transcrit 1,3 était détecté à partir du stade larve D. La quantité de ce transcrit apparaît augmenter jusqu'au stade 22 jours (dernier stade étudié). Ce stade est juste avant la métamorphose pendant laquelle des modifications et réarrangements se produisent. *Cg-timp* 1,3 pourrait ainsi jouer un rôle avec les MMP (métalloprotéinase de la matrice) dans ces remaniements au cours du développement. De plus, l'apparition des transcrits à ce stade pourrait correspondre à l'apparition des hémocytes puisque Elston (1980) décrit la présence de cellules phagocytaires dans la cavité viscérale (à partir du stade trocophore). *Cg-timp* 1,3 était aussi détecté dans les ovocytes et au stade 2-4 cellules, ces transcrits correspondraient aux ARN maternels puisque la transcription chez les mollusques commencerait au stade morula. De plus, ces résultats suggèrent que *Cg-timp* 1,1 est trop faiblement exprimé pour être détecté ou est exprimé plus tardivement et ainsi pourrait jouer un autre rôle.

### Effecteurs antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des composés essentiels du système immunitaire inné du monde vivant, animal et végétal. Typiquement, ces molécules tuent les micro-organismes en désorganisant ou en perforant leur membrane cytoplasmique. Les peptides antimicrobiens sont de petites protéines constituées en moyenne de 20 à 50 acides aminés qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. Jusqu'à présent, aucun peptide antimicrobien n'avait été décrit chez l'huître et les nombreuses approches de purification par HPLC ne nous ont pas permis d'isoler et de caractériser ce type de molécules chez *C. gigas*.

Récemment, deux ADNc codant des peptides présentant de fortes homologies avec des AMPs ont été identifiés respectivement dans les banques EST d'hémocytes de *C. gigas* (Gueguen et al., 2003) et SSH (Herpin et al., Communication personnelle) de manteau, à savoir un peptide riche en proline et un homologue des défensines d'invertébrés.

Afin de d'étudier les propriétés et fonctions de cette **défensine d'huître** nommée ***Cg-Def***, nous avons entrepris au laboratoire la production et caractérisation de cette molécule. Le gène codant la défensine a été cloné dans le vecteur pET28 et le peptide exprimé chez *E. coli* Rosetta en utilisant le système d'expression T7-RNA polymérase. *Cg-Def*, ainsi sur-exprimée chez *E. coli*, a été purifiée en deux étapes : une colonne d'affinité sur résine de Nickel suivi d'une étape HPLC (colonne RP-C8). Des analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées afin de vérifier l'intégrité et le folding du peptide recombinant. Le spectre d'activité antimicrobienne a été déterminé. *Cg-Def* présente de fortes activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries Gram+ et une activité plus modérée envers les bactéries Gram- et les champignons. A la différence des défensines décrites, *Cg-Def* conserve son activité en milieu salin. La structure 3D de la molécule a été déterminée par RMN et les résultats montrent que cette structure est proche de celle de la défensine MGD1 de moule. Enfin, des analyses de localisation de l'expression du gène réalisées à l'IBFA (UMR IFREMER-Université de Caen) ont montré que *Cg-def* est principalement exprimé au niveau du manteau de l'huître.

Une recherche de motifs spécifiques des AMPs sur les séquences présentes dans GigasBase (<http://www.ifremer.fr/GigasBase>) (ESTs d'hémocytes) a permis d'identifier un ADNc codant une protéine fortement homologue avec les peptides antimicrobiens de type riches en proline. Nous avons produit ce peptide et quelques molécules dérivées par synthèse chimique et analysé leurs activités antimicrobiennes. Les résultats obtenus montrent que le **peptide « proline-rich »** seul ne présente que de faibles activités antimicrobiennes. Cependant, un effet synergique (protocole du Checkboard Assay) a été démontré entre la défensine *Cg-Def* et le peptide proline-rich. Par ailleurs, des analyses par hybridation *in situ* ont montré que l'expression du gène est localisée exclusivement dans les hémocytes et inductible suite à une stimulation bactérienne.

Le troisième effecteur antimicrobien en cours de caractérisation au laboratoire est aussi une protéine issue du projet GigasBase et présentant des homologies avec une BPI " bactericidal/permeability-increasing protein " de neutrophiles de vertébrés. Ces protéines chez les vertébrés présentent des propriétés de liaison aux LPS et ont de fortes activités antimicrobiennes vis-à-vis de bactéries à

Gram (-) (Elsbach and Weiss, 1993). Le gène codant **Cg-BPI** a été cloné dans le vecteur pET26 et la protéine exprimée chez *E. coli* BL21(DE3). La caractérisation de la molécule recombinante est actuellement en cours. Les analyses par hybridation *in situ* ont montré que l'expression du gène est constitutive dans les épithélia et inductible dans les hémocytes suite à une stimulation bactérienne. Des analyses sont actuellement en cours pour étudier l'analyse de l'expression de ces différents effecteurs antimicrobiens de l'immunité par QRT-PCR en réponse à des infections

## **b) Mise au point de puce à ADN**

La disponibilité de 2 banques : 1) EST réalisée à partir d'ARNm isolés des hémocytes d'huîtres stimulées par injection de bactéries et donc potentiellement enrichie en ADNc de gènes impliqués dans les mécanismes de défense (Gueguen et al. 2003), 2) SSH (100 gènes) réalisée sur le tissu gonade (Huvet et al. 2004) entre des huîtres des familles "R" (résistante) et "S" (sensible) conditionnées expérimentalement, a conduit à développer l'analyse globale de l'expression de gènes par macroarrays ou puce à ADN.

### **- Création de la puce à ADN**

100 clones de la banque SSH, 1093 EST, 1015 clones (non séquencés) de la banque Gigas ainsi que 96 témoins, soit au total 2304 ADNc ont été utilisés pour la réalisation de la puce à ADN. Les clones ont été amplifiés avec des amorces universelles et les produits PCR à 20ng/μl ont été déposés en duplicates sur les membranes de nylon. Le dépôt sur membrane a été réalisé par des robots de précision (MicrogridII, Biorobotics) par la société Eurogentec. Différents types de contrôles ont été introduits 1) un contrôle externe, ADNc CAB (ADNc de *A. thaliana*) qui permet de vérifier la qualité du marquage des membranes après hybridation, 2) des témoins négatifs (eau, plasmide) 3) des témoins positifs (ADN génomique, Timp, EF, actine). Les premières expériences ont consisté à optimiser le protocole afin d'augmenter la sensibilité de la puce ADN et obtenir une bonne reproductibilité des résultats. Ainsi 15 et 30 μg d'ARN totaux ont été radiomarqués en simple et double marquage, puis hybridés avec les membranes. Les résultats sont reproductibles (coefficient de corrélation 0,93) et homogènes sur toute la membrane. Il apparaît après analyse que 30μg d'ARN totaux rétro transcrits par double marquage augmentent notablement la sensibilité.

Une attention particulière doit être portée sur la normalisation des intensités de façon à rendre comparable les différentes membranes entre elles. Compte tenu que chez l'huître aucun gène de référence dont l'expression est stable quelque soit les conditions testées, n'a été validé, la normalisation a été basée sur la moyenne des intensités positives. Cette normalisation adhère à l'hypothèse que l'intensité globale de tous les signaux d'une membrane est constante entre les expériences. Cependant, en complément à cette normalisation la recherche de gènes de référence (« housekeeping ») est en cours. Ces gènes de référence étant plus représentatifs de la population d'ARN testée, ils permettront une normalisation plus adaptée.

