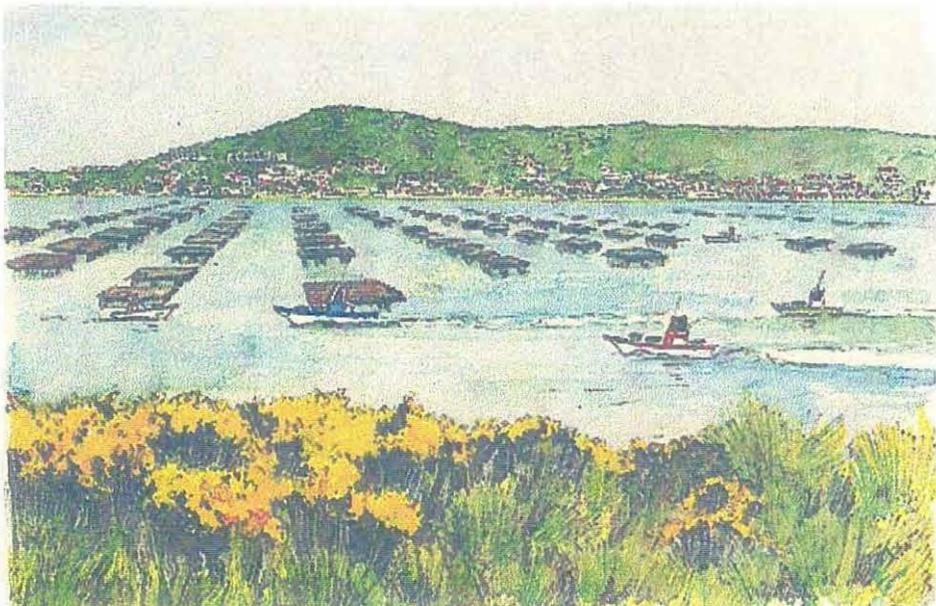


année 1996-1997

**Contribution
à
l'étude de la mortalité estivale
de *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*
dans le bassin de Thau**



Rapport de stage présenté par
Muriel ALEXANDRE
pour l'obtention du Master Européen
Aménagement et Gestion des Productions Aquatiques
(D.U. Chef de Projet et d'Exploitation en Aquaculture)

Responsable de laboratoire : Dominique BUESTEL

Resp

Laboratoire Co
Labo.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
INTRODUCTION	3
NAISSANCE D'UNE PROFESSION	7
L'ÉTANG DE THAU	9
1. Caractéristiques :	9
2. Fonctionnement d'une lagune :	10
2.1. Apports du bassin versant :	10
2.2. Marées :	11
2.3. Vents :	11
3. Conchyliculture :	11
3.1. Etat actuel :	11
3.2. Poids économique de la Conchyliculture :	13
SYSTÉMATIQUE ET ANATOMIE	15
1. Systématique :	15
2. Anatomie de l'huître :	16
2.1. Appareil digestif :	16
2.2. Système circulatoire :	16
PRÉSENTATION DES DIVERSES CAUSES DE MORTALITÉ SUBIE PAR LES COQUILLAGES DU BASSIN DE THAU	21
1. Causes de mortalité des coquillages	21
1.1. Malaïgues :	22
1.2. Agents infectieux :	24
1.2.1. Métazoaires :	24
1.2.2. Virus :	24
1.2.3. Procaryotes :	24
1.2.4. Les protozoaires :	25
2. Parasitoses des coquillages de l'étang :	26
2.1. Crassostrea gigas :	26
2.2. Ostrea edulis :	27
2.3. Mytilus galloprovincialis :	27
2.4. Ruditapes decussatus :	27
3. Réseau Pathologie des mollusques : REPAMO	30

LES PATHOLOGIES ÉTUDIÉES _____ 32

1. Virus :	32
1.1. Description de l'herpès-like virus :	32
1.2. Réplication de l'herpès-like virus :	33
1.3. Effets histopathologiques :	33
1.4. Différentes phases de l'Herpès-like virus :	34
1.5. Transmission de l'Herpès-like virus :	35
2. Protozoaires :	35
2.1. MARTEILIA REFRINGENS :	36
2.1.1. Systématique :	36
2.1.2. Morphologie du parasite:	36
2.1.3. Formes de sporulation :	36
2.1.4. Cycle de développement annuel :	38
2.1.5. Effets pathogènes du parasite :	38
2.2. BONAMIA OSTREAE :	39
2.2.1. Systématique :	39
2.2.2. Morphologie du parasite :	39
2.2.3. Cycle de développement :	40

L'ÉTUDE DES MORTALITÉS _____ 44

1. Suivi des mortalités estivales chez Crassostrea gigas :	44
1.1. Matériel et méthodes :	44
1.2. Les résultats :	46
1.3. Conclusion :	53
2. Etude des mortalités estivales chez Ostrea edulis :	54
2.1. Méthodes de diagnostic :	55
2.2. Résultats du suivi :	56
2.2.1. Expériences menées en 1996 : Programme huîtres plates 95/96.	56
2.2.3. Point sur la situation en 1997 :	57
2.3. Autres mortalités constatées :	62
2.3.1. Les méthodes histologiques :	62
2.3.1.1. Inclusion à la paraffine :	62
2.3.1.2. Préparation des coupes :	63
2.3.1.3. Coloration des coupes :	63
2.3.2. Résultats des examens :	64

DISCUSSION-CONCLUSION _____ 66

BIBLIOGRAPHIE _____ 69

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire conchylicole de Méditerranée de la station Ifremer de Palavas les Flots.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Dominique Buestel pour avoir bien voulu m'accueillir au sein du laboratoire conchylicole de Méditerranée et pour tous les conseils qu'il m'a prodigués.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Yves Pichot qui a accepté la lourde tâche d'être le responsable de ce stage et qui a eu beaucoup de patience pour suivre ces travaux .

je voudrais remercier particulièrement :

- * Madame Catherine Vercelli pour ses conseils éclairés et son oreille attentive,
- * Mademoiselle Joceline Oheix et Monsieur Jean-Michel Chabirand pour les renseignements qu'ils ont pu me fournir,
- * Monsieur Michel Comps pour son aide en pathologie des mollusques,
- * Monsieur Claude Delsert qui a pris un peu de son temps pour éclairer les points obscurs de la PCR,
- * Monsieur Charles de la Pomélie qui m'a gentiment fourni les données concernant le poids économique de la conchyliculture.

Un grand merci encore à toute l'équipe de la station IFREMER de Palavas, qui m'a supporté durant ces trois mois, pour leur accueil et leur sympathie.

A Marjorie qui a bien voulu dessiner les schémas d'anatomie des huîtres,

A Michèle et Anne qui ont pris un peu de leur temps et beaucoup de leur patience pour m'aider à corriger ce texte.

*Il était une fois...
les coquillages !!!*

Introduction

La production aquacole mondiale est aujourd'hui dominée par un continent : l'Asie qui totalise 80% de la production. L'Europe arrive en seconde position avec 9% de la production (un peu plus de 1 million de tonnes en 1991) largement en tête devant les Etats-Unis et la Russie (Données FAO 1991).

Les mollusques représentent 18.7% de la production aquacole mondiale, qui se répartissent entre : les moules (35%), les huîtres (29%), les palourdes (19%) et la coquille Saint-Jacques (11%).

La France, premier producteur européen pour l'ostréiculture, arrive en troisième position mondiale, derrière le Japon et la Corée, avec environ 150.000 tonnes d'huîtres produites chaque année et en cinquième position mondiale, derrière la Chine, l'Espagne, l'Italie et la Thaïlande pour la mytiliculture avec 62.000 tonnes produites chaque année (Données FAO 1991). Deux centres se partagent la production française conchylicole : la côte atlantique et la côte méditerranéenne.

La Méditerranée française comporte cinq centres conchylicoles : la Corse (étangs de Diana et d'Urbino), la rade de Toulon, le golfe de Fos, l'étang de Salses-Leucate et l'étang de Thau qui est le principal centre méditerranéen avec environ 25.000 tonnes de coquillages produits par an (mer et étang) soit environ 10% de la production française.

La conchyliculture languedocienne est une activité ancienne et la première activité aquacole de la région. Ainsi, elle est la deuxième force économique de l'Hérault derrière la viticulture.

Largement privilégié par un milieu fortement propice aux activités conchylicoles tant par la qualité des eaux, que par le climat et la géographie côtière, l'étang de Thau a également bénéficié pour le développement de la conchyliculture d'un savoir faire transmis de génération en génération, d'un bon encadrement par des organismes de recherche et d'un soutien des pouvoirs publics locaux (Cofrepêche, 1992).

Mais ce développement n'est pas sans rencontrer quelques problèmes. Sur le plan économique, d'abord, les conchyliculteurs se trouvent aujourd'hui confrontés à une baisse significative des prix de la production qui peut s'expliquer par l'augmentation et l'homogénéisation de la production mais surtout par la course au rendement et la saturation du marché local.

Sur le plan technique, ensuite, les conchyliculteurs doivent s'approvisionner en naissain auprès des centres d'Atlantique, le captage naturel dans l'étang de Thau ne se réalisant pas ou peu. Ce qui entraîne une dépendance vis-à-vis des régions de Charente et de Bretagne mais peut également faire courir au cheptel de l'étang de Thau des risques de contamination par des maladies parasitaires.

Sur le plan biologique enfin, outre les problèmes liés à ceux que l'on pourrait qualifier d'inhérents au fonctionnement d'une lagune telle l'étang de Thau comme les toxicités algogènes et les malaïgues, la conchyliculture est de plus en plus soumise à des problèmes dus à la prolifération ou l'introduction d'espèces prédatrices comme les bigorneaux perceurs au cours de transferts de coquillages, ou bien d'ordre zoosanitaire.

Ainsi, des transferts de coquillages originaires de Bretagne vers l'étang de Thau ont pu être à l'origine de l'introduction de maladies parasitaires comme la Martéiliose et la Bonamiose, qui ont fait considérablement chuter la production d'huître plate *Ostrea edulis*, entraînant par là une situation de quasi monoélevage pour l'huître creuse *Crassostrea gigas*. De plus, depuis quelques années, le naissain d'huîtres creuses est touché par des mortalités importantes susceptibles d'être causées par un virus rattaché aux Herpesviridae.

La contamination par des maladies parasitaires peut induire de graves épizooties. Ainsi en France, les populations d'huîtres creuses *Crassostrea angulata* ont été entièrement décimées par un iridovirus dans les années 70. Celles d'huîtres plates *Ostrea edulis* d'Atlantique ont pratiquement disparues sous l'effet de parasitose à *Marteilia refringens* au début des années 70 puis à *Bonamia ostreae* vers la fin de la même décennie.

Si l'étang de Thau comme la Méditerranée en général reste un site privilégié, car sa situation zoosanitaire est bonne par rapport aux autres centres de production, les risques et les problèmes pathologiques y existent.

Dans ce cadre, une cellule du Réseau Pathologie des Mollusques (REPAMO) de l'IFREMER effectue, en particulier, un suivi général de l'état zoosanitaire de l'étang, un contrôle des transferts effectués et l'étude des mortalités qui peuvent survenir sur toute espèce de mollusques présente dans le bassin et en particulier l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'huître plate *Ostrea edulis*.

C'est au sein de cette cellule du laboratoire conchylicole de Méditerranée de Palavas-les flots que mon stage a été effectué et dans ce contexte que ce rapport a été établi.

Après avoir présenté l'Étang de Thau et abordé l'importance économique de la conchyliculture sur ce site, un premier axe du rapport est constitué par l'inventaire des principaux agents pathogènes connus chez les mollusques bivalves et en particulier chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'huître plate *Ostrea edulis*. L'état des connaissances sur l'herpès-like virus associé aux mortalités de *C. gigas* et sur *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* responsable de mortalités sur *Ostrea edulis* est résumé.

La mise en œuvre des méthodes d'analyse et les résultats des recherches effectuées sur les mortalités estivales de 1997 de l'huître creuse et de l'huître plate de l'étang de Thau liées à l'infection virale et aux deux protozoaires constituent le travail personnel réalisé durant mon stage au laboratoire de Palavas.

Dans une première partie, les méthodes de détection de l'herpès-like virus seront présentées ainsi que les résultats obtenus. Diverses analyses ont été effectuées afin de pouvoir déterminer les facteurs susceptibles d'influencer le développement de ce virus et causer les mortalités.

Une seconde partie sera constituée par la présentation des techniques de détection de *Bonamia* et de *Marteilia* ainsi que les résultats du suivi du programme Huîtres plates 1997.

Ce travail permet donc de mieux appréhender les problèmes dont est victime l'étang de Thau et ses coquillages et de mesurer l'impact sur la région que pourraient avoir les maladies infectieuses si rien n'est fait pour les combattre. De nombreux travaux sont toutefois en cours afin d'apporter une solution, mais le caractère particulier des mollusques bivalves marins en matière de défense immunitaire rend leur protection difficile. En dernier point, les moyens qui sont à notre disposition pour lutter efficacement contre les diverses parasitoses que nous connaissons seront présentés.

LA CONCHYLICULTURE

Naissance d'une profession

Depuis l'époque reculée de l'Antiquité, où déjà l'élevage des huîtres se pratiquait selon la technique des bains suspendus (Plin in Fauvel), sur les rives du lac Fusario près du lac Lucrin (Coste, 1861 in Fauvel) en Italie - à nos jours, l'Huître a toujours été fort appréciée. Déjà, du temps des gallo-romains, l'étang de Thau «Taurus palus» semblait prédisposé, grâce à ses larges ouvertures sur la mer permettant un volume d'échange d'eau suffisant, au développement et par la suite, à la culture des Huîtres.

Cependant, avant 1900, l'huître¹, dans le bassin de Thau, ne faisait l'objet que d'une pêche d'amateurs. C'est à M. COSTE, Inspecteur général des Pêches à partir de 1858 que l'on doit le développement de l'ostréiculture.

En effet, de son « voyage d'exploration sur le littoral de la France et de l'Italie », il ramène les techniques d'élevage utilisées dans l'antiquité et obtient une concession sur l'étang de Thau afin d'expérimenter le repeuplement des bancs d'huîtres du littoral français. (Fauvel, 1986). Toutefois, les essais d'ensemencement furent considérés comme un échec pour moult raisons.

Il faut attendre le début des années 1900 pour voir renaître un intérêt pour les huîtres dans l'étang de Thau en raison d'un captage naturel qui se produisit de façon inattendue. On parla alors de miracle et d'enchantement. C'est ainsi qu'un arcachonnais prénommé Gatien LAFITTE mit au point une technique d'élevage des huîtres dans les canaux de Cette². Cette exploitation dura de 1880 à 1907, année où elle fut arrêtée pour raison sanitaire (Fauvel, 1985) dans les canaux de Cette mais put continuer, non sans rencontrer quelques difficultés, dans l'étang de Thau près de Bouzigues.

En effet, les demandes de concessions effectuées par Pierre LAFITTE³ et Pierre PAUL entraînèrent de vives réactions de la part des pêcheurs qui ne purent cependant pas en empêcher l'obtention.

Par la suite, Pierre LAFITTE céda ces concessions à Louis TUDESQ, artisan maçon et bouzigaud, en 1925. Celui-ci s'inspira des techniques d'élevage des moules⁴

¹ : Il s'agit d'*Ostrea edulis*, L.

² : Ancienne écriture de Sète.

³ : Fils de Gatien Lafitte.

⁴ : Utilisée par un de ses voisins.

pour créer la technique ostréicole que nous connaissons et qui est utilisée aujourd'hui (Giovannoni, 1987).

Enfin, nous savons que, malgré leur farouche opposition à l'implantation de l'ostréiculture, les pêcheurs de l'étang de Thau sont presque tous devenus ostréiculteurs et en furent fort satisfaits⁵.

C'est ainsi qu'est née la profession d'ostréiculteur. Depuis, l'élevage des huîtres et des moules se poursuit de façon immuable dans le bassin de Thau ...

⁵ : Remarque personnelle.

L'étang de Thau

1. Caractéristiques :

Le Languedoc Roussillon est formé d'une côte basse dont la particularité est de disposer de nombreuses lagunes. La plus importante d'entre elles est l'étang de Thau.

Cette lagune s'est formée à partir d'un fossé d'effondrement ; son origine tectonique explique sa profondeur importante.

Milieu sub-marin salé (salinité moyenne de 34 ‰) de 7500 ha, l'étang de Thau s'étend d'Agde à Frontignan sur une longueur de 19 km et sur une largeur moyenne de 4.5 km. Il est en fait constitué de deux étangs séparés par le détroit que forme la pointe du Barrou à Sète avec la pointe de Balaruc :

- **le grand étang :** il s'allonge vers l'Ouest sur 7000 ha environ,
- **l'étang des eaux blanches :** à l'Est, il fait environ 500 ha.

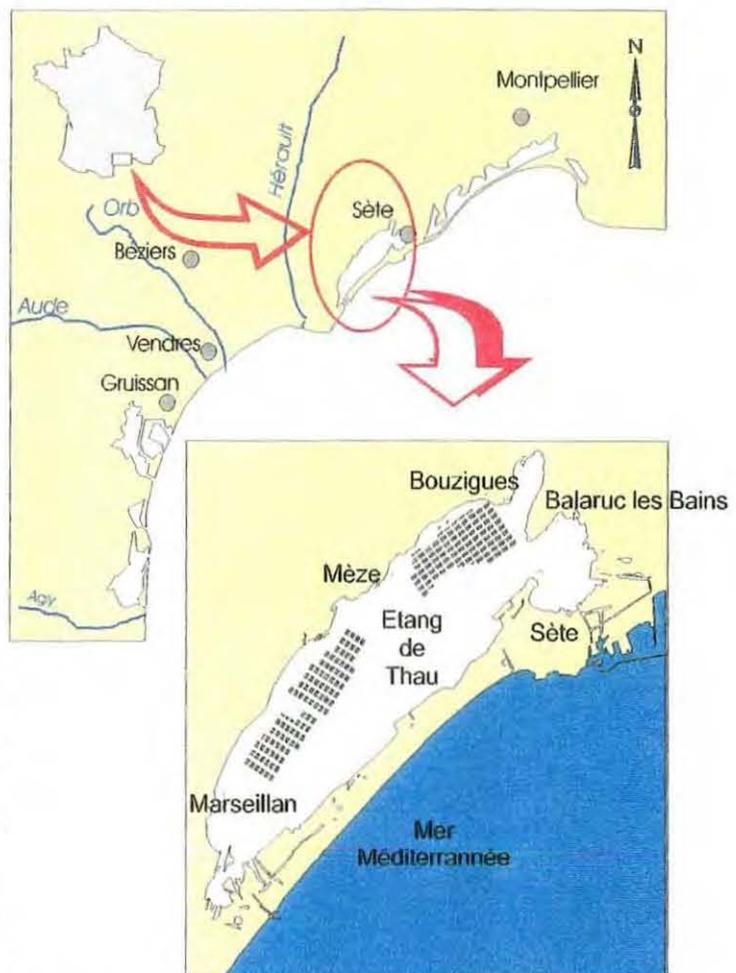


Figure 1: Situation géographique de l'étang de Thau.

L'étang communique avec la mer par l'intermédiaire du canal de la Bordigue à Sète et par le grau de Pissesaumes au sud vers Marseillan.

Ces ouvertures jouent un rôle économique, hydraulique, biologique et même sanitaire important dans la vie des lagunes. (Deslous-Paoli, 1994). La profondeur moyenne de

l'étang est de 4.5 m mais elle peut atteindre 10 à 12 m et le volume total du bassin est de $30 \cdot 10^8 \text{ m}^3$.

2. Fonctionnement d'une lagune :

Une lagune peut être schématisée comme suit :

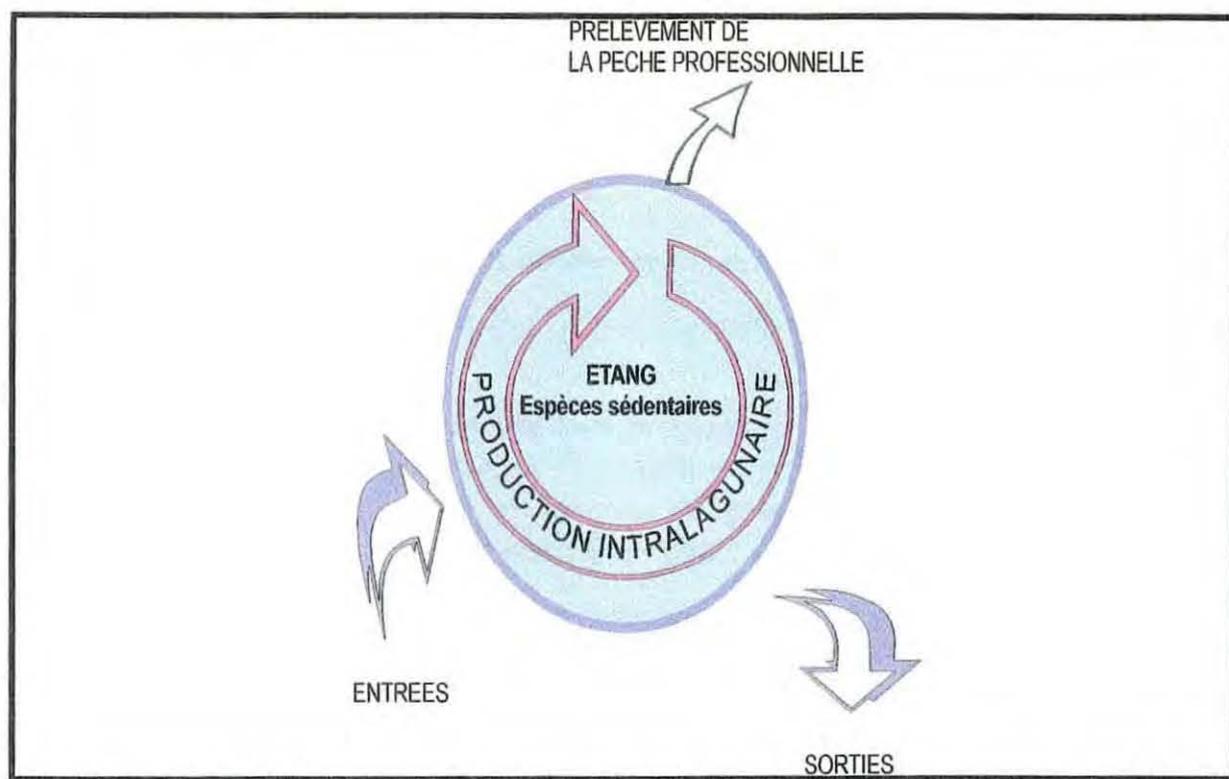


Figure 2 : Représentation schématique d'une lagune. (Quignard 1997)

C'est un lieu de confrontation des eaux douces venant du bassin versant et des eaux marines entrant par les graus. Ce milieu saumâtre présente un fonctionnement particulier.

2.1. Apports du bassin versant :

Les apports d'eau douce se font par le bassin versant qui représente 30.000 ha et de nombreux ruisseaux temporaires, les Fontanilles, le Soupié, le Mayroual, le Nègues vaques, l'Aygues vaques, le Pallas, le Joncas, la Lauze et la Veyne, le canal du Midi, le canal du Rhône à Sète. Il faut également signaler la présence d'une source subaquatique, la Bise qui débouche au nord de l'étang, au fond d'un gouffre de 30 m (Amanieu et al, 1989) Les eaux continentales douces se mélangent lentement aux eaux saumâtres : les eaux douces de densité plus faible restent en surface ; il en résulte un système de courant différent en surface et au fond.

2.2. Marées :

De faible amplitude, entre 1 et 30 cm, elles induisent des oscillations du niveau du bassin. On a pu mettre en évidence :

- une entrée d'eau par des graux et par percolation au travers du lido lors du flot,
- une sortie d'eau saumâtre lors du jusant.

Toutefois, la marée étant de faible amplitude, les échanges intéressent une surface limitée de la lagune et généralement les mêmes masses d'eau. La présence des graux est déterminante dans l'influence de la marée sur l'étang.

2.3. Vents :

Les vents ont une incidence sur le comportement des masses d'eau littorale :

- ils induisent dans les étangs peu profonds un brassage de toute la masse d'eau,
- ils favorisent les échanges entre la mer et l'étang quand un grau existe. Les vents de secteur nord (Tramontane et Mistral) entraînent une vidange des lagunes alors que les vents du sud provoquent l'entrée de la mer dans les étangs et donc une montée du niveau,
- ils contribuent également au refroidissement des eaux,
- ils jouent un rôle important lors de crises dystrophiques.

3. Conchyliculture :

3.1. Etat actuel :

En 1996, la surface octroyée à la conchyliculture est de 1300 ha soit un taux d'occupation de la surface totale du bassin de 17%. Cela permet d'exploiter 2816 tables - structures d'élevage en suspension - réparties en trois zones (fig. 3) :

- zone A : entre Bouzigues et Mèze, c'est une zone profonde et riche en phytoplancton et où la « pousse »[°] est importante.
- zone B : entre Mèze et Montpenède.
- zone C : entre Montpenède et Marseillan, c'est une zone peu profonde et moins riche en phytoplancton.

[°] : Nom local synonyme de croissance.

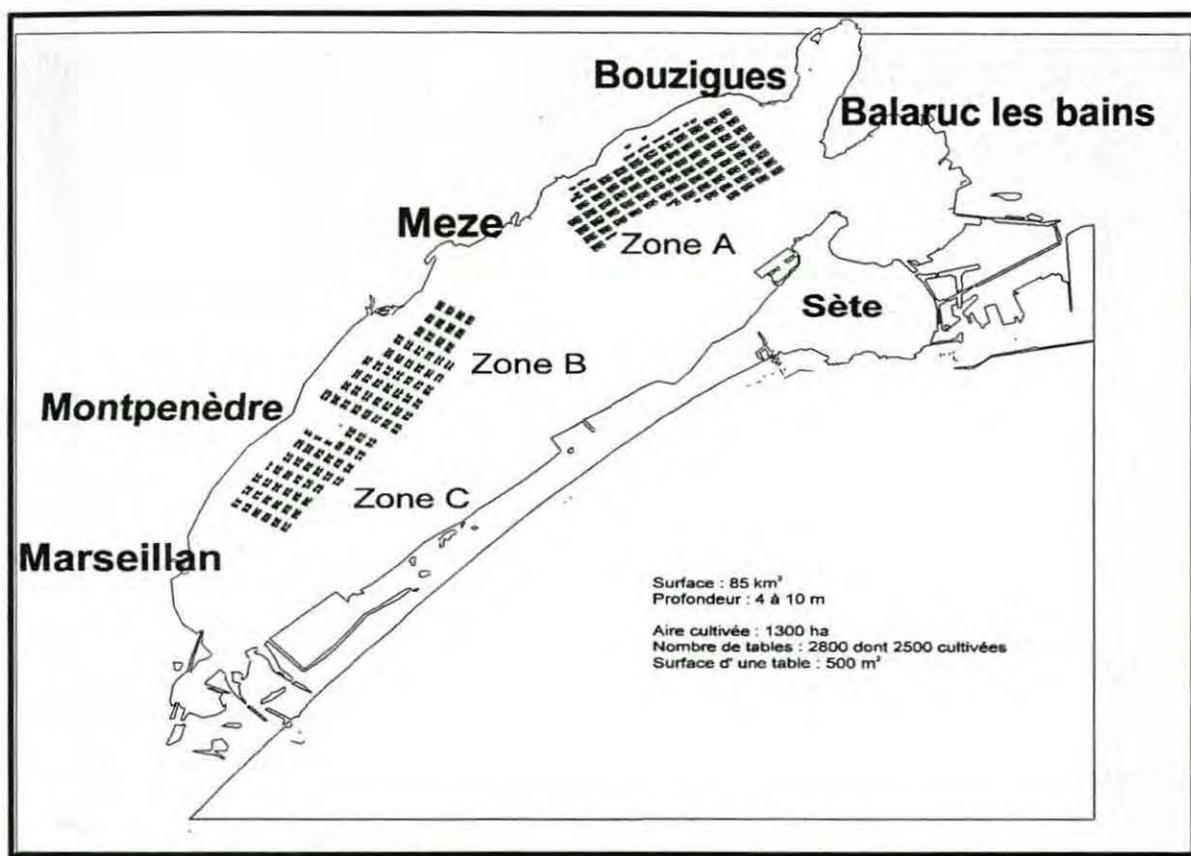


Figure 3 : L'étang de Thau et les zones ostréicoles.

Le nombre de concessionnaires s'élève à 950 dont 612 exploitants indépendants et 338 adhérents à la coopérative « Les 5 ports » qui se partagent 680 tables.

Les tables (fig.4 et 5) sont des structures formées de rails (33 rails) plantés dans le sédiment et dépassant la surface de l'eau d'environ 1.80 m. D'une largeur de 10 à 12 m et d'une longueur de 50 m, elles sont constituées de 20 « carrés » sur lesquels reposent des perches où seront attachées les cordes servant à l'élevage des coquillages.

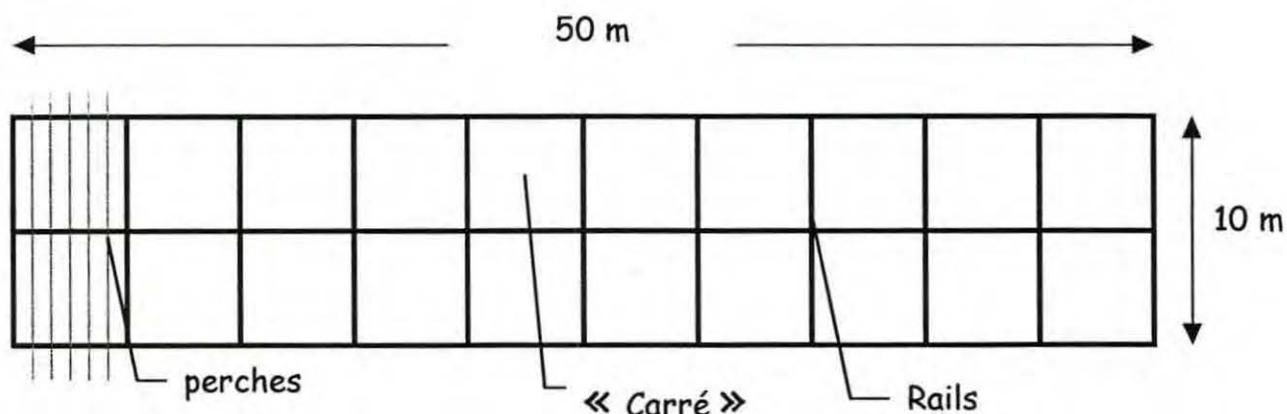


Figure 4 : Représentation schématique d'une table ostréicole, vue de haut.

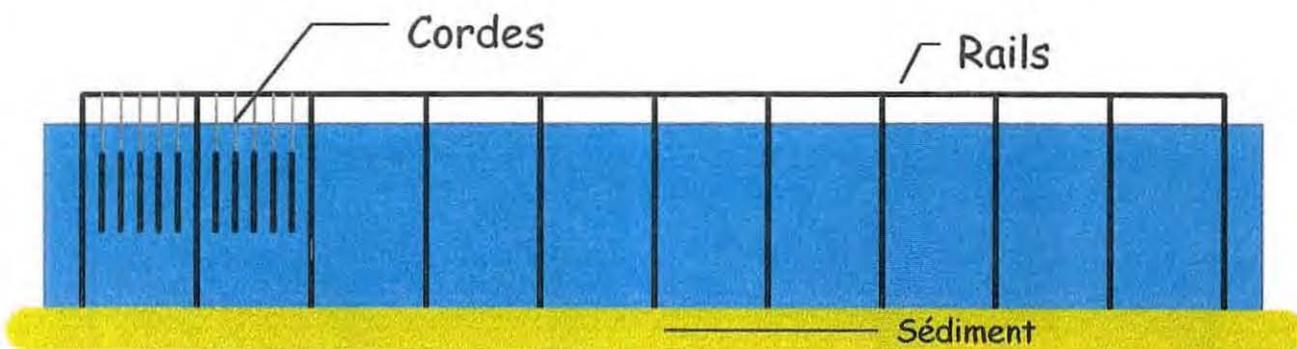


Figure 5 : Représentation schématique d'une table ostréicole, vue de côté.

3.2. Poids économique de la Conchyliculture :

En France, la conchyliculture représente un important secteur d'activité en créant des emplois directs et indirects tels la fabrication de bateaux, de moteurs et de matériel ostréicole divers. De plus, elle contribue au maintien du tissu social dans les communes littorales et permet également le développement des secteurs secondaires et tertiaires. Ainsi, outre son poids économique direct, la conchyliculture est une des activités qui garantit l'enracinement et le maintien des populations des communes littorales (Grizel, ?).

La production de coquillages en France provient à 85 % de l'élevage, le reste étant fourni par la pêche sur gisements naturels. C'est un marché qui représente environ 300 000 T réparties entre l'huître (40%), la moule (30%) et la coquille Saint - Jacques.

L'élevage des coquillages représente quant à lui environ 220 000 T pour un chiffre d'affaires de 2 062 MF. Il est marqué par une succession d'essors et de crises avec l'apparition et le développement d'épizooties et de parasitoses. Ainsi, la disparition de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* durant les années 70 a contribué par l'importation de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* à la relance du secteur conchylicole. L'huître creuse *Crassostrea gigas* est aujourd'hui l'espèce la plus élevée au détriment de l'huître plate *Ostrea edulis* et de la moule *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*.

A la suite de deux graves épizooties qui ont touché l'huître plate dans les années 70, les stocks ont quasiment disparu et l'élevage a été petit à petit pratiquement abandonné. On peut donc mesurer l'importance qu'ont eue ces maladies sur l'élevage de l'huître plate.

L'importation de l'huître japonaise à partir des années 70 a permis de relancer l'élevage. C'est l'espèce la plus cultivée dans le monde et il n'y a, à l'heure actuelle, que peu d'espèces susceptibles de la remplacer.

La conchyliculture, en 1991, pour la région Languedoc Roussillon représente environ 27 000 T, dont 11500 T pour les huîtres et 15 300 T pour les moules (mer + étang) soit 13 % de la production française. Cependant, les chiffres ne sont qu'approximatifs, car les professionnels n'ont pas une tendance naturelle à faire connaître leurs résultats malgré la déclaration obligatoire de production.

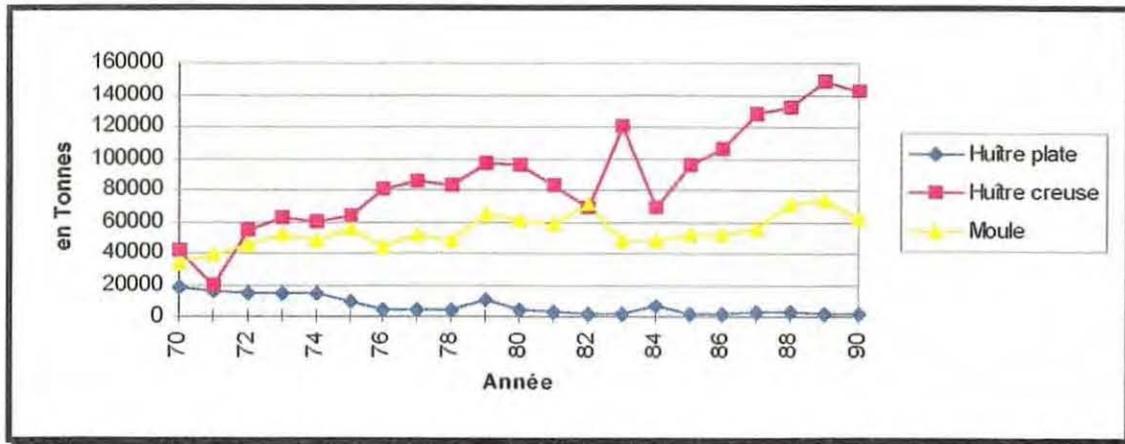


Figure 6 : production de la conchyliculture par espèces en France. Sources *Aff. Mar. in Coquillages*.

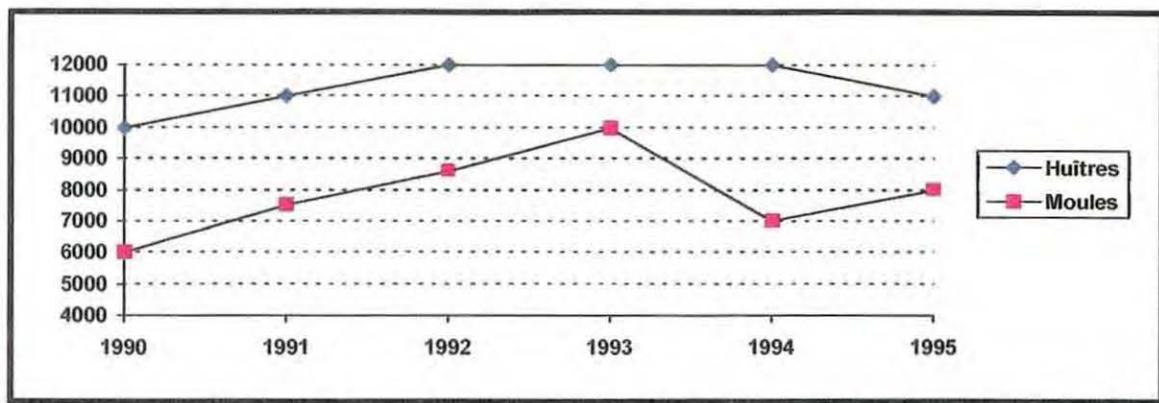


Figure 7 : Production d'huîtres et de moules en tonnes pour le bassin de Thau depuis 1990. Sources *Aff. Mar.*

La production du bassin de Thau représente environ 90 % de la production conchylicole méditerranéenne. L'emprise des cultures marines totalise 4122 ha répartis en 2754 ha de lotissement en mer et 1368 ha dans l'étang de Thau. Ceci correspond à 2042 établissements de pêche divisés en 612 concessionnaires, 557 en étang, le reste en mer. Il faut ensuite rajouter les adhérents de la coopérative des « Cinq ports » au nombre de 338 soit 950 exploitants.

Au total, la conchyliculture procure sur l'étang de Thau environ 3000 emplois directs, c'est-à-dire concessionnaires et ouvriers conchylicoles et plus de 8000 emplois indirects ce qui représente un tissu économique de premier ordre dans une zone particulièrement touchée par le chômage. En effet, si l'on essaie de mesurer la dépendance sociale vis-à-vis de la conchyliculture, on obtient les résultats suivants : (nombre d'emplois de la filière aquaculture en 90) / (population active en 90) = 7.45% pour la zone d'emploi de Sète. La dépendance sociale est donc très importante.