### **- Expérience VALI**

Dans le cadre de l'expérience VALI, des huîtres "R" et "S" ont été exposées à des conditions expérimentales reproduisant les conditions des mortalités estivales (pathogènes *Vibrio aestuarianus*, 19°C ; collaboration avec le laboratoire PE2M de Brest), les branchies ont été prélevées et les ARN totaux extraits afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les familles "R" et "S" (injectées avec des bactéries (sti) ou de l'eau de mer (em)), par la technique de macroarrays. Les résultats d'hybridation des différents ARN (Rsti, Rem, Ssti, Sem) ont été comparés deux à deux et les gènes ont été classés surexprimés ou réprimés selon que le ratio des intensités d'expression de ces gènes, dans les conditions testées, étaient supérieures à 1,5 ou inférieures à 0,6 (Tableau ci-dessous).

L'analyse de ces résultats suggèrent que des gènes impliqués dans le métabolisme (cytochrome b et c ; NADH dehydrogenase 6), dans le stress (heat shock protein 90, ubiquitin), et des inhibiteurs de protéase tels que TIMP pourraient être impliqués dans la différence entre les populations "R" et "S" vis-à-vis des mortalités estivales. Ces résultats doivent être confirmés par une analyse de l'expression de ces gènes en PCR en temps réel. De plus il faut noter qu'un certain nombre de gènes sont classés « no hits » parce qu'aucune homologie de séquence significative a été trouvée dans les banques de données, il sera donc intéressant de considérer ces gènes, de même les gènes « unknown » dont la fonction n'est pas connue, seront analysés. Enfin les gènes non séquencés présentant les ratios les plus élevés vont être séquencés et analysés.

Tableau 1 : Nombre de gènes surexprimés ou réprimés régulés selon les comparaisons Rsti/Rem, Ssti/Sem,

	Gènes up régulés ratio > 1,5				Gènes down régulés ratio < 0,6			
	Rsti/Rem	Ssti/Sem	Rsti/Ssti	Rem/Sem	Rsti/Rem	Ssti/Sem	Rsti/Ssti	Rem/Sem
total de gènes	60	20	74	33	89	76	69	23
EST	36	7	46	18	43	46	37	0
non séquencés	24	13	28	15	46	30	32	23
SSH	0	0	0	4	5	2	2	1
<b>Catégories de gènes</b>								
No hits	10	2	13	9	16	13	17	10
unknown	1	0	1	1	2	0	1	0
replication, repair, transcription, translation	2	0	2	1	6	2	1	1
stress	1	0	1	0	0	0	0	1
metabolism	5	2	9	2	11	8	8	4
Cellular structure	5	0	8	2	8	7	5	3
ribosomal protein	12	3	12	3	5	11	10	17
others	0	0	0	0	2	0	2	0
protease inhibitor (TIMP)	0	0	0	0	1	0	0	0

Rsti/Ssti, Rem/Sem, après hybridation avec les ARN respectifs et selon les catégories définies dans les banques considérant la fonction putative.

Rsti : population "R" injectée avec des bactéries (*Vibrio aesturianus*)  
 Rem : population "R" injectée avec de l'eau de mer  
 Ssti : population sensible "S" injectée avec des bactéries (*V. aesturianus*)  
 Sem : population sensible "S" injectée avec de l'eau de mer

## Bibliographie

- Elsbach P, Weiss J. (1993) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology*. 187, 417-429.
- Griesch, J., Wedde, M. and Vilcinskas, A. (2000). Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 461-72.
- Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D., Barreau-Roumiguere C., Girardot AL, Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas JM. (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 16:139-145.
- Huvet A., herpin A., Dégremont L., Labreuche Y., Samain J.F. and Cunningham C. (2004). The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, in press.
- Jaworski, D. M. and Fager, N. (2000). Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *Journal-of-Neuroscience-Research* 61, 396-408.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. and Escoubas, J.-M. (2001). Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett* 500, 64-70.

## **SYSAAF : Syndicat des sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français - Rennes**

---

Responsable : Pierrick HAFFRAY

Adresse : SYSAAF, Station SCRIBE/INRA, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes

Mel : [haffray@beaulieu.rennes.inra.fr](mailto:haffray@beaulieu.rennes.inra.fr) ; Tél : 02 23 48 53 78 ; Fax : 02 23 48 56 60 ;

### **Introduction**

L'objectif de l'action qui a été conduite par le SYSAAF en 2004 a visé à :

- continuer à assurer l'interface avec les écloséries commerciales,
- initier une analyse de la faisabilité d'un programme « collectif » d'amélioration génétique du produit d'écloserie en interface avec l'IFREMER, les écloséries commerciales, les structure régionales de développement de l'aquaculture et les SRC des Régions participant à Morest.

### **WP 4 – Tests expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales**

#### **Information des écloiseurs et veille technologique sur les résultats de recherche étrangers**

Les écloiseurs ont été régulièrement tenus informés des avancées de MOREST en transférant, lors de besoin des résultats ou des informations commentées mises à disposition sur le extranet MOREST. Une veille technologique sur les résultats de recherche étrangers a été réalisée et diffusée auprès des écloiseurs dans les revues bibliographiques internes du SYSAAF (pathologie et génétique)

#### **Définition d'un projet de programme de sélection collectif**

Compte tenu de la lourdeur et de la spécificité du travail de sélection, de la taille limitée des écloséries et de l'intérêt collectif des investissements nécessaires, les écloiseurs ont souhaité que l'étude des modalités d'une approche collective soit discutée avec les représentants de la filière en 2004.

## 1- Démarche utilisée

La définition du projet de programme de sélection collectif a été réalisée par l'organisation de réunions de travail successivement avec les différents partenaires potentiels pour définir les objectifs techniques et les moyens financiers nécessaires. Un premier projet a été conçu conjointement par le SYSAAF et l'Ifremer. Ce projet a ensuite été discuté avec les écloseurs (Nantes le 14 mai 2004), les représentants de la profession (CNC et SRC, Paris, le 14 juin 2004) et les structures de développement régionales (SMIDAP, CREEA, SMEL, PAO, Nantes, le 6 septembre 2004) puis avec les scientifiques participants au programme MOREST lors de journées annuelles de Caen (24-25 et 26 novembre 2004). Les conclusions de chaque réunion ont permis d'améliorer le document de travail initial en reprenant les remarques de chaque partenaires. C'est le document final qui a été présenté lors de la réunion annuelle MOREST de Caen en novembre 2004.

L'objet principal du projet est **d'initier une amélioration de la qualité de l'huître d'écloserie** par la mise en oeuvre d'une sélection commerciale collective **de façon à ce que**, au terme de 3 générations de sélection, **la filière**, représentée par le CNC qui serait maître d'ouvrage, **en assure la pérennité économique de façon durable et les grandes orientations techniques.**

Plus précisément, le projet se propose :

- d'accompagner la diversification de la filière nationale (naissain naturel, diploïde et triploïde d'écloserie),
- de fiabiliser la rentabilité des entreprises par l'amélioration des performances de survie et de qualité des huîtres d'écloserie,
- d'améliorer l'amaîtrise du statut hygiénique et sanitaire des huîtres d'écloserie,
- d'adopter une stratégie offensive et responsable face à la concurrence internationale qui développe des programmes de sélection (USA, Nouvelle Zélande, Australie ou anglo-saxonne),
- de valoriser économiquement un savoir faire scientifique et technique national (IFREMER, écloseries, structures régionales et départementales, SYSAAF) par la vente à l'export de juvéniles améliorés,
- d'intégrer collectivement de futures innovations utiles à la filière.

La conduite d'un tel programme serait basée sur les compétences des différents acteurs de la filière :

- **L'Ifremer** dispose de l'expérience scientifique en matière de génétique quantitative ainsi que les capacités et la compétence pour produire des familles (La Tremblade et Argenton).
- **Les écloseurs** disposent de la compétence pour la maturation des reproducteurs, le pré-grossissement des familles qui seraient produites par IFREMER (certains investissements pouvant être nécessaires) et la diffusion du progrès génétique.
- **Les associations de développement** (SMIDAP, SMEL, CREEA, CEPRALMAR) disposent des capacités, de compétences expérimentales ou de grossissement, et d'un moyen de diffusion des informations auprès des professionnels de leur région par le biais des SRC. Ces compétences pourraient être mises à profit pour effectuer le grossissement en poche et/ou sur filière des familles pré grossies par les écloseurs afin d'évaluer les différences de performances familiales ainsi que les interactions « génotype\*milieu ».
- **Les SRC et le CNC** disposent d'une connaissance des besoins de la filière.
- **Le SYSAAF** dispose des capacités et de compétence en matière de traitement des données de sélection avec des outils informatiques permettant une indexation multi génération et multi caractère sur des paramètres continus (poids ou format, par exemple) ou discontinus (survie, par exemple).



Le projet de programme d'amélioration génétique collectif minimum pourrait consister :

- à produire de l'ordre de 200 familles par génération, à raison de 50 familles par an et par écloserie Ifremer (La Tremblade et Argenton) sur 2 ans (base génétique minimum pour un travail sur la durée sur 15 à 20 générations),
- à envoyer ces familles sur un site d'élevage « principal » qui ne présente pas de mortalité sur lequel sera réalisée l'évaluation et la sélection,
- à envoyer des doubles de ces familles sur 2 à 3 sites « secondaires » de testage présentant des caractéristiques différentes sur le plan de la survie estivale et des conditions thermiques ou d'immersion, sites sur lesquels seront évalués différents caractères qui serviront à indexer les familles en évaluation sur le site principal,
- à réaliser 3 générations de sélection des familles les plus intéressantes (intervalle entre génération de 2 ans),
- à évaluer le progrès réalisé à l'issue dès la 1<sup>ère</sup> ou la 2<sup>ème</sup> génération de sélection,
- à poursuivre la sélection en adaptant le programme de sélection aux attentes des structures participant au projet.

Il est aussi retenu que les partenaires définissent la forme juridique de la structure qui assurera la continuation de la sélection (statut, responsabilité financière et stratégique, définition, de besoin de R&D) de la production et de l'évaluation des familles à la diffusion du progrès génétique. Le dossier de constitution de cette structure sera élaboré durant les premières années du projet pour un transfert progressif du savoir faire effectif à partir de la quatrième année. Lors du projet, une structure collective serait créée pour :

- contractualiser les relations entre les partenaires,
- définir les responsabilités de chacun et les modalités de valorisation et les aspects relatifs à la propriété de la lignée (b1),
- gérer le projet
- définir les objectifs,
- rechercher les soutiens financiers nécessaires,
- faire des choix d'ordre économiques et stratégiques
- recruter un cadre (niveau ingénieur) pour assurer la gestion technique et financière du projet.

La durée du projet serait de 6 ans (3 générations). Au terme de ces 3 générations, chaque partenaire pourrait choisir de continuer le projet ou de se retirer et tous les partenaires auraient co-détenteurs au terme de ces 6 ans de la lignée améliorée.

## 2 - Premiers éléments de budget

### \* Dépenses

Dans la première phase du projet, l'essentiel des dépenses représente des frais de personnel, d'élevage, de personnel pour les prises de mesures et de sous-traitance informatique. Les différents postes de dépenses suivants ont été identifiés :

#### a. Personnel

- i. 1 chef de projet + 1 technicien (CDD puis CDI)
- ii. Ingénieurs et techniciens des structures de développement
- iii. Personnels SRC et CNC
- iv. Chercheur IFREMER
- v. SYSAAF

#### b. Investissement (année 1)

- i. Capacités larvaire IFREMER (standardisation 30 l + nombre d'unités)
- ii. Capacités de nursage protégées et de maturation des écloseurs
- iii. Capacité d'élevage, de logistique et de mesure des structures de développement

#### c. Fonctionnement

- i. Larvaire IFREMER (4 cohortes de 26 à 50 24 familles / an)
- ii. Nursage (écloseurs)
- iii. Elevage des bandes (structures de développement)
- iv. Enregistrement des performances (structures de développement)
- v. Informatisation de la saisie
- vi. Adaptation du système informatique du SYSAAF (année 1)
- vii. Traitement des données (SYSAAF)
- viii. Frais d'animation, d'information et de déplacements communication interne (site web, lettre interne, réunions techniques et administratives, etc.)
- ix. Hébergement du chef de projet (location, téléphone, ordinateur, etc.)

Ces postes vont dépendre du nombre de paramètres suivis sur les familles placées sur le terrain. Les choix possibles seront à discuter avec la profession.

### \* Recettes

L'équilibre du budget lors de cette phase de 6 ans (3 générations) serait assuré par des demandes de soutien financiers auprès des Régions, la demande d'une contrepartie auprès de l'IFOP au titre des actions collectives par le CNC et la participation des professionnels (écloseries, SRC, CNC).

## 3 - Diffusion des résultats

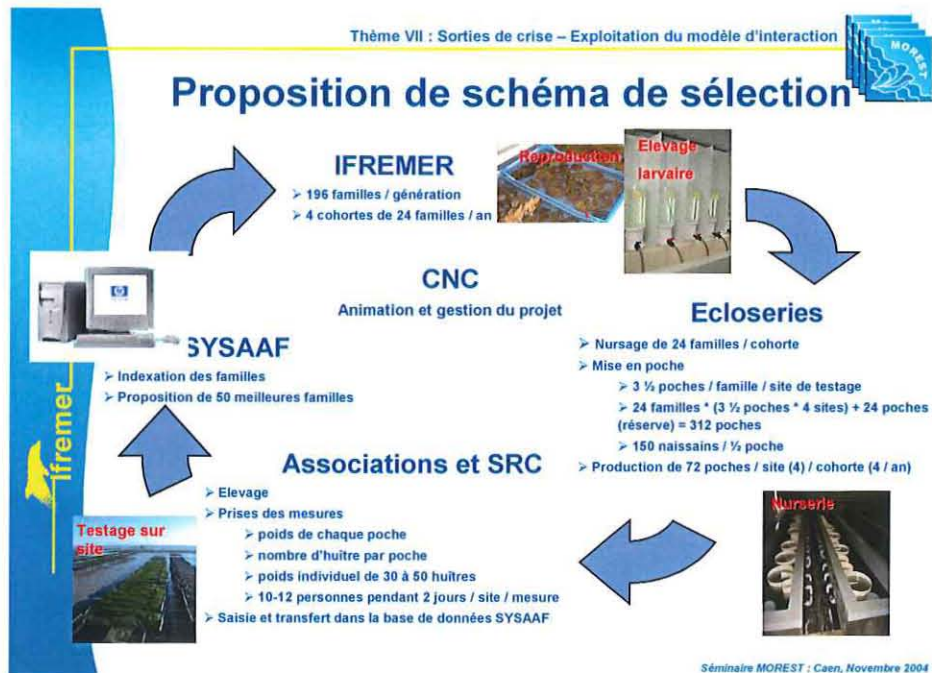
Les conclusions de ce travail ont été présentées lors des Journées Morest des 24-25-26 novembre à Caen par P. Haffray (SYSAAF) sous le titre : « Sélectionner des huîtres "R" »

# Bibliographie

Haffray P., 2003. Validation et valorisation des premiers résultats de MOREST par les écloserieurs : opportunités, points de blocage et propositions. Journées MOREST des 26-27-28 novembre à La Rochelle. Présentation orale.