On peut donc aisément imaginer le poids économique représenté par la conchyliculture pour notre département et mesurer l'impact que pourrait avoir un problème pathologique sérieux sur l'une des productions de mollusques. C'est pourquoi, une connaissance des pathologies touchant les mollusques ayant un intérêt économique pour la région est indispensable. Cela permettra peut-être d'aboutir à des solutions afin de pallier aux risques de décimations éventuels de nos cheptels.

Systematique et anatomie

1. Systematique :

Les mollusques sont divisés en cinq classes : les *amphineures*, à caractères primitifs, les *gastéropodes* qui ont souvent une coquille spirale, les *scaphopodes* très peu nombreux, les *bivalves* (coquille à deux valves) appelés aussi Lamellibranches (branchies à lamelles) ou pélécy-podes (pied en fer de hache) et enfin les *céphalopodes*, hautement évolués tels les ammonoïdes, les poulpes, les seiches et les nautilés⁷.

Les espèces élevées dans le bassin de Thau font partie de la classe des lamellibranches et sont au nombre de trois :

- l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg),
- la moule *Mytilus galloprovincialis*,
- l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné) en petite quantité.

Ils font partie de la sous classe des *Filibranches*, super-ordre des *Dysodontes*, ordre des *Anysomiaires*.

La palourde *Ruditapes decussatus* fait l'objet d'un commerce mais n'est pas élevée dans le bassin. C'est une espèce à caractère endémique qui se reproduit de façon naturelle, dont on exploite les gisements. Elle fait partie de la sous classe des eulamellibranches, super-ordre des Hétérodontes.

L'huître creuse *Crassostrea gigas* a été importée dans les années 70 de Bretagne pour remplacer l'huître portugaise *Crassostrea angulata* décimée par une grave épizootie⁸. Le captage de cette espèce ne se réalise pas de façon satisfaisante pour subvenir aux besoins de la profession en raison de différents facteurs. Ainsi, l'approvisionnement en naissain se fait auprès des centres d'Atlantique, essentiellement Arcachon, Marennes Oléron et Bretagne pour les huîtres provenant de captage naturel et également auprès des écloséries de mollusques.

L'huître plate *Ostrea edulis* est l'espèce indigène du bassin de Thau. Les huîtres élevées proviennent du dragage des gisements naturels et de Bretagne. Mais les stocks ont tendance à s'amenuiser en partie à cause de parasitoses dont est victime cette espèce comme la Bonamiose et la Martéiliose mais également et surtout à cause de la surexploitation des gisements.

La moule *Mytilus galloprovincialis* provient également de captage naturel soit dans le bassin de Thau soit en mer.

⁷ : Définition du Larousse encyclopédique vol.10.

⁸ : Maladie des branchies.

Enfin, la palourde *Ruditapes decussatus* aussi appelée palourde européenne est également une espèce indigène mais elle est remplacée par la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dont la technique de reproduction est plus aisée et qui permet donc de réensemencer les gisements naturels plus rapidement et plus facilement. En effet, les gisements naturels de palourdes *Ruditapes Decussatus* sont largement exploités, mais font encore peu l'objet d'élevage contrôlé (des expériences d'élevage de la palourde sont en cours).

2. Anatomie de l'huître :

2.1. Appareil digestif :

L'appareil digestif des huîtres est constitué par un tube continu allant de la bouche à l'anus. Ce tube digestif présente près de l'entrée une région élargie en poche : l'estomac, le reste est formé par l'intestin qui se termine par l'anus près du muscle adducteur. L'estomac est entouré d'une masse brunâtre que l'on appelle masse digestive ou diverticules digestifs. C'est dans ces diverticules que l'on peut noter la plupart du temps la présence de *Marteilia* (fig. 10).

2.2. Système circulatoire :

L'huître possède un cœur des artères, des veines et de larges sinus. Le cœur est situé à côté du muscle adducteur. Il est enfermé dans la cavité péricardiale et on peut le voir battre lorsqu'en ouvrant l'huître on déchire le péricarde (fig. 11 et 12).

Le sang de l'huître est un liquide incolore appelé hémolymphe. Il est constitué d'hémocytes. On distingue deux types de cellules hémocytaires : les cellules agranuleuses et les cellules granuleuses. Les hémocytes assurent le système de défense cellulaire des mollusques grâce au mécanisme de phagocytose. Contrairement aux vertébrés, les mollusques ne possèdent pas de cellules spécialisées dans la défense immunitaire comme les lymphocytes.

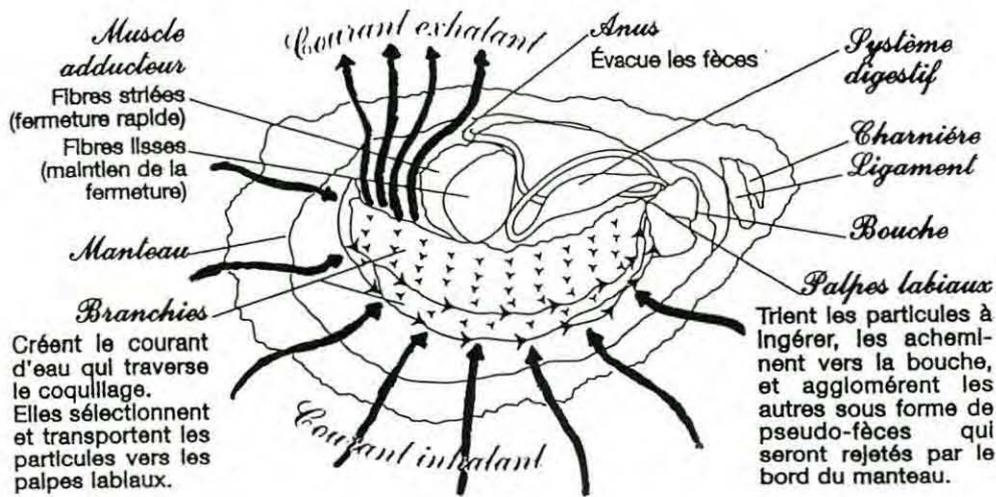
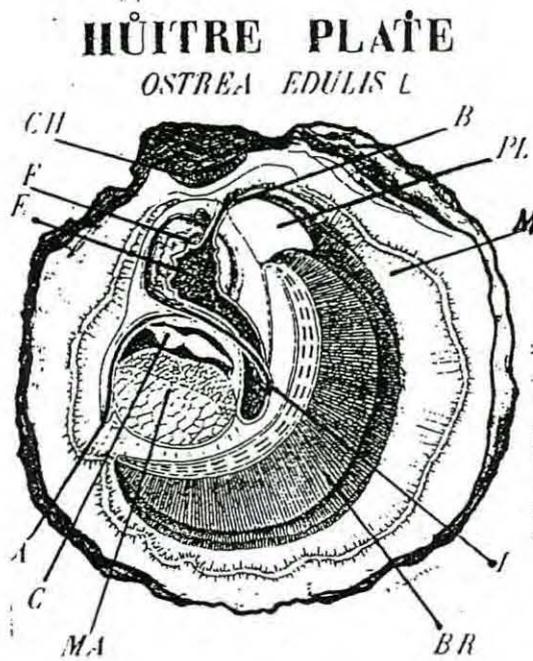


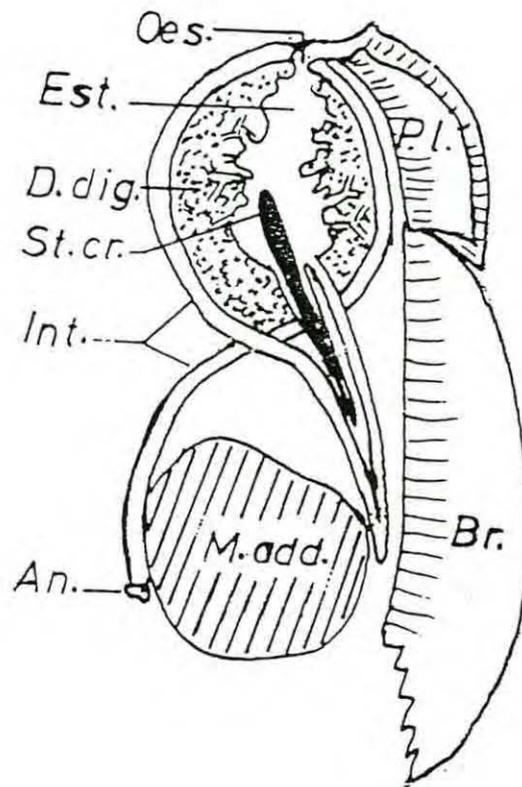
Figure 8 : planche anatomique de *Crassostrea gigas*.



Ch. : charnière ; *F.* : foie ; *E.* : estomac ; *A.* : anus ; *C.* : cœur ;
M.A. : muscle adducteur ; *B.* : bouche ; *PL.* : Palpes labiaux ;
M. : manteau ; *I.* : intestin ; *BR.* : branchies.

D'après Boudarel.

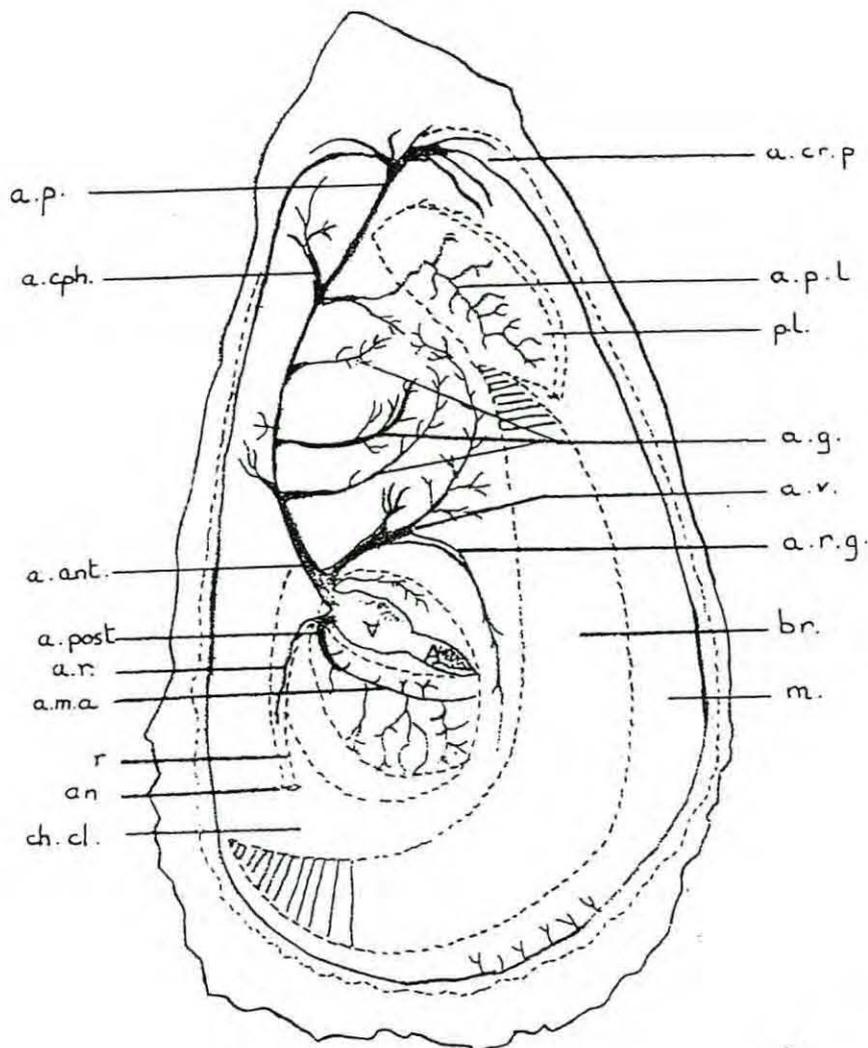
Figure 9 : Planche anatomique d'*Ostrea edulis*.



Br : branchie ; **P.l.** : palpes labiaux ; **Oes.** : Oesophage ; **Est.** : estomac ; **D. dig.** : diverticules digestifs ; **St. cr.** : Stylet cristallin ; **Int.** : intestin ; **M. ad.** : muscle adducteur ; **A.** : anus.

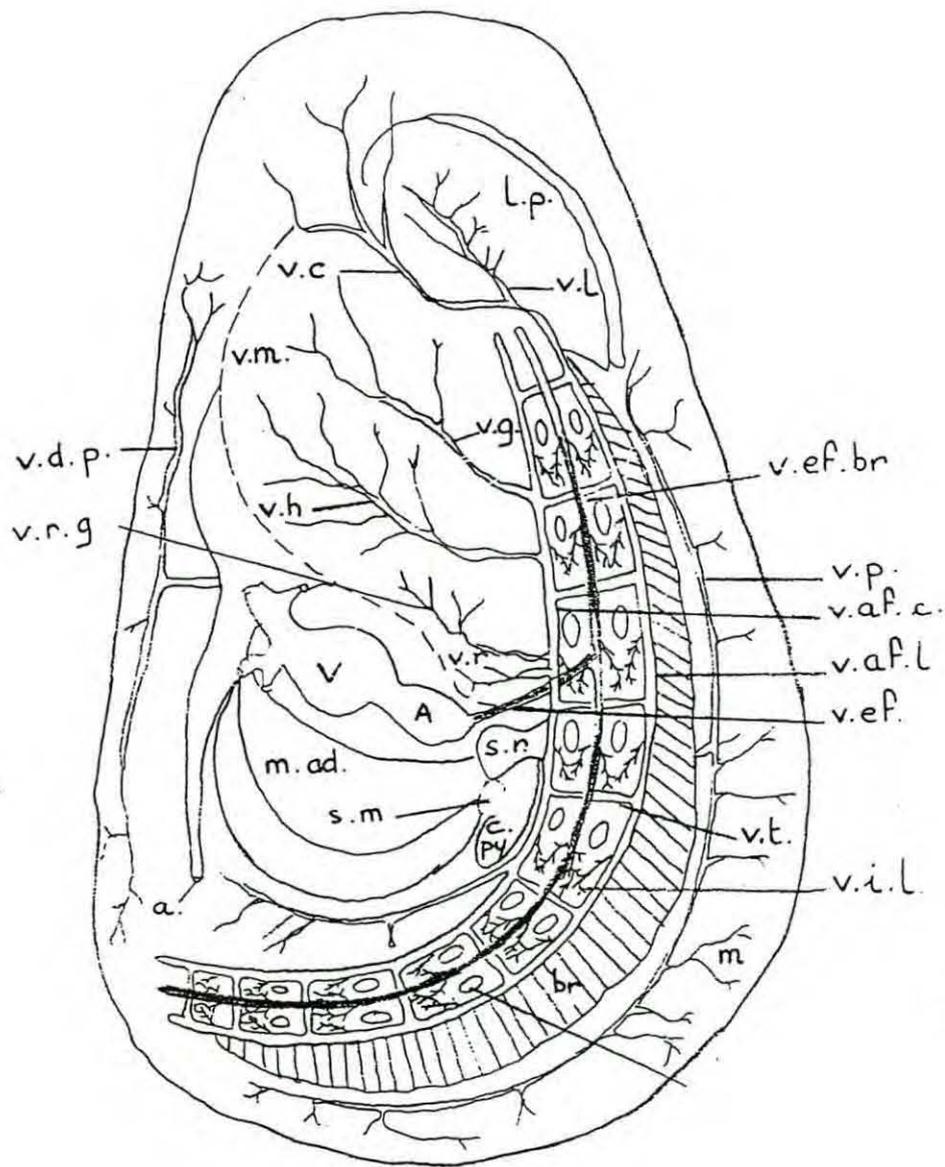
Inspiré de Gallstoff 1964.

Figure 10 : Schéma de l'appareil digestif d'une huître creuse.



A : auricule droit ; *a.ant* : aorte antérieure ; *a.cph* : artère céphalique ; *a.cr.p.* : artère circumpalléale ; *a.g.* : artères gastriques ; *a.m.a.* : artère du muscle adducteur ; *an.* : anus ; *a.p.* : artère palléale ; *a.pl.* : artère du palpe labial ; *a.post* : aorte postérieure ; *a.r.* : artère rectale ; *a.r.g.* : artère rénogonadale ; *a.v.* : artère viscérale ; *br.* : branchies ; *ch.cl.* : chambre cloacale ; *p.l.* : palpes labiaux ; *r.* : rectum ; *V* : ventricule.

Figure 11 : Système artériel de *Crassostrea virginica*.



A : auricule ; *a.* : anus ; *br* : branchies ; *c.py.* : caecum pylorique ; *l.p.* : palpes labiaux ; *m.* : manteau ; *m.ad.* : muscle adducteur ; *s.m.* : sinus du manteau ; *s.r.* : sinus rénal ; *v.af.c.* : veine afférente commune ; *v.af.l.* : veine afférente latérale ; *v.c.* : veine céphalique ; *v.d.p.* : veine dorsale postérieure ; *v.ef.* : veine efférente ; *v.ef.br.* : veines efférentes des branchies ; *v.g.* : veine gastrique ; *v.h.* : veine hépatique ; *v.i.l.* : veines intralamellaires des branchies ; *v.m.* : masse digestive ; *v.r.* : veine rénale ; *v.r.g.* : veines rénogonadales ; *v.t.* : veines transverses des branchies .

Figure 12 : Système veineux de *Crassostrea virginica*.

Présentation des diverses causes de mortalité subie par les coquillages du bassin de Thau

1. Causes de mortalité des coquillages

Il existe plusieurs causes de mortalité chez les coquillages, Très souvent, ces mortalités sont dues à l'association de plusieurs facteurs :

✕ liés au milieu :

- dessalure brutale ou prolongée,
- variations climatiques extrêmes,
- malaïgues provoquant une anoxie,
- manque de nourriture,

✕ biologiques :

- affaiblissement post hivernal ou dû à l'activité de reproduction,
- prédateurs : poissons, bigorneaux perceurs, étoiles de mer, crabes,...
- agents infectieux comme les virus, les métazoaires,
- parasitoses par des procaryotes (bactéries, rickettsies...),

✕ liés aux pratiques professionnelles :

- changement brutal de milieu lors d'un transfert,
- chocs thermiques,
- stress provoqué lors de dragage, pêche, détrocage, collage,...
- transfert d'animaux contagieux,

✕ liés aux activités humaines :

- pollution chimique accidentelle,
- pollutions dues aux activités urbaines, agricoles, industrielles,
- peintures anti-salissure à base de TBT.

Seuls les plus importants pour cette étude vont être développés, il s'agit de la malaïgue, des agents infectieux et des parasites.

1.1 Malaïgues :

Les malaïgues ou crises dystrophiques ont toujours été observées sur les lagunes méditerranéennes, elles interviennent généralement en période estivale.

Ce phénomène naturel sévit habituellement dans les lagunes peu profondes de la région, l'étang de Thau, la plus profonde, était avant 1975 très épisodiquement touché (Pichot, Juge et Guillou 1990). Ces « malaïgues » tendaient à se reproduire de plus en plus souvent, depuis 1975, les dernières étant survenues en 1982, 1983, 1987 et 1990, mais aujourd'hui, grâce à la mise en place de programmes tels le contrat de Baie et le schéma de mise en valeur de la mer et de sa façade maritime, les malaïgues ont nettement diminué. Ces crises dystrophiques ont pour conséquence de fortes mortalités tant sur les poissons que sur les élevages conchylicoles et toute la faune du bassin en général.

Bien que connaissant les conditions favorables au déclenchement de ces crises, essentiellement dues à l'absence prolongée de vent et à une forte demande en oxygène, il est quasiment impossible d'en prévoir le moment et le lieu précisément, même à court terme (Tournier, 1990).

Cette année 1997 en est encore la preuve. En effet, à la fin du mois d'août, une malaïgue s'est déclenchée en zone B de l'étang de Thau. Essentiellement due aux conditions météorologiques extrêmes du mois d'août, absence prolongée de vent, températures de l'eau élevées (jusqu'à 29.5 °C), la malaïgue s'est propagée à partir du bord de l'étang pour ensuite s'étendre à l'ensemble de la zone B. Environ 460 ha ont été touchés soit près de 850 tables, ce qui représente l'équivalent de 4000 T de coquillages (fig. 13).

▼ Les causes de la malaïgue :

Dans un étang en équilibre, la matière organique issue des apports continentaux et de la matière végétale morte est dégradée par des bactéries aérobies fortes consommatrices d'oxygène qui produisent des sels minéraux favorables au développement des végétaux (Quignard 1997).

Un milieu très riche en matière organique comme l'étang de Thau, en raison notamment de la présence des élevages ostréicoles, peut être en déséquilibre en période estivale surtout en l'absence d'un brassage des eaux par les vents.

L'étroite relation qui existe entre le vent et la réoxygénation des eaux a déjà été démontrée et a conduit à estimer qu'une vitesse moyenne journalière du vent inférieure à 5 m/s pendant une quinzaine de jours peut entraîner une « malaïgue » (Tournier, 1990).

La décomposition de la matière organique, abondante, nécessite l'enchaînement de plusieurs phénomènes biochimiques :

- Au printemps, la température et l'eutrophisation du milieu entraînent des blooms algaux,



Figure 13: vue aérienne de la malaïgue.

- dès le début de l'été, ces algues subissent de fortes mortalités,
- la matière organique dissoute ou particulaire s'accumule sur le fond déjà chargé,
- les bactéries aérobies entrent en jeu afin de dégrader toute cette matière, mais cela entraîne une forte consommation en oxygène,
- des conditions d'anaérobiose s'installent au niveau du sédiment, les bactéries anaérobies prennent le relais, il y a alors production d'hydrogène sulfuré, très toxique pour les animaux, qui envahit la masse d'eau,
- lorsque les conditions météorologiques restent défavorables, il y a anoxie totale et mortalité.

Le milieu prend alors une couleur « blanc laiteux ». L'arrêt de la « malaïgue » peut survenir à ce stade d'une manière plus ou moins rapide, à la faveur d'un coup de vent.

1.2. Agents infectieux :

1.2.1. Métazoaires :

Les trématodes appartenant aux métazoaires sont les parasites que l'on rencontre le plus souvent chez les mollusques bivalves. Ils entraînent des modifications physiologiques, biochimiques, morphologiques ou comportementales de leur hôte, mais en général, n'entraînent pas de mortalité (Lauckner, 1983 in Le Deuff) (planche 1, photo n°2).

On peut également rencontrer des parasitismes par des crustacés copépodes (genre *Mytilicola*). Ceux-ci peuvent entraîner des mortalités élevées en cas de parasitisme important (Davey et Gee, 1988 in Le Deuff) (planche 1, photo n°1).

1.2.2. Viroses :

Elles sont souvent mal connues en raison de l'inadéquation entre les techniques d'identification et les virus des coquillages.

Exemples de viroses :

- *Crassostrea virginica* infectée par un virus associé aux *Herpesviridae*.
- *Crassostrea angulata* infectée par un virus appartenant aux *Irodoviridae*.
- *Crassostrea gigas* infectée par OVVD (Oyster Velar Virus Disease) apparenté aux *Iridoviridae*.

1.2.3. Procaryotes :

Plusieurs groupes existent :

- Bactéries,
- Mycoplasmes,

- Rickettsies,
- Chlamydies.

Ce sont en général les bactéries Gram⁻ que l'on rencontre chez les mollusques bivalves. Elles appartiennent aux genres :

- ↳ *Vibrio*,
- ↳ *Aeromonas*,
- ↳ *Pseudomonas* (Lauckner, 1983 in Hervio).

Elles sont la plupart du temps associées à des mortalités larvaires massives. Mais deux bactéries ont été découvertes chez l'adulte :

- Un *Vibrio* est à l'origine de la « Maladie de l'anneau brun » chez *Tapes philippinarum*,
- Une bactérie du genre *Nocardia* infecte *C.gigas* aux Etats-Unis.

Les mycoplasmes sont encore mal connus du point de vue pathogénicité. Mais, on a pu relever deux cas :

- Chez *C.virginica*,
- Chez *Patinopecten yessoensis* en particulier dans les hémocytes.

Les chlamydies présentent un cycle caractéristique avec différents stades de différenciation.

Exemples :

- Chez *Mercenaria mercenaria*, elles provoquent des effets cytopathologiques au niveau des tubules digestifs, d'où une déficience de l'absorption, un amaigrissement et un affaiblissement des animaux (Meyers 1979 in Hervio),
- Chez *Argopecten irradians*, elles sont fortement pathogènes chez les larves de cette espèce (Leibovitz 1989 in Hervio).

Les rickettsies sont considérées comme inoffensives pour leur hôte, car lors des études réalisées à leur sujet, elles n'ont jamais été associées à des mortalités. Quelques cas de mortalité ont cependant été détectés chez des pectinidés infectés à un taux et un degré élevé en particulier chez *Pecten maximus* (coquille Saint-Jacques) (Le gall et al 1988 in Hervio) (planche 1, photo n°5).

1.2.4. Les protozoaires :

Les protozoaires sont facilement détectables et sont souvent, peut-être à tort associés à des mortalités dont ils ne sont pas responsables, car il faut tenir compte de la triple action environnement - animal - protozoaire.

On peut considérer plusieurs types de protozoaires :

- ↳ agents pathogènes opportunistes,

↳ agents potentiellement pathogènes.

Exemples :

- Les protozoaires du genre *Hexamita* sont le plus souvent considérés comme saprophytes, ils vivent sur l'hôte sans provoquer de maladies.
- Ceux apparentés aux *Amoebidae* font partie de la faune commensale des mollusques.
- L'ormeau juvénile est sensible à *Labyrinthuloides haliotidis* alors que l'animal adulte est résistant. Cependant un protozoaire du genre *Labyrinthula* associé à la maladie de Malpègue a décimé toute la population de *C. virginica* aux Etats-Unis. (Needler, 1941, Li, 1976 in Hervio).
- Le genre *Perkinsus* dont quatre espèces ont été décrites : *P. Marinus* chez *C. Virginia*, (Perkins 1976 in Hervio) *P. Olseni* chez *Haliotis ruber*, (Lester et Davis, 1981 in Hervio) *P. Atlanticus* chez *Tapes decussatus* (Comps et Chagot, 1981 in Hervio) et *P. karlssoni* chez *Argopecten irradians* (Mc Galddery et al, 1991 in Hervio).

2. Parasitoses des coquillages de l'étang :

Depuis déjà quelques années, les pathologies des mollusques font l'objet d'un suivi régulier par les laboratoires de l'Ifremer. Cette partie va permettre de dresser la carte des différentes parasitoses que l'on peut rencontrer chez les mollusques bivalves de la région :

- | | | | |
|-------------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|
| • l'huître creuse | <i>Crassostrea gigas</i> , | • la palourde | <i>Ruditapes decussatus</i> , |
| • l'huître plate | <i>Ostrea edulis</i> , | • la moule | <i>Mytilus galloprovincialis</i> . |

2.1. *Crassostrea gigas* :

L'huître actuellement la plus élevée dans le monde est touchée, en France, depuis 1991, par des mortalités. Un virus de type Herpès a été identifié et associé aux mortalités touchant les larves d'huîtres depuis 1994. La région Languedoc Roussillon n'échappe naturellement pas à ce phénomène. De plus, les transferts entre centres conchylicoles participent largement à la propagation du virus.

Malgré les nombreuses recherches qui ont lieu sur les infections virales, celles-ci restent encore mal connues. Nous ne possédons aucun moyen pour combattre l'infestation.

D'autres parasites affectent également l'huître creuse :

- | | |
|---------------|------------------|
| • Rickettsies | • Haplosporidies |
| • Perkinsus | • Marteilia |
| • Mikrocytos | |

2.2. *Ostrea edulis* :

L'huître plate est affectée par deux grandes parasitoses : la **Martéiliose** et la **Bonamiose**. Cependant, elles ne sont observées que de manière épisodique. Elles ont été signalées pour la première fois sur le bassin de Thau en 1987 sur des huîtres transférées de Bretagne.

On peut également observer des parasitoses dues aux parasites du genre *Haplosporidium* :

H. armoricanum

H. sp

ainsi que des Rickettsioses.

2.3. *Mytilus galloprovincialis* :

La moule n'est pas particulièrement sujette à des infections épizootiques. On peut parfois trouver des chlamydies, un genre de *Marteilia* - *Marteilia maurini* et un parasite appelé *Mytilicola intestinalis*.

2.4. *Ruditapes decussatus* :

La palourde *Ruditapes decussatus* qui est l'espèce autochtone du bassin n'a pas trop souffert de la maladie des anneaux bruns contrairement à sa « cousine » *Ruditapes philippinarum*. On peut aussi observer de façon épisodique des pathologies dues à *Perkinsus atlanticus* (planche 1, photo n°4), des chlamydies, des rickettsies et des parasites du genre *Haplosporidium* - *H. tapetis* (planche 1, photo n° 3).

Sources : Evolution des connaissances sur la pathologie des coquillages, P. Elzière Papayanni in Coquillages.

**Planche n°1 : photographies de quelques parasites de mollusques
bivalves marins**

Photo n°1 :

Trois spécimens de Mytilicola (☆) obstruant la lumière de l'intestin d'une moule.

Photo n°2 :

Sporocystes (☆) contenant des cercaires de trématode localisé dans le tissu conjonctif de la masse des diverticules digestifs d'une huître plate *Ostrea edulis*.

Photo n°3 :

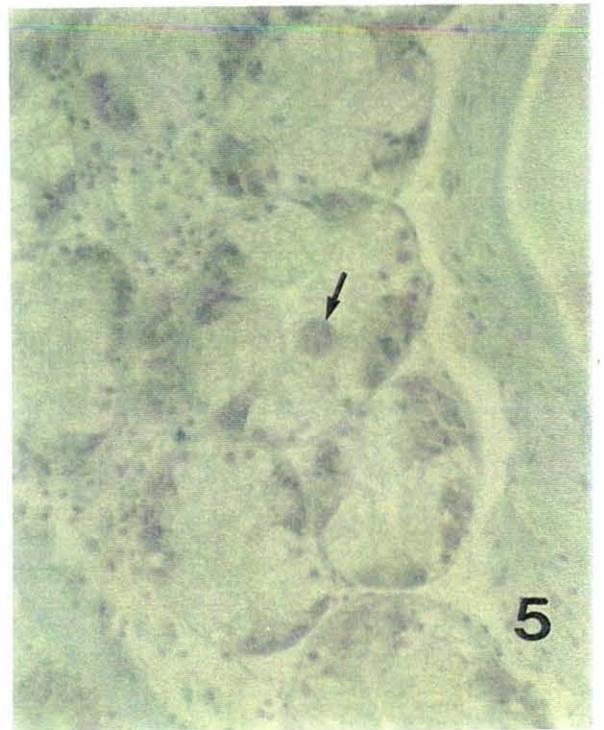
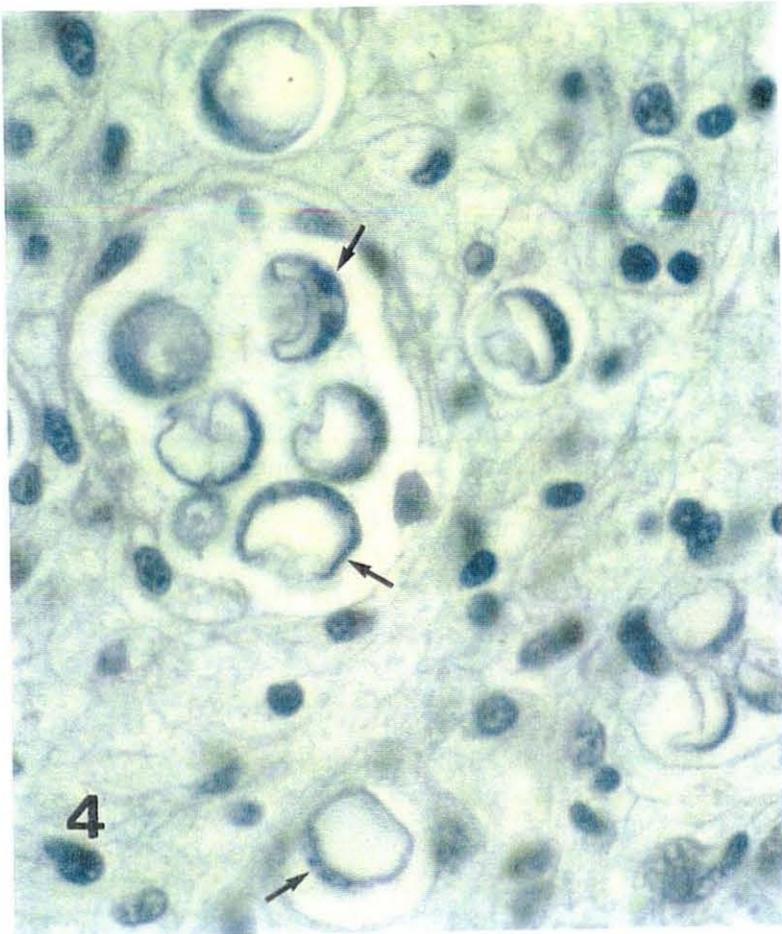
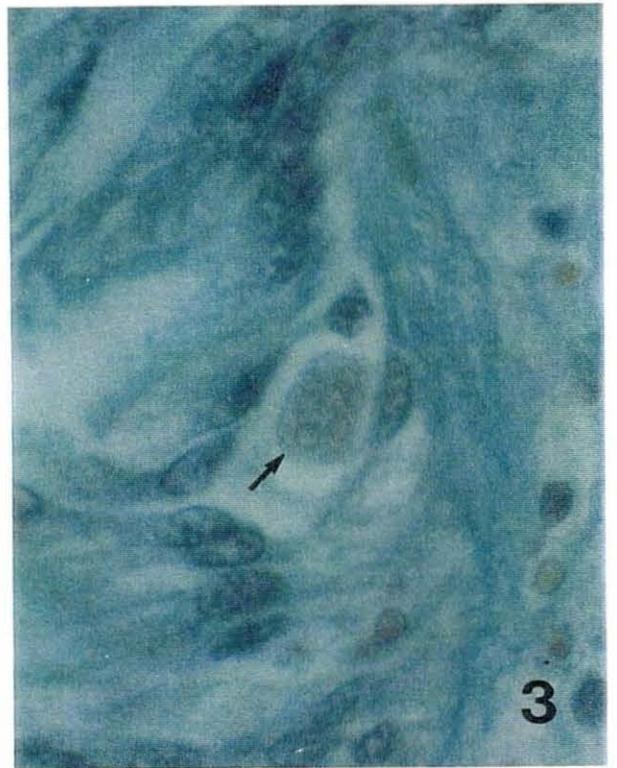
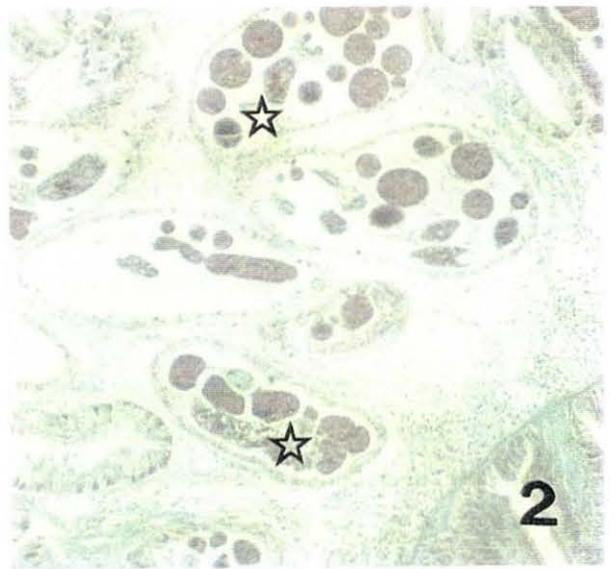
Plasmode d'haplosporidie (flèche) nidé dans l'épithélium d'un diverticule digestif d'une palourde.

Photo n°4 :

Groupe de Perkinsus (flèche) dans le tissu conjonctif de la glande digestive chez une palourde.

Photo n°5 :

Colonie de type rickettsien (flèche) dans l'épithélium d'un diverticule digestif de la palourde.



3. Réseau Pathologie des mollusques : REPAMO

Depuis 1992, un réseau de pathologie des mollusques a été créé. Il trouve son origine dans la directive CEE 91/67, relative à la circulation des produits aquacoles, et à la protection des cheptels contre les maladies afin de répondre à plusieurs besoins.

Il vise à obtenir des données sur l'état zoosanitaire des mollusques, c'est-à-dire à rechercher la présence éventuelle d'agents infectieux, agents pathogènes susceptibles de provoquer ou non des mortalités chez les coquillages. De plus, il contribue à :

- la reconnaissance d'IFREMER comme organisme chargé d'effectuer les analyses nécessaires pour répondre aux besoins de contrôle des échanges de mollusques entre les pays de l'Union Européenne, la France et les pays tiers,
- la mise en place d'un réseau de surveillance des agents pathogènes et de l'épidémiologie des coquillages représentant le cheptel français,
- l'étude des causes de mortalité anormale.

REPAMO est actuellement constitué de trois cellules de contrôle :

	Laboratoire côtier de La Trinité sur Mer	Laboratoire côtier de référence	Laboratoire conchylicole méditerranéen
Territorialité	Zones 8,9,10	La Tremblade Zones 5,6,7	Zones 1,2,3,4

Correspondance géographique des zones :

Méditerranée	Zone 1	Corse
	Zone 2	Frontière italienne-petit Rhône
	Zone 3	Petit Rhône-Aude
	Zone 4	Aude- Frontière espagnole
Atlantique Sud	Zone 5	Frontière espagnole-Gironde
	Zone 6	Gironde-Sèvre niortaise
	Zone 7	Sèvre niortaise-Loire
Atlantique Nord- manche	Zone 8	Loire-Couesnon
	Zone 9	Couesnon-Seine
	Zone 10	Seine-Frontière belge

Plusieurs programmes sont établis pour la Méditerranée :

- Recherche de *Bonamia* et *Marteilia* chez l'huître plate *Ostrea edulis*,
- Mise en place d'un programme de suivi de la résistance au *Bonamia*, de la croissance et de la mortalité de quatre lots d'huître plates ,
- Suivi des mortalités estivales chez *Crassostrea gigas*,
- Suivi des mortalités anormales chez d'autres espèces.

LE SUIVI DES MORTALITES ESTIVALES

Les pathologies étudiées

Parmi tous les micro-organismes pathogènes, tous ne présentent pas le même risque pour les coquillages. En effet, les plus dangereux sont les virus et certains protozoaires.