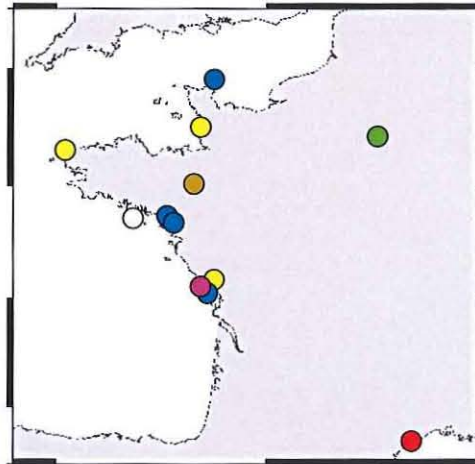
Boudry P., Degremont N., Taris N., McCombie H., Haffray P., Ernande B., 2004. Genetic variability and selective breeding for traits of aquacultural interest in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture Biotechnology Workshop, St Andrew 2004.

Haffray P., Lapègue S. et Boudry P., 2004. Sélectionner des huîtres R. Journées MOREST des 24-25-26 novembre à Caen. Présentation orale.





## Répartition proposée des tâches entre les partenaires

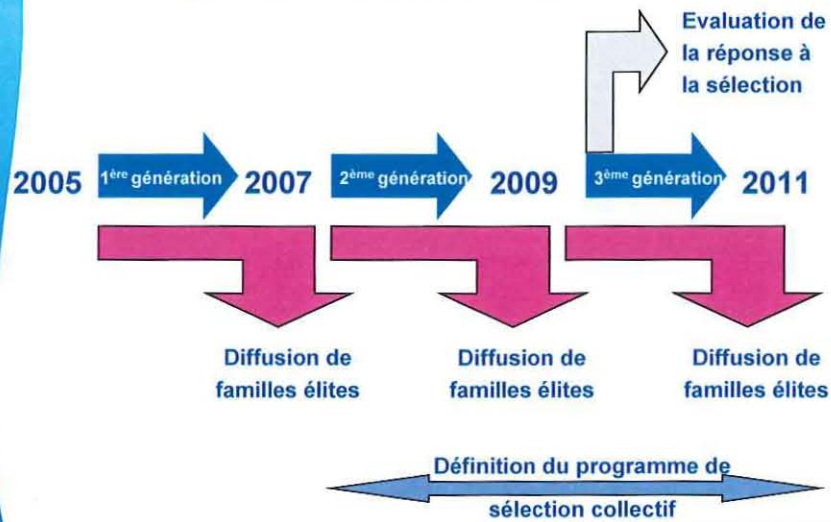


- Pilotage et gestion (CNC et SRC)
- Production des familles (IFREMER Argenton et La Tremblade)
- Nursage des familles (Grainocean, Salmar, SODABO, Vendée Naissain)
- Elevage des lignées en sélection sur 1 estran à faible mortalité et évaluation (SMEL)
- Evaluation sur estran avec mortalité (SMIDAP)
- Evaluation croissance lente sur estran (CREAA)
- Evaluation en lagune chaude (CEPRALMAR)
- Calculs statistiques (SYSAAF)

Séminaire MOREST : Caen, Novembre 2004



## Projet de validation-transfert



Séminaire MOREST : Caen, Novembre 2004



# CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole) Le Château d'Oléron

Responsable : D. Mille

Adresse : Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole  
Prise de Terdoux  
17380 - Le Château d'Oléron

[Creaa@wanadoo.fr](mailto:Creaa@wanadoo.fr)

<http://creaa.fr>



## Introduction

En 2004, le CREAA intervenait dans Morest dans le cadre de l'atelier 4.4.2. ou « prévenir les pertes en 1<sup>ère</sup> année : élevage (filière, écosystème froid, réduction ressource trophique,...). Une synthèse générale des expérimentations de prégrossissement et d'élevage en système sub-flottant menées au large de l'île d'Oléron était en cours en 2004. Elle sera publiée au cours du premier semestre de l'année 2005. La participation du Creaa se résume en une utilisation des données acquises depuis 1995 pour éclairer la compréhension des mortalités dans le bassin de Marennes-Oléron et ensuite pour tester les effets d'un éloignement du sédiment sur les performances de croissance et de survie. Elle a fait l'objet d'une présentation au séminaire de Caen en novembre 2004.

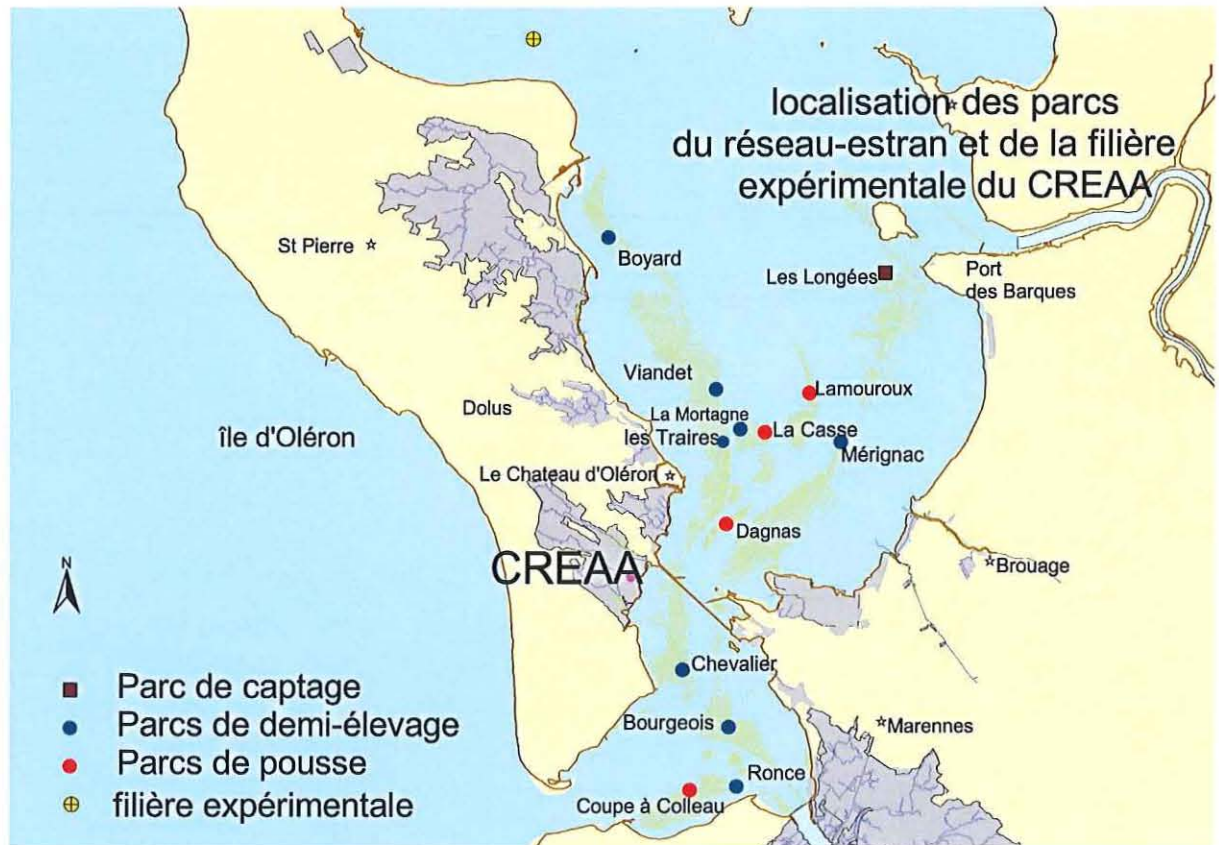
## WP 4 – Test expérimentaux et/ou *in situ* pour s'affranchir du problème des mortalités estivales