1. Virus :

La première infection virale a été signalée par Farley *et al* en 1972 sur les huîtres *Crassostrea virginica* aux Etats-Unis. D'après ses caractéristiques, ce virus a été rattaché aux Herpesviridae (Farley, 1978 *in Coquillages*), grâce à la microscopie électronique. Mais cette infection virale n'a pas eu de conséquences importantes sur les populations d'huîtres.

Par contre, entre 1969 et 1973, les cheptels français d'huîtres portugaises *Crassostrea angulata* ont été entièrement décimés par deux iridovirus mis en évidence 4 ans plus tard.

Le premier iridovirus, responsable de la « maladie des branchies », est parti de Marennes Oléron (Marteil 1968, *in Coquillages*) pour ensuite affecter tout le littoral atlantique.

Le deuxième iridovirus a d'abord touché les huîtres de Marennes Oléron, puis celles de Bretagne et enfin d'Arcachon.

A la suite de ces épizooties, des importations massives d'huîtres japonaises *Crassostrea gigas* ont été pratiquées pour remplacer l'huître portugaise.

En 1980, les écloséries américaines sont atteintes par un iridovirus appelé OVVD (Oyster Velar Virus Disease) qui cause des mortalités importantes chez les larves de *Crassostrea gigas*.

En 1991, c'est au tour des écloséries françaises d'être touchées par un virus associé à la famille des herpesviridae. On le retrouvera également dans les nurseries et dans le milieu naturel sur des larves et du naissain de *Crassostrea gigas* (Nicolas *et al*, 1992, *in Coquillages*). Par ailleurs, ce même type de mortalité est constaté certaines années chez l'huître plate *Ostrea edulis* (Fouche 1997).

1.1. Description de l'herpès-like virus :

Il fait partie de la famille des Herpesviridae. Les virus sont des micro-organismes caractérisés par la présence d'un seul type d'acide nucléique - ADN ou ARN comme matériel génétique, et qui sont parasites obligatoires des cellules eucaryotes. Leur structure, assez complexe, est divisée en quatre éléments :

- le **nucléoïde** : structure opaque aux électrons, constituée d'ADN viral bicaténaire et de protéines.
- la **capside** : formée de protéines, elle contient le nucléoïde lorsqu'il est présent.
- le **tégument** : structure fibreuse localisée entre la capsidie et l'enveloppe.
- l'**enveloppe** : structure la plus externe du virion, elle est indispensable à l'infectiosité des particules virales. Elle sert de machinerie pour pénétrer dans les cellules (Renault et al. 1997).

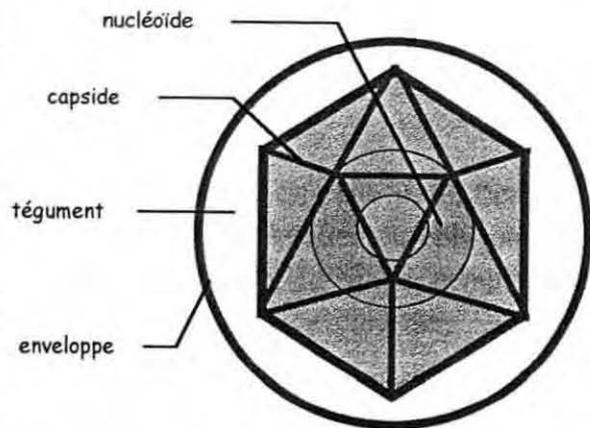


Figure 14 : structure d'une particule virale

1.2. Réplication de l'herpès-like virus :

La virogénèse commence dans les noyaux des cellules hôtes, où les capsides et nucléocapsides apparaissent.

Les particules virales passent à travers la membrane cellulaire vers le cytoplasme, et rapidement a lieu la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de la cellule hôte.

Les nucléocapsides entrent dans le cytoplasme et sont transportés jusqu'à la membrane nucléaire. L'ADN viral pénètre alors dans le noyau de la cellule hôte et va être transcrit par la RNA polymérase II. Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme. On aboutit donc à une réplication de l'ADN viral.

Celui-ci va s'associer avec des protéines et former des nucléoïdes. Ces derniers sont ensuite encapsidés créant ainsi des nucléocapsides qui s'attachent à la membrane interne du noyau. Ceci va leur permettre d'acquérir une enveloppe et de devenir des virions.

1.3. Effets histopathologiques :

(Comps et Cochennec 1993, Renault et al 1994)

Les principaux changements observés sont :

- en histologie :
 - réaction inflammatoire au niveau du tissu conjonctif essentiellement autour des tubules digestifs,
 - certaines cellules (hémocytes et fibroblastes) présentent un noyau élargi montrant une chromatine marginée et contenant des inclusions Feulgen-positives,

- de petites cellules ovoïdes (5 à 6 μm) contenant des corps sphériques ont pu être observées au niveau du tissu interstitiel.
- en microscopie électronique (planche 2, photo n° 6):
 - les cellules interstitielles présentent des inclusions de type viral. Dans la plupart des cellules, on observe des particules sphériques ou polygonales contenues dans le noyau. Quand la membrane nucléaire se rompt, un certain nombre de ces particules se déplacent vers le cytoplasme,
 - des particules parasphériques (160 à 180 nm) sont présentes dans le cytoplasme de cellule de cytopathologie avancée. On est en présence de capsides à parois opaque aux électrons.

1.4. Différentes phases de l'Herpès-like virus :

(Renault et al 1997)

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

- **latente** : absence de symptôme et de mortalité, le virus n'est présent que sous forme d'ADN intégré au génome de l'hôte ; les particules virales ne sont pas produites,
- **peu productive** : nombre réduit de particules virales, le virus se multiplie de façon limitée et ne conduit pas forcément à une infection clinique,
- **aiguë** : la multiplication intense du virus conduit à la maladie.

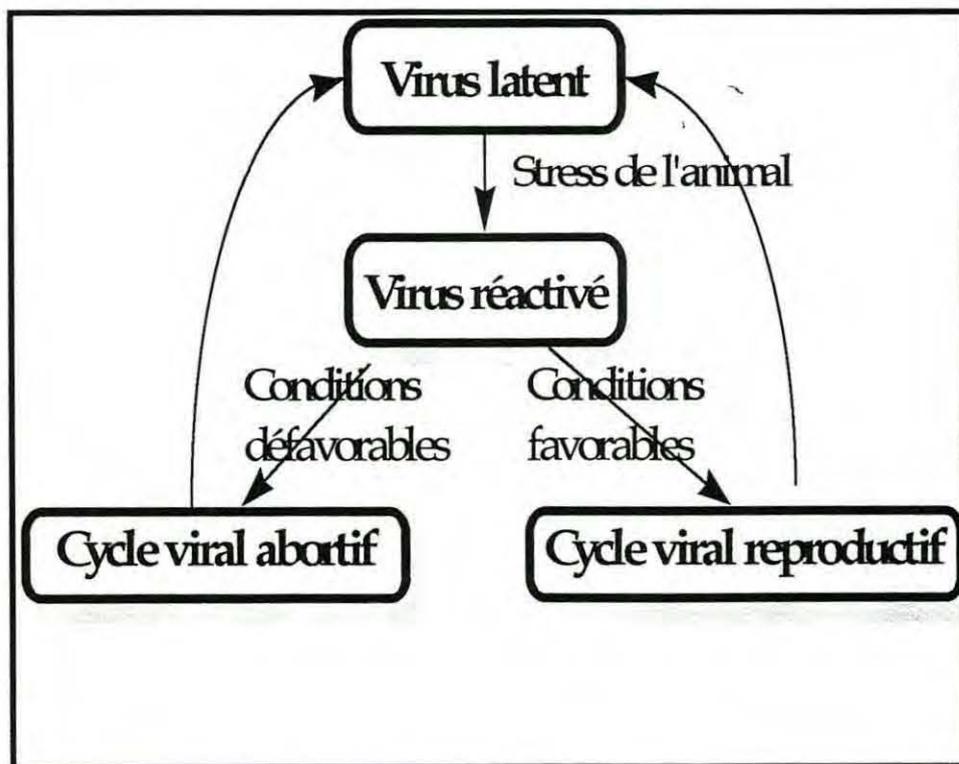


Figure 15 : Cycle des herpès virus.

1.5. Transmission de l'Herpès-like virus :

(Renault et al 1997)

Jusqu'à présent, les expériences menées sur l'Herpèsvirus n'ont permis que de démontrer certains modes de transmission.

De plus, les observations faites en éclosion semblent montrer que la transmission pourrait se faire de façon verticale. Ces éléments viennent corroborer les expériences déjà faites en laboratoire, mais ne constituent pas des preuves suffisantes. Toutefois, cela permet d'affirmer le caractère fortement pathogène de l'Herpèsvirus.

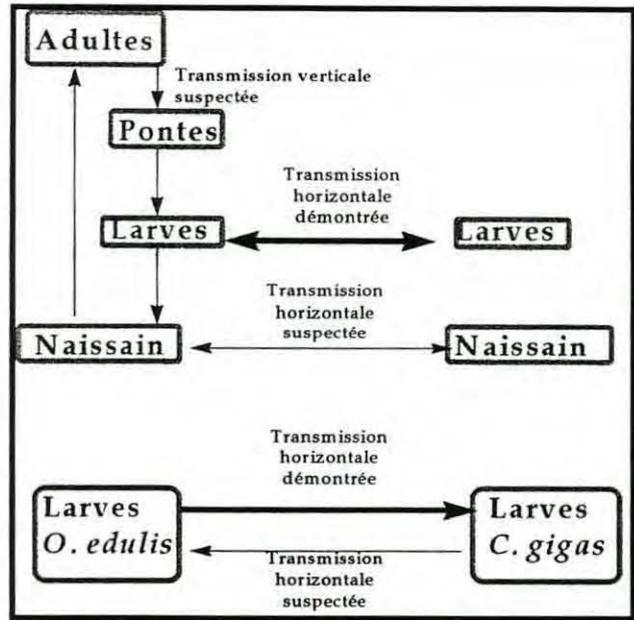


Figure 16 : Transmission de l'Herpès-like virus.

2. Protozoaires :

Deux protozoaires sont particulièrement connus pour causer des mortalités dans les cheptels d'huîtres plates, ce sont *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

Marteilia refringens a été mis en évidence en 1968-1969 à la suite d'une des plus graves épizooties qui a touché les populations d'huîtres plates *Ostrea edulis*.

Bonamia ostreae, parasite hémocytaire, a été mis en évidence en 1979 lors de la survenue de mortalités importantes en Bretagne (Comps et al. 1980).

Marteilia et *Bonamia* sont signalés pour la première fois sur le bassin de Thau en 1987 sur des individus transférés de Bretagne et initialement contaminés (Hamon et Pichot, 1994).

Chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, on a pu observer à partir de 1980, un parasite voisin du *Marteilia* parasitant les huîtres plates, identifié comme *Marteilia maurini*. Il semble être plus présent dans les moules de l'étang de Thau que dans les élevages en mer (Hamon et Pichot, 1994).

Parmi les protozoaires qui ont également causé des mortalités massives, on retrouve les protozoaires du genre *Perkinsus*. En effet, l'un d'eux a été à l'origine de mortalités importantes sur la Côte Est des Etats-Unis dans les années 50 parmi le cheptel d'huîtres *Crassostrea virginica*. De plus, un autre protozoaire du genre *Perkinsus* : *Perkinsus atlanticus* a aussi causé des mortalités importantes sur les stocks de palourdes européennes *Ruditapes decussatus*.

2.1. MARTEILIA REFRINGENS :

2.1.1. Systématique :

- Classe : Stellatospora
 - * Phylum des Ascetospora

Marteilia Refringens est un parasite de l'huître plate causant la *Martéiliose* que l'on appelle aussi « **Maladie des abers** » ou « **Maladie de la glande digestive** » .

Macroscopiquement, les principaux signes de parasitose sont une altération au niveau des branchies, un amaigrissement et une dépigmentation de la glande digestive.

2.1.2. Morphologie du parasite:

La forme de base est constituée d'une **cellule souche** appelée aussi **cellule primaire** ou **plasmode**. Cette cellule de forme arrondie a une taille variant entre 10 et 30 μm selon la période du cycle et pouvant atteindre à l'extrême 4.5 μm à 23 μm pour les formes uninuclées.

Elle est caractérisée par un cytoplasme de nature basophile, riche en ribosomes libres. Celui-ci renferme un noyau peu chromophile possédant un nucléole volumineux (Grizel et al. 1974).

On peut également observer la présence d'autres organites :

- des vésicules (Perkins, 1976 a),
- des particules denses structurées, vermiformes, les haplosporosomes (Perkins, 1976 a),
- des inclusions contenant du matériel de nature protéique,
- des mitochondries.

2.1.3. Formes de sporulation :

La première phase de la **sporogénèse** est constituée par la formation à l'intérieur de la cellule primaire d'une ou plusieurs **cellules secondaires** (Grizel et al.1974) appelées aussi, « **présporanges** » (Perkins 1976 a) ou « **sporontes** » (Desportes 1981). La multiplication cellulaire évolue par la suite pour donner des « **sporanges** » ou « **pansporoblastes** » . Cela conduit à la formation de 3 ou 4 unités constituées de 3 sporoplasmes uninuclées - les **cellules tertiaires** - ou « **spore primordia** » ou « **cellules sporales primaires** » . Ces cellules vont ensuite évoluer vers leur forme finale : les **spores**. (fig. 17)

Les premiers stades de la sporogénèse (cellule primaire) ont lieu dans l'épithélium cilié de l'estomac. On peut également les observer dans les diverticules digestifs et dans l'oesophage. La formation des sporanges et spores a lieu dans le tractus digestif. L'émission des sporanges se fait dans la lumière des diverticules, ensuite ceux-ci sont éliminés par l'intestin et le rectum. (Pichot 1984).

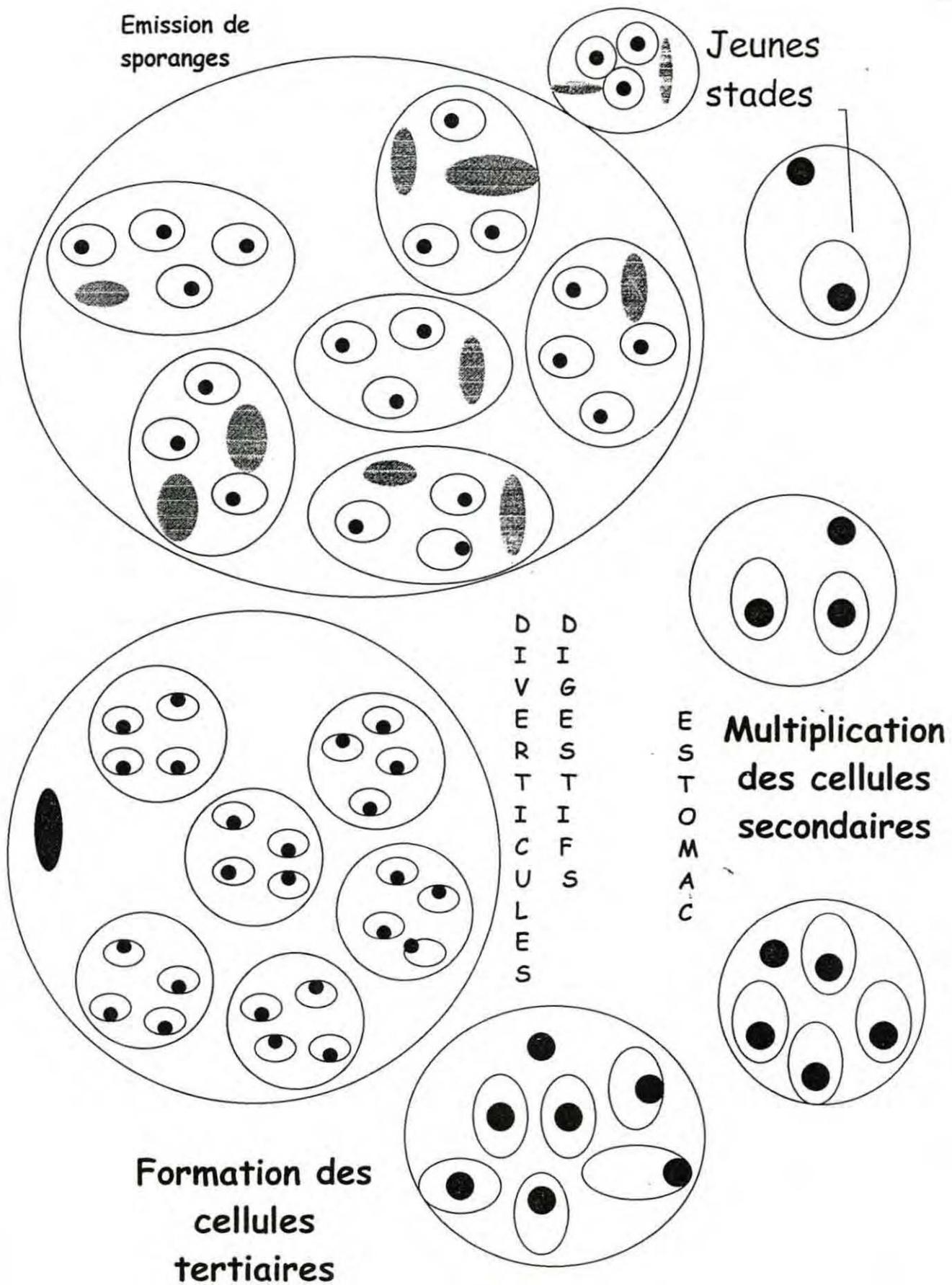
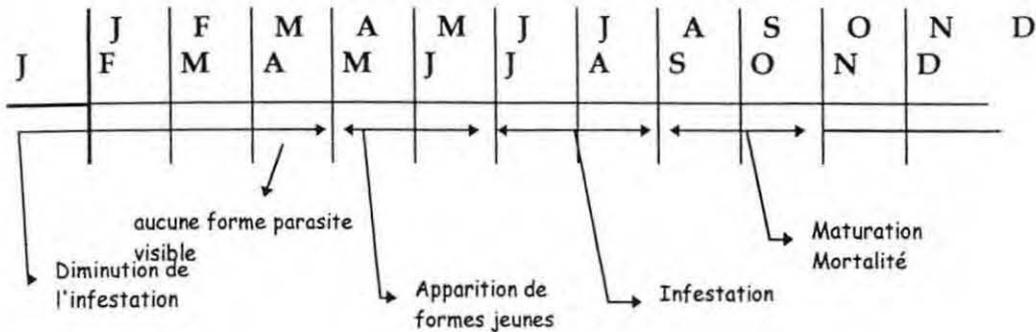


Figure 17 : Schéma du cycle de développement de *Marteilia refringens*.

2.1.4. Cycle de développement annuel :

Le parasite M. Refringens évolue selon un cycle saisonnier :



2.1.5. Effets pathogènes du parasite ⁹:

A. Histopathologie :

On note un déchiquetage des cellules épithéliales des diverticules digestifs. On constate également des nécroses épithéliales du tractus digestif accompagnées de réactions hémocytaires.

Les premières formes du parasite sont localisées dans l'épithélium stomacal entre les cellules épithéliales. Cependant, on n'a pas constaté d'effet pathogène lié à la présence de *Marteilia refringens* dans l'estomac.