### Tâche 4.2 – Réduction des mortalités de juvéniles

*Sous-tâche 4.2.2 – Prévenir les pertes en 1<sup>ère</sup> année – élevage (filière, acosys. froid, réd. ressource trophique*

Les suivis sur une délocalisation au large des élevages menés sur parcs dans le bassin de Marennes-Oléron se sont arrêtés en juin 2004. Une synthèse des résultats acquis depuis 1995 est en cours de réalisation et sera publiée en ce début 2005. Elle fait le point sur les performances au large de différents produits (naissains naturels et éclosion) selon différentes stratégies. Des lots témoins sur parcs ont été élevés en parallèle. Les principaux enseignements concernent les différences de croissance et de survie entre les deux types de localisation ainsi que la qualité des chairs. La participation du Creaa dans cette tâche se résume en une utilisation des données acquises depuis 1995 sur la filière expérimentale située au large de Boyardville au nord du bassin de Marennes-Oléron. Les acquisitions de références se sont terminées en juin 2004. Différentes stratégies zootechniques privilégiant la croissance et une amélioration de la survie des huîtres de première, deuxième et dernière année ont été mises en oeuvre.

Différents essais ont été menés depuis 1995 avec des lots témoins sur parcs suivis dans le cadre d'un réseau d'acquisition de données réparti dans le bassin, le **Réseau Estran**. Les données acquises depuis 1991 concernent la croissance et la survie des huîtres sur 8 parcs de demi-élevage et 4 parcs de finition indiquant une valeur moyenne des performances à Marennes Oléron. Or, il est apparu que la filière permettait de sauvegarder des huîtres qui étaient l'objet de mortalités sur parcs.



Des produits ostréicoles de différentes provenances (grattis naturel, huîtres di- et triploïdes d'écloserie), huîtres naturelles de 18 mois issues d'un détroquage de tubes ou encore garniture de demi élevage naturelle ou provenant de naissains d'écloserie ont été testés selon différentes stratégies pendant ces dix années. Le prégrossissement d'huîtres de première année a notamment permis de mettre en évidence les bienfaits d'un recours à la filière en terme de survie et de croissance.

## Matériel et méthodes

Les mises à l'eau ont eu lieu à plusieurs moments de l'année. Les échantillonnages ont été mensuels ou plus fréquents dans la mesure de nos moyens nautiques d'intervention.

Les conditions environnementales sont caractérisées par une température plus clémente que sur parcs. En hiver, l'eau ne descend pas en dessous de 5°C et l'été, elle se situe aux alentours de 20 ou 21°C au maximum exception faite des étés 2001 avec 22,2°C et 2003 avec 23,0°C. Les 19°C sont atteints ou dépassés en juin. Les renouvellements importants dans les pertuis charentais assurent une richesse trophique à la zone concernée où les densités en élevage sont faibles.

## Résultats provisoires

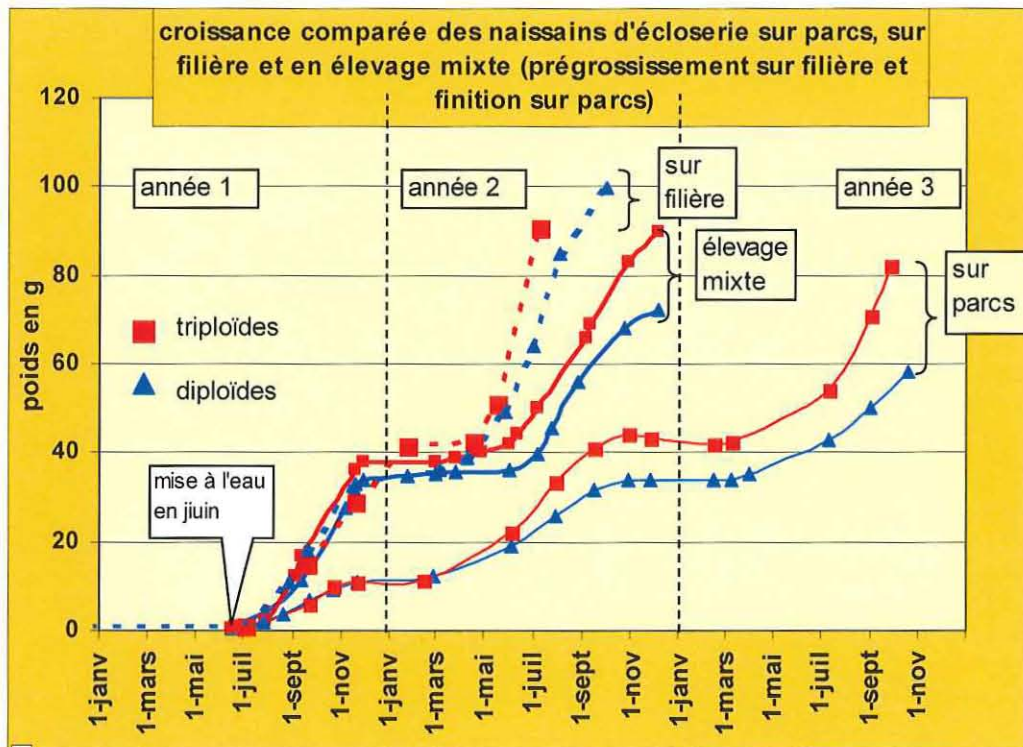
Le recours à la filière pour tout ou partie du cycle constitue une voie de sortie de crise. De même, les résultats très probants acquis sur la filière ainsi que sur parcs incitent à considérer l'emploi des triploïdes issus de croisement comme une alternative solide face aux mortalités touchant les cheptels diploïdes.

## Les croissances

Le recours à la filière pour un pré-grossissement en 1<sup>ère</sup> année et une finition sur parcs de poussa en deuxième (**cycle mixte**) donne des **huîtres supérieures à 80 g** dès la fin du 2<sup>ème</sup> été **soit en 18 mois**. Dans le cadre d'une stratégie basée sur le naissain naturel (**grattis**), le recours à la filière (cycle mixte) permet aussi d'obtenir des huîtres vendables dès le 2<sup>ème</sup> automne (>70g en moyenne). Les richesses nutritives du site disponibles en permanence pour des huîtres continuellement immergées expliquent ces performances. L'immobilisation des structures d'élevage utilisées sur la filière est alors de 10 mois et permet d'envisager des rotations rapides. Le **gain de temps** est d'**une année** par rapport au cycle des triploïdes sur parcs et de deux années en ce qui concerne le naissain naturel élevé traditionnellement. Afin de profiter pleinement de la productivité printanière, une mise à l'eau précoce en avril plutôt qu'en juin conduit à une croissance encore supérieure : les huîtres triploïdes peuvent peser plus de 70 g et les diploïdes plus de 50 g dès la fin de la 1<sup>ère</sup> année.

L'**élevage complet** en élevage suspendu depuis la jeune huître jusqu'à la taille commerciale a été étudié. Il produit des animaux de 80g en 10 à 12 mois pour les triploïdes avec un indice de chair de type « spéciale » et en 14 mois pour les diploïdes.

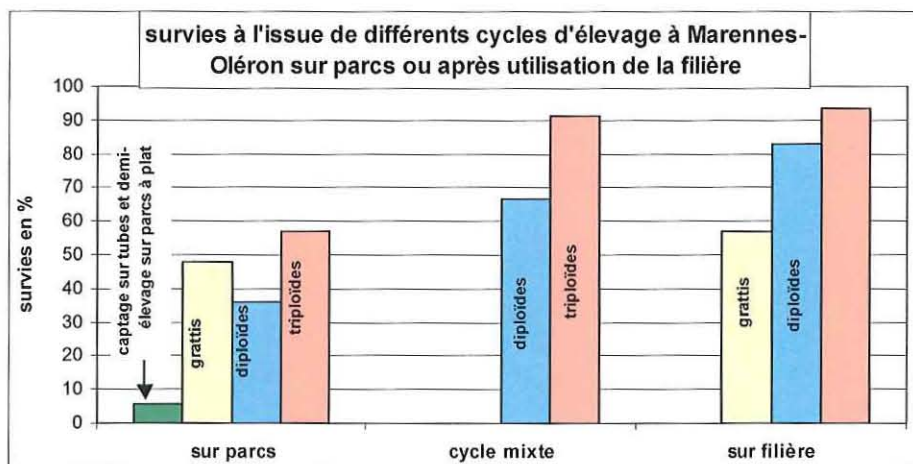
Cependant, la stratégie de pré-grossissement est celle qui peut le mieux s'intégrer aux cycles et aux structures de production actuelles du bassin de Marennes Oléron.



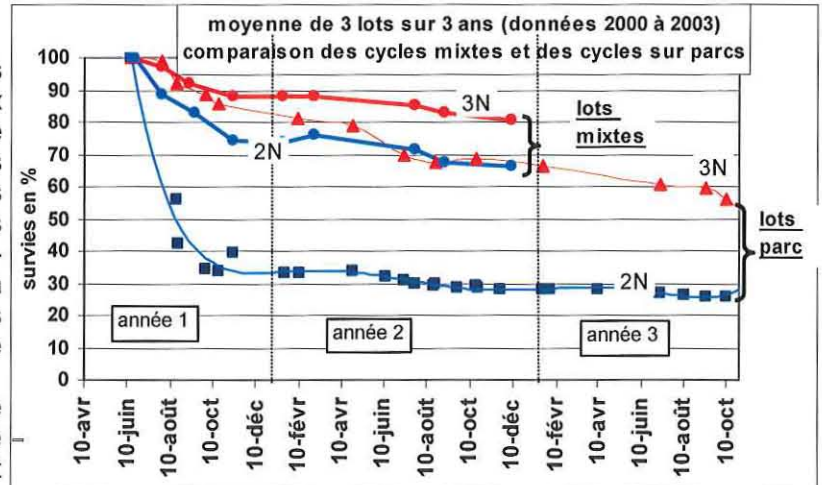
Pour du **naissain** acheté en **septembre**, le cycle dure 26 mois au minimum sur parcs. Les poids obtenus sont cependant inférieurs à ceux acquis avec du naissain de printemps. Or, dans le cas du **cycle mixte**, le poids de 80g est atteint à la fin du deuxième été.

## Les survies

Le passage par la filière « économise » des huîtres qui « auraient » dû mourir sur parcs. Le gain de survie est de 25 à 30 % sur la totalité du cycle d'élevage entre le cycle mixte et l'élevage sur parcs. L'utilisation d'huîtres triploïdes dans le cadre d'un cycle mixte permet d'obtenir des survies cumulées supérieures à 90%.



Une comparaison menée sur 3 lots de naissains composés des deux fractions di- et triploïdes permet de mettre en évidence les différences qui existent entre les deux fractions ainsi qu'entre les deux stratégies d'élevage (cette représentation ci-contre tient compte cependant de la mauvaise fiabilité des lots diploïdes des lots 2N acquis à cette époque auprès des écloséries françaises). Cela permet de voir cependant que l'effet de « sauvegarde » procuré par la filière est nettement plus fort sur les populations de diploïdes que sur celles de triploïdes.



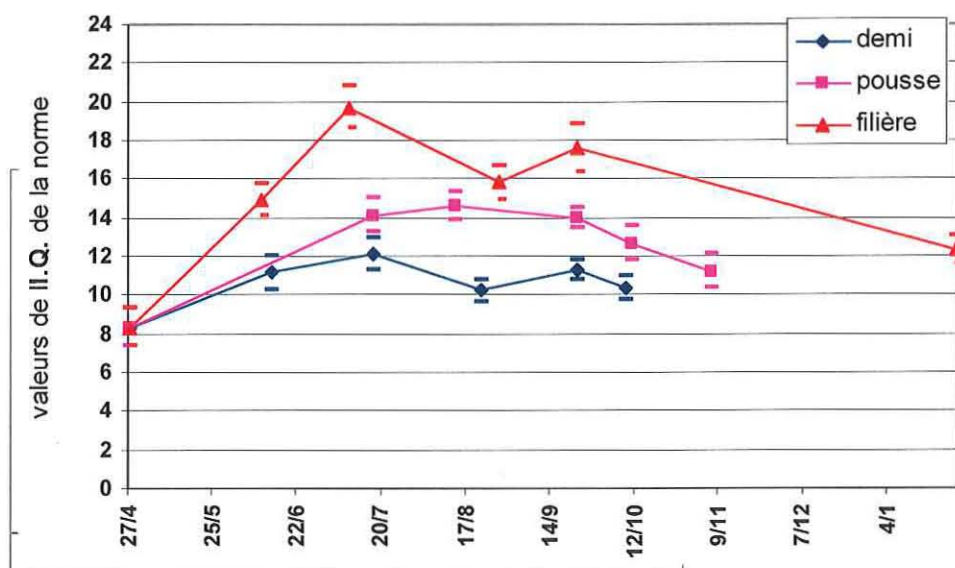
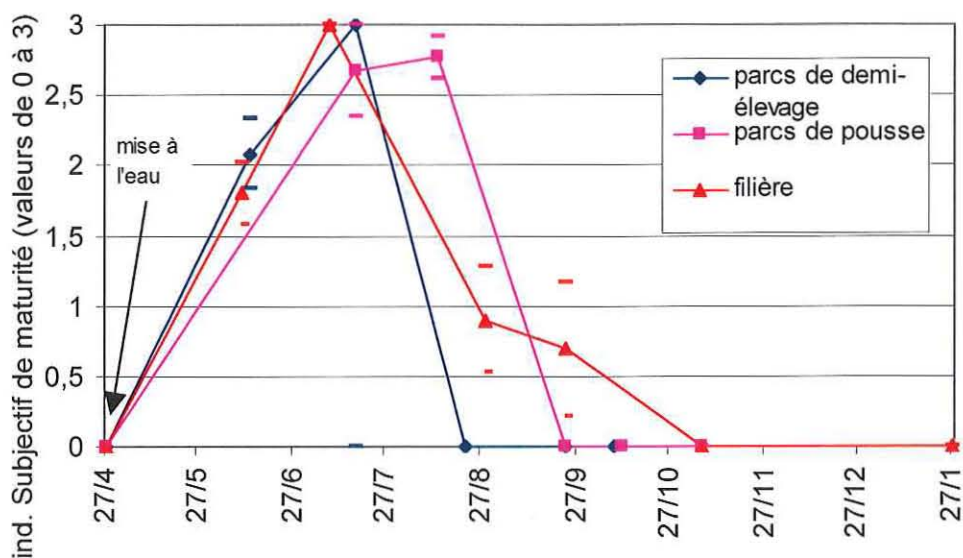
## Impact sur les rendements