Par contre, le développement de la maladie entraîne des modifications au niveau des diverticules digestifs. En effet, le parasite investit les canaux et tubules digestifs au cours de la phase de prolifération. Ensuite, l'accroissement de taille du parasite entraîne un encombrement partiel de la lumière des tubules et une déformation de la partie distale des cellules épithéliales (planche 2, photos n°4 et 5). Lorsque les sporontes sont libérés, ils transitent jusqu'à l'intestin, ce qui s'accompagne d'une altération de l'épithélium :

- les cellules digestives éclatent,
- disparition de secteurs épithéliaux,
- Parallèlement, les conduits digestifs s'élargissent.

Les symptômes varient bien sûr en fonction du degré d'infestation et de l'état de développement du parasite.

B. Biochimie :

Des études ont montré l'influence de *M. refringens* sur le métabolisme protéique des huîtres parasitées. En effet, la concentration protéique passe de 13.3 g/l pour une huître saine à 8 g/l pour une huître parasitée.

⁹ : D'après Pichot. 1984.

En conclusion :

- importantes lésions des épithéliums digestifs,
- destruction des épithéliums dans les tubules et canaux digestifs,
- obturation des diverticules,
- suppression ou limitation des fonctions digestives de l'huître infestée,
- altérations biochimiques de l'hémolymphe.

2.2. BONAMIA OSTREAE :

2.2.1. Systématique :

- Classe : Stellatospora
 - * Phylum des Ascetospora

Bonamia ostreae est un parasite de l'huître plate que l'on peut retrouver sous le nom de parasite X ou **Maladie hémocytaire**, car on le retrouve essentiellement dans les hémocytes des huîtres (planche 2, photos n° 2 et 3) et parfois sous forme libre dans les tissus altérés.

Les principales altérations visibles à l'œil nu sur un animal atteint par *Bonamia* sont des perforations ou des indentations au niveau des branchies (planche 2, photo n° 1). Un examen plus approfondi révélera un gonflement des filaments branchiaux dont l'épithélium est distendu voire rompu (Comps et al., 1980).

2.2.2. Morphologie du parasite :

Bonamia est caractérisé par la présence dans les tissus infectés de deux types de cellules :

- **cellules denses** : ce sont les plus fréquentes dans les tissus, elles sont constituées d'un cytoplasme dense, riche en ribosomes (Pichot et al, 1980). Le noyau, dont le nucléole est situé sur un de ses côtés, est limité par deux membranes unitaires l'une interne et l'autre externe. Il contient un matériel granuleux opaque aux électrons. On peut également trouver des mitochondries et des particules denses structurées que l'on peut rapprocher des haplosporosomes (Montes et al, ?). On note aussi la présence de corps très denses sans structure apparente. En raison de l'aspect de ces formes denses, on suppose que celles-ci seraient une forme résistante du parasite. En effet, on les retrouve sous forme libre dans les tissus altérés, elles pourraient donc assurer l'extension de la parasitose chez les huîtres infestées ou chez les huîtres saines par filtration de la colonne d'eau (Pichot et al, 1980)

- **cellules claires** : elles sont plus rares dans les tissus. De forme amoeboïde plus ou moins allongée elles sont de nature peu basophiles. Leur noyau comporte un nucléoplasme formé de petits amas granuleux denses répartis dans un espace clair. De plus, il contient un nucléoïde volumineux et granuleux, localisé en position pariétale. On retrouve également des mitochondries et des particules denses structurées identiques à celles des formes denses. D'autres organelles sont assimilables à un appareil de Golgi. Ces cellules sont supposées, en raison de leur structure, être végétatives.

2.2.3. Cycle de développement :

La multiplication du parasite s'effectue par mitose. Le premier stade est marqué par la présence d'un noyau ovoïde contenant un nucléole dense aux électrons accolé à la membrane nucléaire. Le nucléoplasme contient des microtubules qui s'étendent en faisceau dans la partie médiane du noyau. Des noyaux très allongés avec un corps polaire repoussé contre la membrane nucléaire sont visibles à d'autres stades de la multiplication. Enfin, à un stade plus avancé de la mitose, le noyau est fortement étiré dans sa partie médiane et possède latéralement 2 corps opaques, probablement des nucléoles (Pichot et al 1980). La phase terminale de la multiplication conduit à la formation de deux cellules filles par division cytoplasmique.

Des formes plasmodiales ont parfois été observées. Selon Bréhélin, la présence de ces formes plasmodiales permettrait d'expliquer le développement explosif du parasite avant la mort de l'animal. L'hypothèse a été émise que deux types de multiplication seraient possibles :

- une multiplication simple correspondant à une division binaire et qui existerait à un stade précoce de la maladie,
- une multiplication à partir des plasmodes : deux possibilités s'offrent :
 - * un mode de multiplication fugace ou
 - * un développement explosif du parasite en fin de maladie par multiplication de type schizogonique.

Van Banning a également émis l'hypothèse que *Bonamia* pourrait avoir un stade d'infection qui se développe dans les tissus ovariens avant le stade d'infestation des hémocytes. Le schéma du cycle de développement serait le suivant :

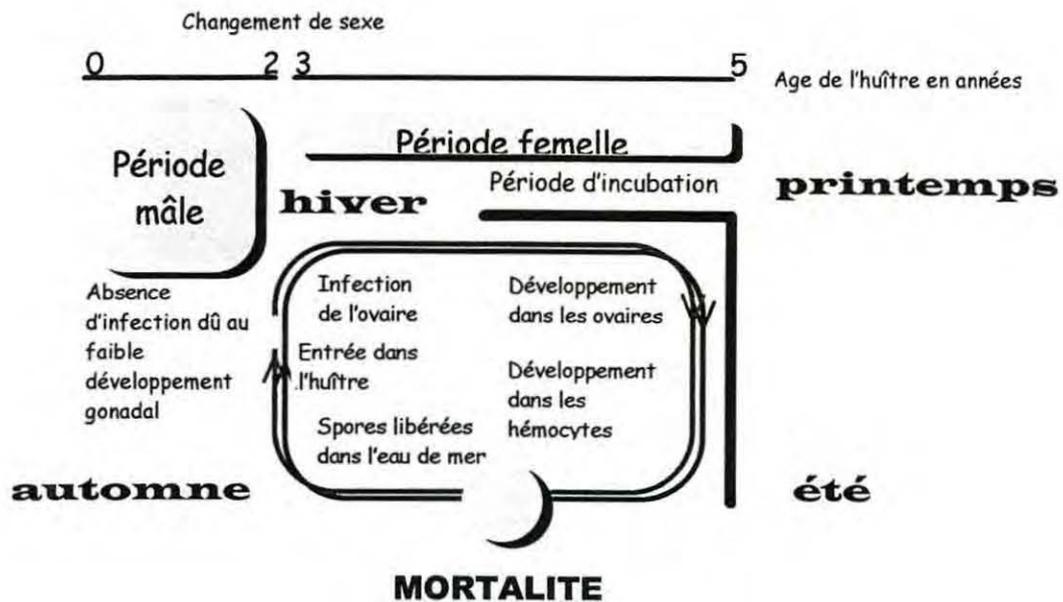


Figure 18 : Cycle de développement supposé de *Bonamia ostreae* en tant que parasite de l'ovaire d'*Ostrea edulis*. D'après Van Banning 1990.

Le cycle ovarien d'*Ostrea edulis* détermine la phase de développement de *Bonamia*. La période de ponte induit la phase hémocytaire tuant ainsi l'huître à la fin de l'été, début de l'automne. Ce sont les femelles qui sont sensibles à l'infection par *Bonamia*. Cette forte sensibilité d'*Ostrea edulis* à *Bonamia* serait due à son caractère hermaphrodite protandre, phénomène que l'on retrouve également chez *Ostrea lurida* (Le Dantec et Marteil, 1976 in Van Banning) connu pour être sensible à *Bonamia ostreae* (Farley et al 1988, in Van Banning). Ceci pourrait donc expliquer l'absence de parasitose *Bonamia* chez les huîtres de la famille *Crassostrea* qui ne possèdent pas ce caractère hermaphrodite.

Planche n°2 : pathologies étudiées

photo n°1 :

lésions des branchies d'*Ostrea edulis* provoquées par *Bonamia ostreae* (flèche).

Photo n°2 :

hémocytes d'*Ostrea edulis* parasités par *Bonamia ostreae*.

Flèches blanches : noyau de la cellule hôte.

Flèches noires : parasite.

Frottis cardiaque coloré RAL 555 - éosine, bleu de méthylène.

Photo n°3 :

hémocytes d'*Ostrea edulis* parasités par *Bonamia ostreae*

Flèches blanches : noyau de la cellule hôte.

Flèches noires : parasite.

Coupe histologique colorée Trichrome de Masson modifié.

Photo n°4 :

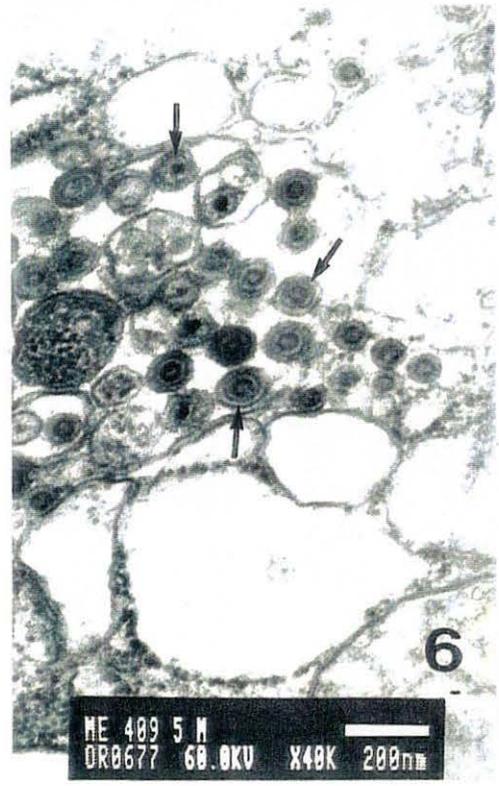
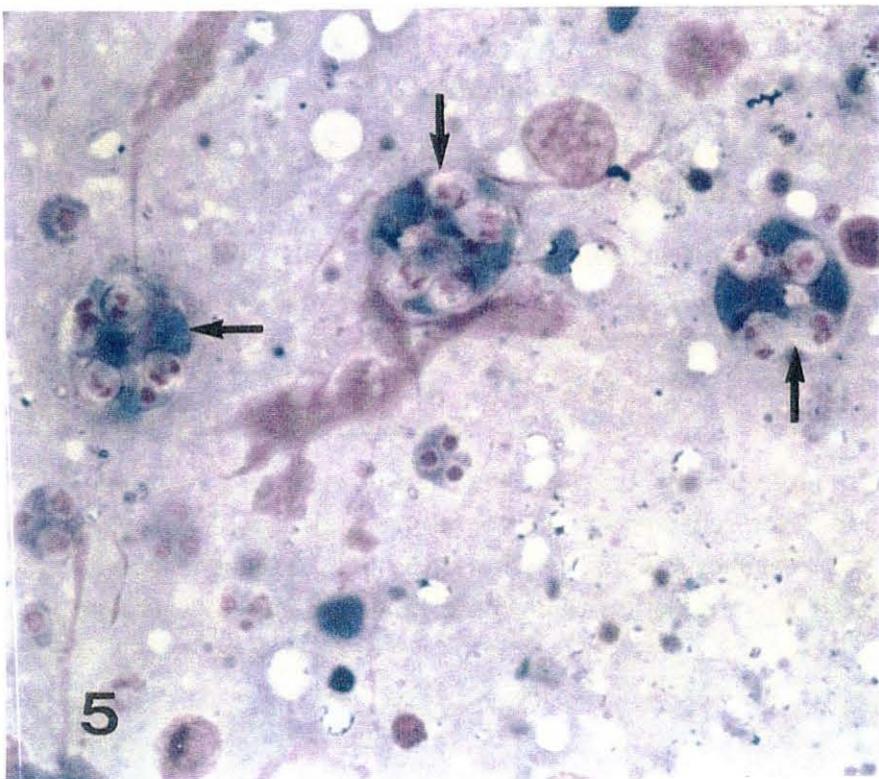
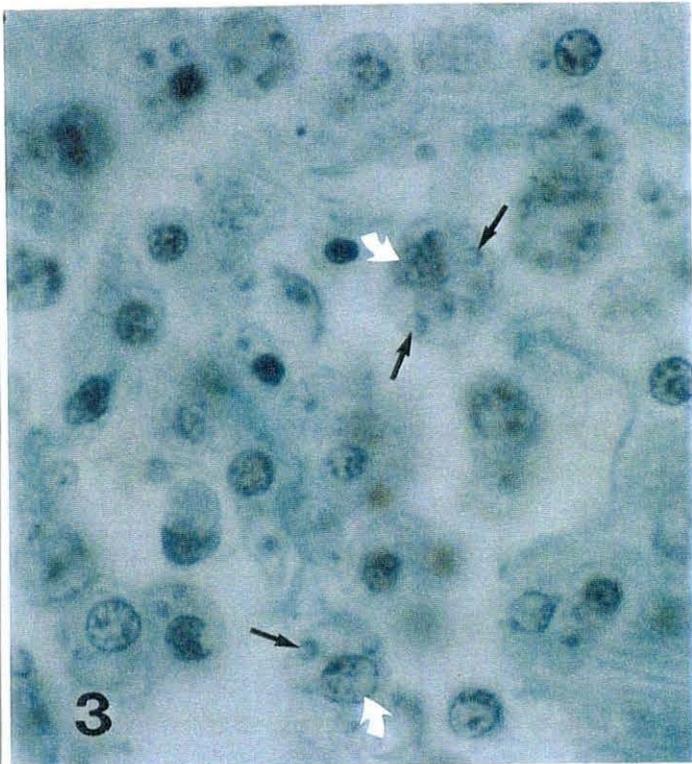
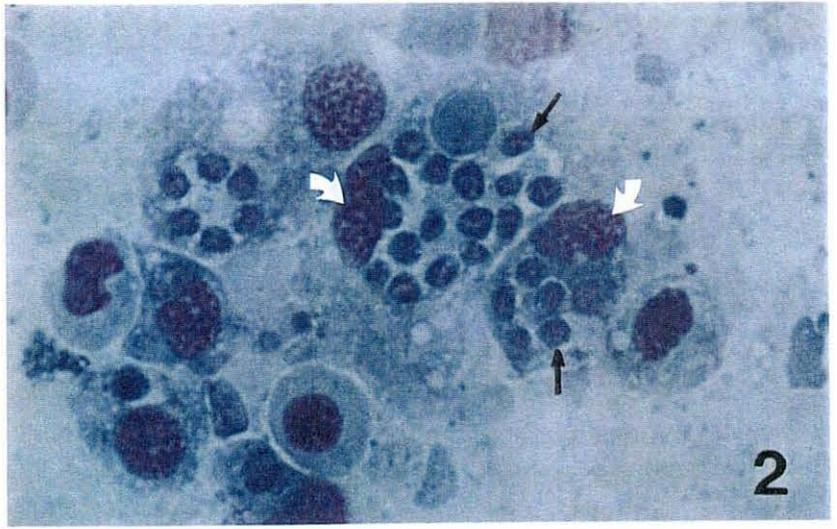
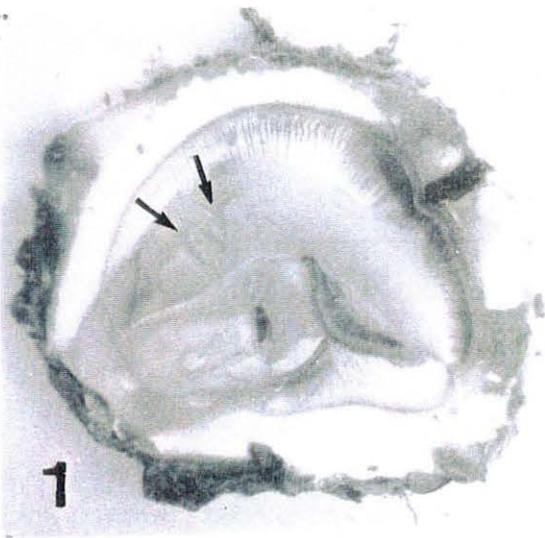
formes évoluées de *Marteilia refringens* localisées dans les diverticules digestifs d'*Ostrea edulis* (flèches) Coupe histologique colorée Trichrome de Masson modifié.

Photo n°5 :

formes évoluées de *Marteilia refringens* (flèches). Frottis de glande digestive coloré RAL 555.

Photo n°6 :

particules virales d'herpès-like virus de *Crassostrea gigas* (flèches). Microscopie électronique. Photo fournie par le laboratoire de Ronce les Bains.



L'étude des mortalités

A la suite de ces quelques informations sur les pathologies des coquillages, il est aisé de comprendre l'impact des maladies sur la conchyliculture. De plus, la prédominance d'une seule espèce en élevage comme *Crassostrea gigas* sur la scène de l'ostréiculture mondiale, est un réel danger pour la pérennité de la profession. En effet, nous avons pu constater les dégâts causés dans les années 70 par les deux iridovirus qui ont décimé les cheptels français d'huîtres *Crassostrea angulata*. Nous pouvons facilement imaginer les conséquences qu'aurait un tel phénomène s'il se reproduisait en touchant l'huître creuse *Crassostrea gigas*, car aucune autre espèce à l'heure actuelle ne semble pouvoir assurer la relève (Fouche, 1997).

Ainsi, l'étude de mortalités estivales revêt un caractère important depuis quelques années. C'est dans l'optique de mieux connaître les causes de mortalités que divers programmes de recherche ont été lancés. Deux d'entre eux vont peut-être permettre de déterminer les causes des mortalités qui touchent l'huître creuse depuis 1991 et la relation avec la détection chez cette espèce, d'un virus de type herpès et ensuite l'huître plate avec la détection de *Bonamia ostreae*.

1. Suivi des mortalités estivales chez *Crassostrea gigas* :

Depuis quelques années, on a pu constater une mortalité anormale chez les naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* au cours de la période estivale.

En effet, depuis 1991, de fortes mortalités de larves d'huîtres creuses ont été observées dans les écloséries françaises. Celles-ci ont été associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des herpesviridae.

De plus, au cours des étés 1993, 1994 et 1995 de fortes mortalités ont également été observées sur du naissain issu de milieu naturel.

Depuis 1995, des programmes d'étude de cette mortalité ont donc été mis en place afin d'en déterminer l'étiologie. C'est dans le cadre d'un de ces programmes réalisés au Laboratoire Conchylicole de Méditerranée que s'insère mon travail.

1.1. Matériel et méthodes :

Le suivi des mortalités s'effectue sur du naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. 27 lots d'huîtres, un lot étant constitué par 6 pools (1 pool = 1 boîte de Pétri) de 5 individus (chair de l'huître) ont été analysés par Polymerase Chain Reaction (PCR), qui est une réaction d'amplification enzymatique. On amplifie spécifiquement

une séquence d'ADN double brin par action cyclique d'une ADN polymérase. Ceci nécessite l'enchaînement de trois étapes :

1. la séparation des deux brins d'ADN en double hélice afin d'obtenir deux simples brins qui vont servir de matrices,
2. L'hybridation des amorces de part et d'autre de la séquence d'amplification. Celles-ci servent de départ à la polymérisation,
3. La polymérisation qui est l'étape d'allongement des amorces.

Cette technique permet de déterminer la présence ou pas du virus de type Herpès, qui pourrait être la cause de cette mortalité. Des individus ont également été prélevés afin d'être examinés en histologie pour détecter la présence éventuelle d'agents pathogènes. La technique est développée en **annexe 1**.