Les rendements en fin d'élevage des huîtres triploïdes sur parcs atteignent les 45 kg pour 1000 huîtres mises à l'eau alors qu'ils ne dépassent pas les 30 kg pour leurs témoins diploïdes. Lorsque l'on recourt à la filière pour le prégressissement en 1<sup>ère</sup> année sur des cycles de production à 18 mois, il franchit les 80 kg et approche les 50 kg pour les huîtres diploïdes.



## Observation des conditions d'élevage

- une gamétogénèse relativement plus précoce et une résorption plus tardive que sur parcs (cf. figure 4). Les gonades sont bien développées à la mi-juin, hypertrophiées début juillet, stade de régression fin-août, résidus après ponte à la fin du mois de septembre et parfois en octobre
- fragilité lors des manipulations des huîtres de filière retournées à terre lors des périodes estivales chaudes. Travail sur le bateau obligatoire. Solidité en dehors de ces périodes due notamment à l'existence d'un muscle adducteur de très grande dimension
- acquisition de chair jusqu'à la fin de novembre puis baisse de décembre à mars. Reprise à la fin de mars ou début d'avril



Figures 4 et 5 : exemple de suivi de la chair d'un lot d'huître âgé de 18 mois sur la filière et sur deux types de parcs avec l'indice de maturité en haut (valeurs de 0 à 3) et Indice de Qualité de la norme en bas et représentation des intervalles de confiance

Au total, qualité et quantité de produit ainsi que raccourcissement des cycles permettent d'envisager un fort impact économique mais aussi sociologique (modification des pratiques, création de nouveaux métiers ou d'entreprises spécialisées). L'application de cette technique devrait trouver un prolongement auprès des entreprises de Marennes-Oléron en 2005.

## **Bibliographie**

Synthèse filière (en cours). Parution prévue en mars 2005. D. Mille, CREAA

Présentation PWPT lors du séminaire Morest Caen 2004. D. Mille, CREAA

Le Réseau Estran du CREAA : Bilan de la saison ostréicole 2003 à Marennes-Oléron. D. Mille, CREAA, 12p. [http://perso.wanadoo.fr/creaa/doc/04\\_rapport\\_suivi\\_estran.pdf](http://perso.wanadoo.fr/creaa/doc/04_rapport_suivi_estran.pdf)

## Annexe 1 - Tableau récapitulatif des actions 2004

WP 1. Mise au point d'outils en	Tâche
Génétique	1.1
Physiologie	1.2
Immunologie	1.3
Pathologie	1.4
Ecotoxicologie	1.5
Ecologie côtière	1.6
Bilan indices de stress	1.7
WP 2. Caractérisation des mortalités estivales <i>in situ</i>	
Effet génétique	2.1
<i>Préparation de matériel biologique : sélection divergente SD04 mars, et SD04P (en phase) juillet (prévoir pour 2005)</i>	2.1.1
<i>Transmission du caractère en consanguinité et maintien du patrimoine</i>	2.1.2
<i>Triploïde RR et SS</i>	2.1.3
<i>Comparaison "R" et "S" au niveau de marqueurs génétiques (Effets sélectif sur le locus PGM...)</i>	2.1.4
<i>Fin BERAY : maintien des performances des familles "R" et "S" au cours du second été en BDV</i>	2.1.5
Etude inter-disciplinaire <i>in situ</i> des mortalités "R" et "S" versus triplos	2.2
Suite et Bilans	
<i>NIRVANA : synthèse caractérisation des mortalités</i>	2.2.1
<i>BERAY – Suite analyses et traitement de données repro juvéniles histo, sterols</i>	2.2.2
<i>DYNAMOR03 : Suite analyses et traitement de données</i>	2.2.3
<i>GEGEN II – Bilan impact des conditions environnementales hivernales sur la survie en seconde année</i>	2.2.4
Comparaison <i>intra site</i>	
<i>SUMO : suivi ciblé <i>intra site</i> des mortalités BDV (18 mois R et S SATMAR?)</i>	2.2.5
<i>FORMER04 : Comparaison dynamique de mortalité <i>intra site</i> baie de Quiberon/Auray (naissain, 18 mois?)</i>	2.2.6
Rôle du sédiment : suivi pluridisciplinaire des interactions hôte-pathogènes Sédiment	
<i>DYNAMAURAY suivi intensif pluridisciplinaire</i>	2.2.7
<i>DYNAMOR04 suivi léger liens avec 6.2.4 à 6.2.6</i>	2.2.8
<i>DYNAMBDV suivi léger (calage H2S/NH4)</i>	2.2.9
Sites de captage	
<i>ARCACHON : suivi ciblé <i>intra site</i> de la maturation/Ponte "R" &amp; "S"</i>	2.2.10
<i>CANARD (Captage Naturel Arcachon Différencié) : Arcachon, testage LCB</i>	2.2.11
<i>CANARDMAR (Canard à Marennes) testage CREAA</i>	2.2.12
WP3. Expérimentations phase I. R et S reproduction expérimentale des mortalités	
Suite d'opérations 03	
GIGAREPRO 03 : suite analyses d'expression "R" et "S" (métab. énergétique, enzymes digestives)	3.1
Energétique et température : définition des conditions limites	3.2
Juvéniles	
<i>GIGAREPRO 04 Juvéniles captage naturel : demande énergétique repro et température puis suite SD04P</i>	3.2.1
Adultes	
<i>VALI (123) demande énergétique aux conditions limites ("R" et "S" 18 mois, Origines MO et BDV)</i>	3.2.2
- VALI1 : sans ou avec stress, sans pathogène (antibio)	
- VALI2 : avec ou sans stress, infection "naturelle" (Bouin) ?	
- VALI3 : avec infection bactéries après transport (La Tremblade), sans (Brest)	
Stress	3.3
<i>Pesticides particuliers (B. Gagnaire : Modèle patho/Stress)</i>	3.3.1
<i>Hypo/hyperoxie, H2S, NH3....</i>	
Comparaison R et S au niveau de l'expression de gènes	3.4
Approche gènes candidats	

<i>R. et S. gènes du métabolisme énergétique et dynamique de constitution des réserves à deux niveaux trophiques (R S 18)</i>	3.4.1
<i>Exploitation génomique de la banque SSH R/S et EST DRIM : effet température effet infection Cf Betonbloom</i>	3.4.2
Modèle d'infection	3.5
Juveniles	3.5.1
Betonbloom : Juveniles R S, 2 à 3 niveaux trophiques (nurserie) puis Raceways (La Tremblade) et suivi pluridisciplinaire de :	
- Conditions de l'expression du virus Herpes	
- Physiologie initiale, suivis microbiologie, immunologie, génomique	
Adultes	3.5.2
- Conditions de l'expression de la virulence : sédiment (température, thiosulfates, MO), hôte (héamol., appareil digestif,	
- Modèle d'infection bactérienne, définition des conditions de transmission	
<b>WP4. Tests expérimentaux et/ou in situ pour s'affranchir du problème des mortalités estivales</b>	
"Amélioration" génétique	4.1
<i>Conception d'un dispositif et plan de sélection</i>	4.1.1
<i>Tetraploïdes "R" et "S".....;voir 2.1.3</i>	
Réduction des mortalités de juvéniles	4.2
Captage naturel prévenir l'un des effets : sédiments, reproduction (génétique, température, trophique)	
<i>Purge morbidité : caractérisation précoce captage naturel (Ecloserie/ Captage naturel ?)</i>	4.2.1
<i>Prévenir les pertes en 1<sup>ère</sup> année : élevage (filière, écosys. froid, réd. ressource trophique (coefficient, milieu pauvre)</i>	4.2.2
<i>Effet densité en poche, gaméto et survie</i>	4.2.3
<i>Ecloserie-nurserie :</i>	4.2.4
- <i>Nurserie milieu moins riche (voir Betonbloom)</i>	
- <i>Date de naissance et date de reproduction</i>	
- <i>Endurcissement des S et/ou Captage Naturel</i>	
Réduction des mortalités d'adultes	4.3
<i>Réflexion naissain BDV vers MO ou Auray en 2<sup>ème</sup> année</i>	4.3.1
<i>Réflexion 18 mois MO ou Auray vers BDV post ponte en 2<sup>ème</sup> année</i>	
<i>Réduire la période critique pré-ponte : provoquer la ponte des huîtres en baie des Veys</i>	4.3.2
<i>Réduire l'intensité de reproduction pendant la phase critique :</i>	4.3.3
- <i>Transferts de lots entre Baie des Veys et côte ouest</i>	
- <i>baie des Veys Réflexion effet coefficient (remontée printemps) sur la survie, récupération de croissance</i>	
<i>Réduire les intrans des rivières (couvert végétal)</i>	4.4
<i>Alerte à partir des pluies d'automne et des courbes thermiques</i>	4.5
<b>WP5. Synergies REPAMO – MOREST - REMORA</b>	
Recenser et analyser les épisodes de mortalité, isoler des pathogènes	5.1
<i>Mortalités déclarées chez les professionnels</i>	5.1.1
<i>Mortalités intervenues dans le cadre de Morest</i>	5.1.2
<i>REMORA</i>	5.1.3
Epidémiologie des pratiques culturelles	5.2
<b>WP6. Caractérisation de l'environnement</b>	
Recensement de données physiologies associées à différents sites	
Etat des apports anthropiques des bassins versants sur les 3 sites	6.1
<i>Estimation des débits et des flux des bassins versants :..... (voir 2.2.1) 2 sites Marennes-Auray, relations flux et mortalités voir WP22</i>	
<i>Complément débits, MO et pesticides particulières issus des bassins Versants en baie des Veys</i>	6.1.1
Acquisition de données	6.2
<i>Herbicides sédiment ou/et particulaire comparatif eau</i>	6.2.1
<i>Analyse fine de la variabilité spatiale et temporelle</i>	6.2.2
<i>Caractériser la production primaire en baie des Veys, Marennes ?, (Phyto/phytobenthos</i>	6.2.3
<i>Obtenir de la mesure en continu sur le site ostréicole BDV</i>	6.2.4
<i>Compléter l'étude de la chimie sédimentaire (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9)</i>	
<i>Toxicité sédiment (et eau sub-surface) (voir 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9</i>	

<i>Biodépôts baie des Veys</i>	6.2.5
<i>Biocenose baie des Veys</i>	6.2.6
<b>Modélisation</b>	6.3
<i>Simulation, validation et analyse de la variabilité spatio-temporelle</i>	6.3.1
<i>Groupe de travail pour le développement d'un modèle d'allocation énergie (Thèse pour 2005)</i>	6.3.2
<i>Première mise en place d'un modèle de production primaire, puis-effort Reproduction (Thèse pour 2005)</i>	6.3.3
<b>WP7. Gestion de données, information et communication</b>	
Gestion des données	7.1
Information, communication et partage	7.2
<b>WP8. Gestion et organisation du projet</b>	
Coordination	8.1
Gestion financière du projet	8.2
Bilan, programmation, rapports et publications	8.3
Evaluation	8.4

## **Annexe 2 – Adresses des laboratoires**

Laboratoire Environnement Ressources de Normandie - L.E.R.N. (anciennement le LCN)  
Station Ifremer de Port-en-Bessin  
Avenue du Général de Gaulle  
BP 32  
14520 – PORT-EN- BESSIN

Université de Caen -Laboratoire Biologie et Biotechnologies Marines  
UMR/PE2M  
14032 – CAEN Cédex

Ifremer - DRV/RA - Laboratoire UMR/PE2M  
BP 70  
29280 – PLOUZANE

Ifremer – Station Expérimentale d'Argenton – DRV/RA – Laboratoire UMR/PE2M  
Presqu'île du Vivier  
29840 – ARGENTON en LANDUNVEZ

Université de Bretagne (UBO) Institut Universitaire Européen de la Mer  
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR CNRS 6539)  
Technopôle Brest Iroise – Place Nicolas Copernic  
29280 – PLOUZANE

Université de Bretagne (UBO) Institut Universitaire Européen de la Mer  
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin  
Technopôle Brest Iroise – Place Nicolas Copernic  
29280 – PLOUZANE

Museum National d'Histoire Naturelle - Station de Biologie marine  
BP 225  
29182 – CONCARNEAU

Ifremer – DRV/RA - Laboratoire Conchylicole de Bretagne (LCB)  
12, Rue des Résistants  
BP 86  
56470 – LA TRINITE-SUR-MER

Ifremer - Laboratoire d'Ecotoxicologie – DEL/PC  
Rue de l'Île d'Yeu  
BP 21105  
44311 – NANTES Cédex 03

Ifremer – DRV/RA – Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL)  
Polder des Champs  
85230 – BOUIN

Université de La Rochelle – Laboratoire Biologie et d'Environnement Marins (LBEM)  
Avenue Michel Crépeau  
17042 – LA ROCHELLE

Ifremer – CREMA – Marianne ALUNNO-BRUSCIA  
Station de la Rochelle – Place du Séminaire  
BP 5  
17137 – L'HOUMEAU

Ifremer – DRV/RA – Laboratoire Conchylicole Poitou-Charente (LCPC)  
Ronce les Bains  
17390 – LA TREMBLADE

Ifremer – DRV/RA – Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP)  
Ronce les Bains  
17390 – LA TREMBLADE

Ifremer Arcachon – Danièle MAURER  
Quai du Cdt Silhouette  
33120 – ARCACHON

Université de Montpellier 2 - Laboratoire DRIM-FRE 2626  
2, Place E. Bataillon – Case courrier 080  
34095 – MONTPELLIER Cédex 5

SYSAAF  
Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français  
Station Scribe – Campus Beaulieu  
35042 – RENNES

CREAA  
Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole  
Prise de Terdoux  
17380 – LE CHÂTEAU D'OLERON

SMEL  
Syndicat Mixte Equipement du Littoral  
Zone Conchylicole de Blainville  
50560 - BLAINVILLE-SUR-MER