Depuis le mois de Février, des prélèvements d'échantillons d'huîtres ont été effectués chez divers ostréiculteurs de l'étang de Thau. Au total, ce sont quatre ostréiculteurs qui ont été retenus, ils seront nommés par souci de confidentialité : ostréiculteur A, B, C, D. Chaque lot s'est vu attribué un numéro sous la forme 97XX, où 97 correspond à l'année d'étude de la mortalité et XX est un numéro compteur.

Les prélèvements ont été effectués régulièrement pour réaliser le suivi :

N° de lot	Date de prélèvement	Ostréiculteur
9711	18/02/97	A
9722, 9723	29/05/97	
9740, 9741	19/06/97	
9719, 9720	27/05/97	B
9730	11/06/97	C
9721	29/05/97	
9738, 9739	19/06/97	
9733	16/06/97	D
9745, 9746	26/06/97	

Tableau 1 : Lots étudiés pour le suivi de la mortalité.

De plus, d'autres lots d'huîtres creuses provenant d'ostréiculteurs ne faisant pas partie du suivi ont également été examinés lorsque des mortalités anormales se sont présentées.

Plusieurs facteurs ont été pris en compte afin de tenter d'établir une corrélation entre les mortalités et eux, ce sont :

- l'origine des lots : éclosion ou captage naturel,

- la zone d'élevage,
- le mode d'élevage,
- la taille des individus,
- la période de mise en étang ou en mer.

Une base de donnée sous ACCESS a été créée pour faciliter l'exploitation des données ainsi qu'un fichier sous EXCEL.

1.2. Les résultats :

Depuis le mois de Juin, 14 PCR ont été mises en oeuvre et réalisées, ce qui a permis d'analyser 27 lots soit 173 pools et donc environ 850 individus (annexe 2)

Sur 27 lots analysés, 10 cas d'infection virale ont été révélés, il s'agit des lots :

9715	9720	9722	9723	9732
9733	9738	9745	9747	9754

6 lots présentaient des taux de mortalités supérieurs à 40%, (lot 9720, 9722, 9723, 9732, 9733 et 9738). Un lot avait un taux de mortalité de 20% et 3 lots ne présentaient pas de mortalité.

Les caractéristiques de ces lots sont présentées dans le tableau suivant :

N° lot	Origine	Type de Production	Lieu d'élevage	Date d'arrivée	Catégorie d'huîtres	Taux de mortalité
9715	Arcachon	CN	Thau	Mars 97	Naissain	0 %
9720	Arcachon	CN	Leucate	Mai 97	Naissain	80 %
9722	Arcachon	CN	Thau	Mai 97	Naissain	60 %
9723	Arcachon	CN	Thau	Mai 97	Naissain	80 %
9732	Saint Philibert	E	Thau	Mai 97	Une à une	80 %
9733	Barfleur	E	Thau	Mai 97	Une à une	50 %
9738	Arcachon	CN	Thau	Juin 97	Naissain	40 %
9745	Barfleur	E	Thau	Mai 97	Une à une	0 %
9747	Arcachon	CN	Thau		Naissain	20 %
9754	Barfleur	E	Thau	Juillet 97	Une à une	0 %

Tableau 2: Liste des lots positifs à la PCR.

Le suivi portait sur la mortalité estivale touchant les huîtres creuses dans le bassin de Thau, mais nous avons toutefois testés quatre lots d'huîtres élevées à Leucate et qui présentaient des taux de mortalité élevés, celles-ci nous ayant été signalées par des professionnels. Ils ont été inclus dans le suivi.

Il semble opportun de s'intéresser au taux d'infestation des coquillages par l'herpès-like virus en fonction du type de production. On calcule le ratio : nombre de pools infestés / nombre de pools totaux :

- captage naturel : $(17/103) \times 100 = 16.5 \%$
- éclosionerie : $(15/70) \times 100 = 24.3 \%$

On constate donc que les huîtres provenant de captage naturel sont moins infestées par l'herpès-like virus que les huîtres produites en éclosionerie. Sachant que la transmission de larves à larves a été démontré, ceci tendrait à favoriser la prolifération du virus et pourrait donc expliquer le taux plus élevé des éclosioneries. De plus, les conditions d'élevage en éclosionerie - maintien de la température à un certain niveau - par exemple peuvent induire le développement de l'Herpès lorsqu'on sait que celui-ci est fortement sensible à la température, plus elle est élevée et plus les larves meurent de façon soudaine (Le Deuff et al 1996).

Concernant le suivi de la mortalité, on constate que les lots 9722 et 9723 présentaient une infection virale. Mais le lot 9741 qui est la suite des lots précédents s'est révélé négatif à la PCR. De même le lot 9739 issu du même arrivage que le lot 9723 ne présente pas d'infection.

Sauf si des pathologies sont reconnues lors d'examens histologiques, ou si l'on a constaté des phénomènes anormaux comme les malaïgues ou de fortes pluies, il est toujours extrêmement difficile de définir les causes des mortalités des coquillages. Dans cette partie, nous nous efforcerons d'émettre des hypothèses quant aux causes de mortalité des coquillages.

Au niveau de la mortalité, on peut relever certains faits :

- le lot 9723 a été stocké en bassin avant sa mise en eau, et on a pu mesurer un taux de mortalité de 80%, et un résultat positif à la PCR.
- le lot 9738 issu du même arrivage que le lot 9723 et qui a été mis en pochon présentait un taux de mortalité de 40% et était positif à la PCR alors que le lot 9739 et 9740 de même origine que 9723 ne présentaient aucune mortalité et sont ressortis négatifs à la PCR.
- le lot 9745 est la suite du lot 9733 et présentait comme le lot 9733 une infection virale mais contrairement à 9733 (50% de mortalité) n'a subi aucune mortalité. Par contre, le lot 9743 identique au lot 9733 et le lot 9746 stocké sur la même table que le lot 9733 ne présentaient aucune

mortalité pour 9743 et 50% de mortalité pour 9746 mais n'étaient pas atteints par l'HLV.

D'ores et déjà, après cette analyse, le passage des lots en étang directement après leur arrivage réduit considérablement le taux de mortalité. Par contre, la localisation géographique, à première vue ne semble pas intervenir comme facteur influençant la mortalité. En effet, les lots 9740 et 9741 élevés sur la même table n'ont pas les mêmes taux de mortalité, respectivement 0 et 70%. Toutefois, les données sont insuffisantes pour en tirer des conclusions définitives quant au rôle joué par l'emplacement d'élevage.

La date d'arrivée des coquillages qui correspond en général à la date de mise en élevage en étang est un facteur important pour déterminer les causes de mortalités. Elle doit être mise en relation avec la température de l'eau et le taux de mortalité observé. La figure 19 présente les températures de l'étang depuis le mois d'avril 1997.

Les fortes mortalités sont intervenues au cours de la mi-Mai jusqu'au début du mois de Juillet. On constate sur la courbe des températures, que celle-ci a subi une forte hausse à partir du 13 Mai jusqu'au 31 Mai puisque l'eau est passée de 16.85 °C à 21.95°C en 19 jours. Ensuite, elle baisse jusqu'à 20.99°C pour à nouveau remonter à 23.55°C le 16 Juin. Ceci peut être à l'origine d'un stress pour l'animal qui aurait induit des mortalités. Cependant, la température étant sensiblement la même pour tout l'étang, il semble peu probable que celle-ci soit une cause directe de mortalité. En effet, la dispersion des points de prélèvement des échantillons et les disparités dans les résultats obtenus réfutent totalement cette hypothèse.

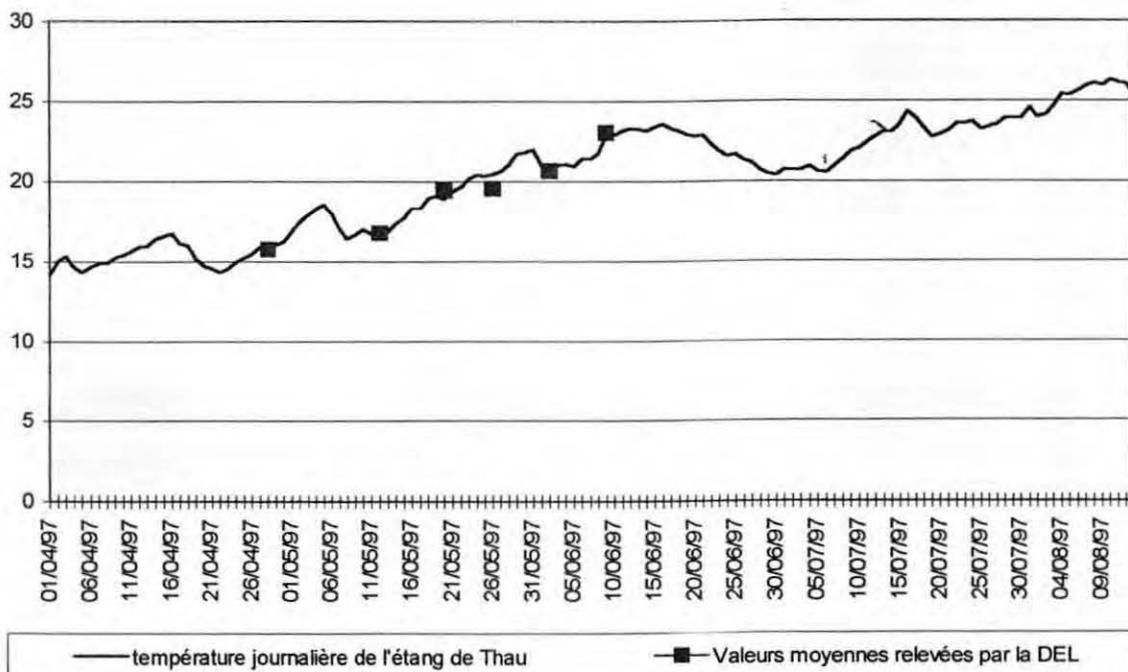


Figure 19 : Courbe des températures de l'étang de Thau.

Par contre, il est possible que la température ait un effet sur la maturation des huîtres. Celles-ci étant suffisamment âgées pour être en phase de maturation durant les mois de Mai et Juin, le stress provoqué par cette phase associé au stress provoqué par les variations de température peut induire le passage de la phase de latence de l'HLV à une phase peu productive voire aiguë du virus. Eventuellement si le virus n'était pas présent chez l'animal, cela peut le sensibiliser à toute autre forme parasitaire ou le fragiliser et donc causer des mortalités.

Afin d'étudier plus en détail l'influence des différents éléments relevés lors de prélèvements comme le lieu d'origine, la date d'arrivée, etc., des analyses statistiques ont été réalisées.

Ainsi, le test du Chi-deux, utilisé pour tester la corrélation entre deux variables, ici en l'occurrence la présence de mortalité et la révélation de présence d'herpès virus par PCR, va nous permettre de vérifier l'indépendance ou pas des deux variables étudiées :

- on pose la question : la mortalité est-elle liée à la présence d'herpès-like virus dans les huîtres,

Les données relatives à la mortalité et à la présence d'HLV sont regroupées dans un tableau de contingence :

Mortalité	Résultats positifs		Résultats négatifs		Total	
	fobs	fthéo	fobs	fthéo		
Oui	7	4.81	6	8.18	13	f1,m
Non	3	5.18	11	8.81	14	f2,m
Total	10	n1	17	n2	27	n

- fobs représente la fréquence observée et sera notée par la suite $f_{i,j}$

- fthéo représente la fréquence théorique calculée selon la formule :

$$f_{théo, i, j} = (\text{total ligne } i \times \text{total colonne } j) / \text{total général} \quad (F-1)$$

et sera notée par la suite $f_{th,i,j}$

Le nombre de degrés de liberté se calcule selon la formule :

$$V = (\text{nb de colonnes} - 1) \times (\text{nb de lignes} - 1) \quad (F-2)$$

Les conditions d'application du test n'étant pas remplies, en effet, dans le cas particulier où le nombre de degrés de liberté est égal à 1, on ne peut appliquer le test du Chi-deux que si toutes les fréquences théoriques sont supérieures à cinq. Ce

n'est pas le cas. Il faut donc appliquer le test G qui s'avère un peu plus robuste que le test du Chi-deux (X^2).

- On émet l'hypothèse H_0 : les variables X (mortalité) et Y (herpès-like virus) sont indépendantes,

- on émet l'hypothèse H_1 : les variables X et Y sont associées (liées)

Les conditions du test sont : si $G < X^2$ alors on accepte H_0 sinon on accepte H_1 .

On calcule ensuite la variable G_c :

$$G_c = 2 \left(\sum_{(i=1 \text{ à } 2)} \sum_{(j=1 \text{ à } 2)} f_{i,j} \ln f_{i,j} - \sum_{(i=1 \text{ à } 2)} f_{i,m} \ln f_{i,m} - \sum_{(j=1 \text{ à } 2)} n_j \ln n_j + n \ln n \right)$$

d'où

$$G_c = 2 \left((7 \ln 7 + 6 \ln 6 + 3 \ln 3 + 11 \ln 11) - (13 \ln 13 + 14 \ln 14) - (10 \ln 10 + 17 \ln 17) + 27 \ln 27 \right)$$

$$G_c = 3.101$$

Mais, on peut ajuster la valeur de G pour obtenir une meilleure approximation par le calcul de q_w (ajustement de Williams) :

$$q_w = 1 + \frac{(n \sum_{(j=1 \text{ à } 2)} (1/n_j) - 1) \times (n \sum_{(i=1 \text{ à } 2)} (1/f_{i,m}) - 1)}{6 \times n \times (k - 1) \times (r - 1)}$$

$$q_w = 1 + \left\{ \left(27 \left[\left(\frac{1}{10} \right) + \left(\frac{1}{17} \right) \right] - 1 \right) \times \left(27 \left[\left(\frac{1}{13} \right) + \left(\frac{1}{14} \right) \right] - 1 \right) \right\} / (6 \times 27 \times (2 - 1) \times (2 - 1))$$

$$q_w = 1.023$$

il vient :

$$G \text{ ajusté} = G_c / q_w = 3.031$$

Il faut maintenant se référer à la valeur du X^2 (Chi-deux) pour 1 degré de liberté et un seuil de signification de 5%. On trouve la valeur :

$$X^2_{(0.05) (1)} = 3.84$$

On a donc :

$$G \text{ ajusté} < X^2_{(0.05) (1)}$$

Il faut donc accepter l'hypothèse H_0 : les variables X et Y , à savoir mortalité et présence d'HLV sont indépendantes.

Toutefois, il faut émettre des réserves quant au résultat obtenu précédemment. En effet, pour effectuer les calculs, nous nous sommes basés sur le nombre de lots qui étaient positifs ou négatifs. Or, chaque lot est divisé en pools et n'en contient pas forcément le même nombre. De plus, dans un lot, le nombre de pools positifs n'est pas identique, ce qui fausse les probabilités de chaque lot. On va donc calculer le X^2 à partir du nombre de pools négatifs et positifs par rapport à la mortalité, d'où le tableau de contingence suivant, les hypothèses restant inchangées :

Mortalité	Positif	Négatif	Total
Oui	27 14.61	52 64.39	79
Non	5 17.39	89 76.62	94
Total	32	141	173

Dans ce cas, on peut donc appliquer le test du Chi-deux, car on a un échantillon largement supérieur à 40 et de plus toutes les fréquences théoriques sont supérieures à 5. Il convient de calculer le X^2 selon la formule :

$$X^2_{pc} = \sum_{(k,r)} [(f_{obs} - f_{th})^2 / f_{th}]$$

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

	f_{obs}	f_{th}	$f_{obs} - f_{th}$	$(f_{obs} - f_{th})^2 / f_{th}$
Oui/Positif	27	14.61	12.39	10.51
Non/Positif	5	17.39	-12.39	8.83
Oui/Négatif	52	64.39	-12.39	2.38
Non/Négatif	89	76.61	12.39	2
			$X^2_{pc} =$	23.72

Dans la table relative au X^2 , pour un seuil de signification de 5%, et un degré de liberté, $X^2_{(0.05)(1)} = 3.84$, d'où :

$$X^2_{pc} > X^2_{(0.05)(1)}$$

Il faut donc rejeter l'hypothèse H_0 , les variables Mortalité et présence d'HLV sont liées. De plus le calcul du seuil de signification pour $X^2_{pc} = 23.71$ est de $\alpha = 1.11 E^{-6}$, ce qui veut dire que l'on a $1.11 E^{-4}$ chances sur 100 de rejeter une hypothèse H_0 qui doit être acceptée.

Ainsi, on a pu constater que le résultat est différent selon que l'on effectue les calculs en fonction du nombre de lots positifs ou du nombre de pools positifs. Ceci vient du fait que dans un lot le nombre de pools varie de 3 à 12, donc la répartition des pools n'est pas homogène. Il est plus logique de raisonner sur le nombre de pools infestés.

On va s'intéresser maintenant à l'influence de la date de mise en eau des lots sur la présence d'HLV. Le tableau de contingence est le suivant :

Date de mise en eau regroupée par saison	Positif		Négatif		Total
	Obs	Th	Obs	Th	
Janvier, Février, Mars	2	5.9	32	28.1	34
Mai, Juin	25	16.15	68	76.85	93
Juillet, Août	2	6.95	38	33.05	40
Total	29		138		167

Les conditions d'application du test du Chi-deux sont respectées, car toutes les fréquences théoriques sont supérieures à 5.

Les hypothèses sont :

- H_0 : les variables date de mise en eau et présence d'HLV sont indépendantes,
- H_1 : les variables sont liées,

Condition de réalisation : si $X^2_{pc} < X^2_{(0.05)(2)}$ alors, on accepte H_0 sinon on accepte H_1 .

Calcul de X^2_{pc} :

Variable	$f_{obs} - f_{th}$	$(f_{obs} - f_{th})^2 / f_{th}$
J, F, M / Positif	- 4.28	2.92
J, F, M / Négatif	4.29	0.66
M, J / Positif	7.8	3.54
M, J / Négatif	- 7.8	0.80
J, A / Positif	5.39	3.93
J, A / Négatif	- 5.39	0.89
	$X^2_{pc} =$	12.74

Or $X^2_{(0.05)(2)} = 5.99$ d'où :

$$X^2_{pc} > X^2_{(0.05)(2)}$$

Il faut rejeter l'hypothèse H_0 et accepter l'hypothèse H_1 , les variables sont liées.

Dans le but de contrôler l'évolution des mortalités, nous avons réalisé, grâce au suivi des stocks qui avait été effectué par le laboratoire conchylicole et auquel j'ai participé, une cartographie du naissain présent sur les tables ostréicoles en zone A (annexe 3). Ainsi, nous avons visité, au mois de Juillet, 37 tables. Nous n'avons pas décelé de mortalités.

1.3. Conclusion :

- la température peut être plus ou moins liée au phénomène de maturation des huîtres et donc de façon indirecte sensibiliser et fragiliser celles-ci.

On peut donc développer l'hypothèse suivante : quand la température monte, l'huître respire davantage, ce qui entraîne une perte d'énergie. La filtration augmente également avec la hausse de température, jusqu'à un optimum situé entre 15 et 20 °C, puis elle baisse quand la température continue d'augmenter. Plus la température augmente, plus l'huître a des difficultés à se nourrir. A l'âge où elles peuvent être à maturité sexuelle, elles ont énormément de besoins énergétiques. Or elle risque à cette période-là de dépenser plus d'énergie que celle qui est emmagasinée, ce qui induit un déficit énergétique et par conséquent des mortalités dues à l'épuisement. Comme peu d'huîtres sont généralement matures avant l'âge de 1 an, elles ne sont donc pas toutes touchées par ce phénomène, ce qui peut expliquer les faibles mortalités.

- On retrouve également la relation entre la température et les mortalités lorsqu'on cherche à évaluer le lien entre les mortalités et la date de mise en eau. Nous avons vu que, par le test du Chi-deux, on obtenait une relation entre ces deux variables et que les mortalités intervenaient essentiellement en mai - juin, il est possible que les mortalités de cette période proviennent d'une difficulté d'acclimatation des coquillages. En effet, il faut rappeler que les huîtres proviennent essentiellement du bassin d'Arcachon qui ne connaît pas de températures aussi élevées que celles du bassin de Thau. Par la suite, le coquillage arrivant en Juillet voire Août est peut-être plus habitué aux températures élevées. La sortie effectuée en Juillet semble donc confirmer l'hypothèse d'acclimatation de coquillages puisqu'aucune mortalité n'a été relevée sur les tables visitées.
- Un autre facteur de stress pour l'animal qui peut aussi induire une mortalité est le transfert des coquillages. Ceux-ci voyagent en camion et hors de l'eau. De plus cette étape est généralement suivie pour la "une à

une" du collage. Ces éléments réunis ont une influence néfaste pour l'huître.

- Enfin, un facteur influençant la mortalité semble bien être l'herpès-like virus pour lequel nous avons pu démontrer grâce au test du Chi-deux, sa relation avec la mortalité. De plus, la température joue un rôle important dans le développement de l'herpès-like virus. C'est donc un facteur dont il faut contrôler et surveiller l'influence sur les mortalités.

Mais, il est toujours très difficile d'être affirmatif dans le cas de mortalités comme celles subies par les coquillages de l'étang de Thau. Nous ne pouvons à l'heure actuelle qu'émettre des hypothèses qui seront peut-être par la suite confirmées par des études menées en laboratoire. De plus, une meilleure connaissance de l'herpès-like virus permettra également de lever le voile sur bien des incertitudes.

2. Etude des mortalités estivales chez *Ostrea edulis* :

L'huître plate *Ostrea edulis* est victime depuis 1969 d'un protozoaire appelé *Martéiliose* qui se caractérise chez l'huître infestée par un amaigrissement et une décoloration de la glande digestive et qui conduit à des mortalités estivales.

Cette épizootie a fortement touché les stocks d'huîtres plates français, la production en Bretagne passant de 19 500 T en 1970 à 3608 T en 1976 avec l'avancée de la maladie (Données Aff. Mar in Grizel) . Entre 1976 et 1979, on peut assister à une reprise partielle de la production d'huîtres plates mais hélas en 1979, *Ostrea edulis* est victime d'un autre protozoaire, la *Bonamiose*, caractérisée par une indentation et une perforation des branchies et qui cause des mortalités massives et brutales dans les élevages à partir de 18 mois.

Les recherches de *Bonamia* et de *Marteilia* s'effectuent dans le cadre du réseau CEE Huîtres plates *Ostrea edulis* pour l'obtention de l'agrément des zones d'élevage, mais peuvent aussi être effectuées à la demande de professionnels qui désirent connaître l'état zoosanitaire de leur cheptel ou encore lors de mortalités anormales déclarées.

En 1996, 236 individus de l'étang de Thau ont été examinés et l'on n'a pas détecté de cas d'infestation par *Bonamia ostreae*. On peut également rappeler les résultats des examens de 1993, 1994 et 1995 où 4714 individus ont été examinés. Au total, dans le cadre du réseau CEE, 66 cas de *Bonamia* ont été décelés soit un taux de 1.4%.

Si l'on résume la situation actuelle concernant la présence de *Bonamia* et de *Marteilia* par zone CEE, on constate que :

- Zone 1 : pas d'examens pratiqués,
- Zone 2 : 0.3% d'infestation par *Bonamia*, absence de *Marteilia*,

- Zone 3 : 2.2% d'infestation par *Bonamia* et présence de *Marteilia* ;
- Zone 4 : 0.2% d'infestation par *Bonamia* et 21% d'infestation par *Marteilia*.

Le taux d'infestation global est donc relativement faible. C'est l'étang de Thau qui a le taux le plus élevé. Cette présence plus importante de *Bonamia* sur le site de l'étang de Thau s'explique par le fait que l'étang de Thau est le seul lieu d'élevage de la Méditerranée et donc les infestations par *Bonamia* sont plus présentes en raison des transferts de coquillages. Ceci explique les efforts d'analyse et de suivi qui sont réalisés sur les mortalités qui touchent les huîtres plates et la relation que celles-ci peuvent avoir avec la présence de *Bonamia*.

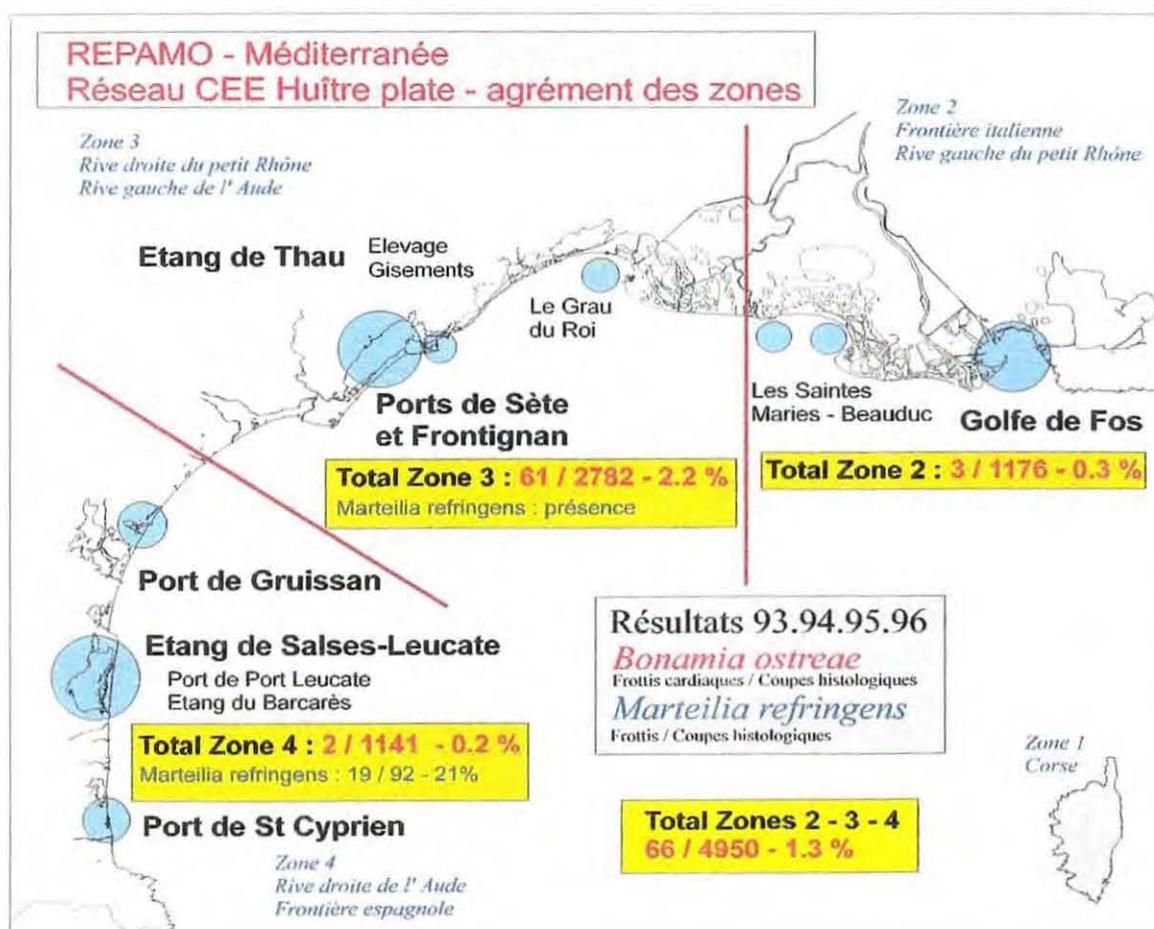


Figure 20 : Présentation des résultats du réseau CEE Huître plate.

2.1. Méthodes de diagnostic :

Les examens se font sur des animaux adultes ou sur du naissain. Les techniques de diagnostic les plus couramment utilisées pour la mise en évidence d'un pathogène chez les mollusques sont les frottis et l'histologie.

Pour la détection de *Bonamia*, une méthode est employée, il s'agit de l'examen de frottis cardiaques.

□ Les frottis :

La méthode est assez simple. On prélève le cœur d'une huître plate que l'on va apposer sur une lame afin de laisser une empreinte du tissu comme un décalquage. Ensuite, les tissus sont fixés quelques secondes puis colorés par trempage dans un bain d'éosine puis de bleu de méthylène. Les lames sont alors séchées, l'examen au microscope peut commencer.

2.2. Résultats du suivi :

2.2.1. Expériences menées en 1996 : Programme huîtres plates 95/96.

Quatre lots d'huîtres plates ont été suivis sur quatre sites de l'étang de Thau afin de comprendre la cause des mortalités subies par ces huîtres. 3 lots d'huîtres provenaient de la pêche par dragage dans l'étang de Thau, 1 lot provenait de dragage en Atlantique. Des comptages de mortalité et des prélèvements ont été effectués tous les deux mois sauf en période estivale où la mortalité est la plus marquée et où les prélèvements ont eu lieu mensuellement. Des analyses biométriques, biochimiques et un examen zoosanitaire ont été réalisés.

Les résultats de suivi de la survie sont les suivants :

Date	Survie correspondant au nombre de vivantes restantes			
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4
17/10/95	100	100		
15/11/95	99		100	
11/12/95	96	96	99	
28/02/96	88	91	98	
16/04/96	88	87	96	
12/06/96				100
26/06/96	70	80	86	89
16/07/96	69	73	82	83
20/08/96	65	31	56	71
26/09/96	58	26	44	31
23/10/96	54	23	42	18
27/11/96	52	22	42	17

A partir de ce tableau, on va pouvoir comparer les taux d'infestation avec les mortalités observées :

Date	Taux d'infestation par <i>Bonamia ostreae</i> sur 1200 individus observés			
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4
17/10/95	0	0		
11/12/95	0	0	0	
28/02/96	0	0	0	
16/04/96	0	0	0	
12/06/96	0	0	0	
16/07/96	0	17	21	0
20/08/96	0	11	10	8
26/09/96	13	20	6	6
23/10/96	7	4	10	18
27/11/96	13	7	8	7

D'ores et déjà, on remarque que les mortalités sont observées à partir du mois de Juillet et l'infestation par *Bonamia* est justement apparue à la même date. De plus, le lot 1 infesté plus tardivement (26/09/96) est celui qui subit le moins de mortalité.

Après observation de la température de l'étang en 1995/1996, il semble que les montées de températures puissent être le facteur déclenchant des mortalités, lié à l'accumulation de stress provoqué par le collage et le transfert en étang.

Enfin, le lot 4 originaire de Bretagne semble être celui qui résiste le moins aux fortes montées de température.

2.2.3. Point sur la situation en 1997 :

A la suite de nombreux travaux pour promouvoir la culture des huîtres plates en Méditerranée, un constat a été fait :

- d'une part, il est difficile de s'approvisionner en naissain d'huîtres plates,
- d'autre part, les élevages subissent des mortalités importantes durant l'été (Travaux menés en 1995/1996).

Des études ont été prévues pour l'année 1997 afin de comprendre les causes de ces mortalités. A cet effet, deux hypothèses ont été émises :

- les huîtres plates provenant pour la plupart d'atlantique, il est possible que la souche atlantique ait une résistance plus faible aux conditions environnementales de l'été que la souche méditerranéenne.
- De plus, le Bonamia présent dans les huîtres mises en élevage pourrait induire ces mortalités.

Afin de vérifier ces hypothèses, quatre lots d'huîtres de différentes origines ont été mis en élevage dans les mêmes conditions, il s'agit :

- d'un lot d'huîtres tolérantes au Bonamia provenant de la sélection d'huître plate pour leur résistance à la Bonamiose,
- d'un lot d'huîtres atlantique provenant de Bretagne,
- d'un lot d'huîtres méditerranéennes provenant du gisement naturel de Carteau,
- d'un lot d'huîtres de l'étang de Thau provenant de son gisement naturel.

Des visites ont lieu tous les quinze du mois, à partir d'avril jusqu'en Décembre, ceci afin d'effectuer le prélèvement de 30 individus par lot et procéder au comptage de la mortalité. Ensuite, des analyses biométriques sont réalisées afin d'apprécier la croissance des différents lots. Ces analyses permettent également de pratiquer une observation macroscopique des gonades et de déterminer le stade de maturation et l'influence que cela peut avoir sur le coquillage en terme de fragilisation.

Les résultats du suivi de la mortalité sont les suivants :

	Tol	Bret	Thau	Méd
Avril	98	96.3	97.3	94
Juin	96 (-2)	82.7(-13.6)	91.7(-5.6)	83(-11)
Juillet	92 (-4)	79(-3.7)	90(-1.7)	79(-4)
Août	78 (-14)	62(-17)	86(-4)	74(-5)
Total	-20 pts	-34.3 pts	-11.3 pts	- 20 pts

On constate, de façon similaire aux expériences menées en 1995/1996, que les huîtres de Bretagne sont celles qui subissent le plus de mortalité puisqu'en cinq mois, elles ont perdu 34.3% d'huîtres. De plus, la baisse du taux de survie intervient plus rapidement qu'en 1996.

Plusieurs tendances apparaissent , deux lots subissent de fortes mortalités durant la période de passage du mois d'avril au mois de Juin (lot Bretagne et lot

Méditerranée). La mortalité se réduit par la suite pour trois lots (Bretagne, Méditerranée et Thau) alors qu'elle ne cesse d'augmenter pour les résistantes. Enfin, le lot de Bretagne voit sa mortalité à nouveau augmenter alors que pour le lot Thau et Méditerranée, elle semble se stabiliser.

On peut en tirer certaines conclusions, les huîtres de Thau sont apparemment les plus résistantes aux conditions environnementales avec les huîtres de Méditerranée. Ceci peut s'expliquer par l'origine de lots. Ainsi, les huîtres de Thau et Méditerranée sont plus habituées aux températures estivales et s'acclimatent plus facilement. Par contre les huîtres résistantes et les Bretagne supportent mal les hausses de température.

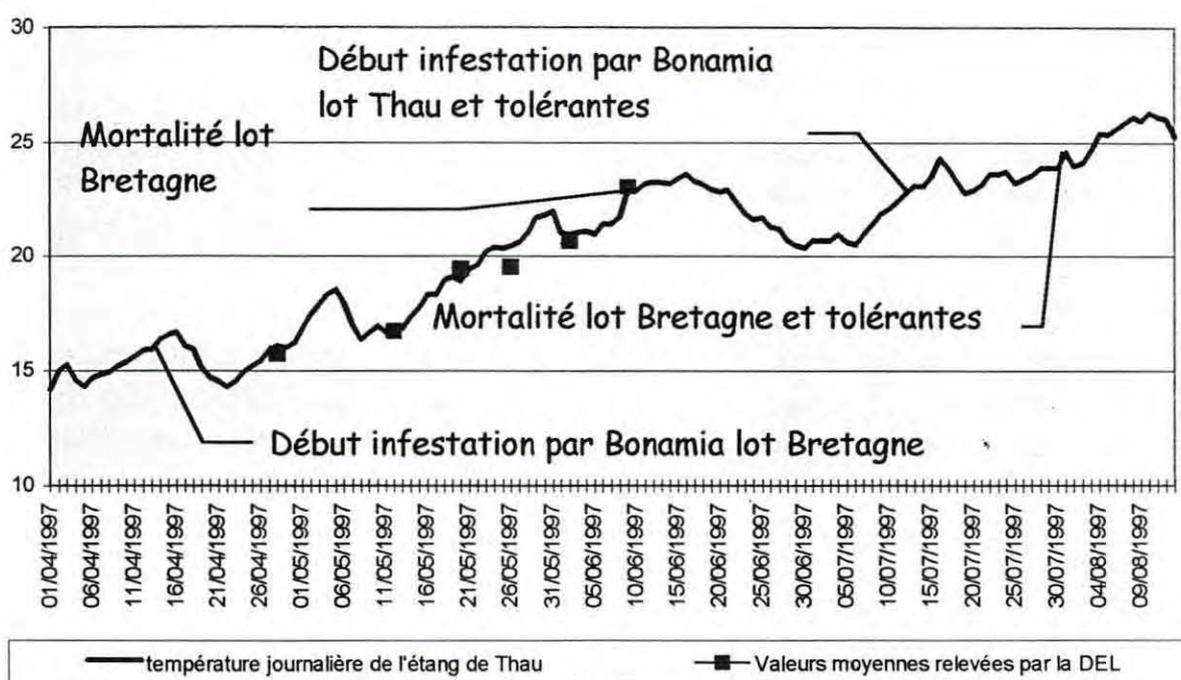


Figure 21 : températures de l'étang et relation avec les mortalités et la présence de Bonamia

En ce qui concerne le suivi de Bonamia, 470 frottis cardiaques ont été pratiqués qui après lecture ont permis d'obtenir les résultats suivants :

Origine	Résistante	Bretagne	Carteau	Thau
Date				
15/04/97	0/29	2/30 (7%)	1/27 (4%)	0/30
16/06/97	0/30	3/30 (10%)	0/30	0/30
15/07/97	2/30 (7%)	4/30 (13%)	0/30	1/28 (4%)
15/08/97	1/29 (3.5%)	2/27 (7.5%)	0/30	1/30 (3%)
Total	3/118(2.5%)	11/117(9.4%)	1/117(0.8%)	2/118 (1.7%)

On constate donc que les huîtres de Carteau sont celles qui présentent le plus faible taux d'infestation par *Bonamia* suivies par les huîtres de Thau. Par contre, les huîtres de Bretagne sont fortement infestées par *Bonamia*. De plus, les fortes mortalités chez les lots Bretagne et Résistantes apparaissent au moment où les taux d'infestation par *Bonamia* sont élevés ou ont été élevés durant le mois précédent.

Enfin, les huîtres résistantes sont partiellement infestées par *Bonamia* mais ont un taux de mortalité plus élevé que les huîtres de Thau. Une première approche consisterait donc à dire que les huîtres qui semblent les plus disposées à résister à la fois au *Bonamia* et aux conditions environnementales de l'étang de Thau en vue d'une relance de l'élevage de l'huître plate semble être l'huître de l'étang de Thau et l'huître de Carteau.

Pour avoir une vision plus juste, il faut comparer les températures de l'étang en 1996 et 1997 pour vérifier l'influence que celle-ci peut avoir sur les mortalités et le développement de *Bonamia*.

On constate que les températures sont moins élevées cette année qu'en 1996. De plus, elles ont subi des fluctuations beaucoup plus importantes en 1996. Ces différences constatées peuvent déjà en partie expliquer les différences de taux de mortalité puisque les huîtres n'ont pas eu cette année à supporter des températures trop élevées par rapport à l'an dernier.

Dans l'ensemble, les lots sont moins infestés par *Bonamia* qu'en 1996 et les taux de mortalité sont également moins élevés.

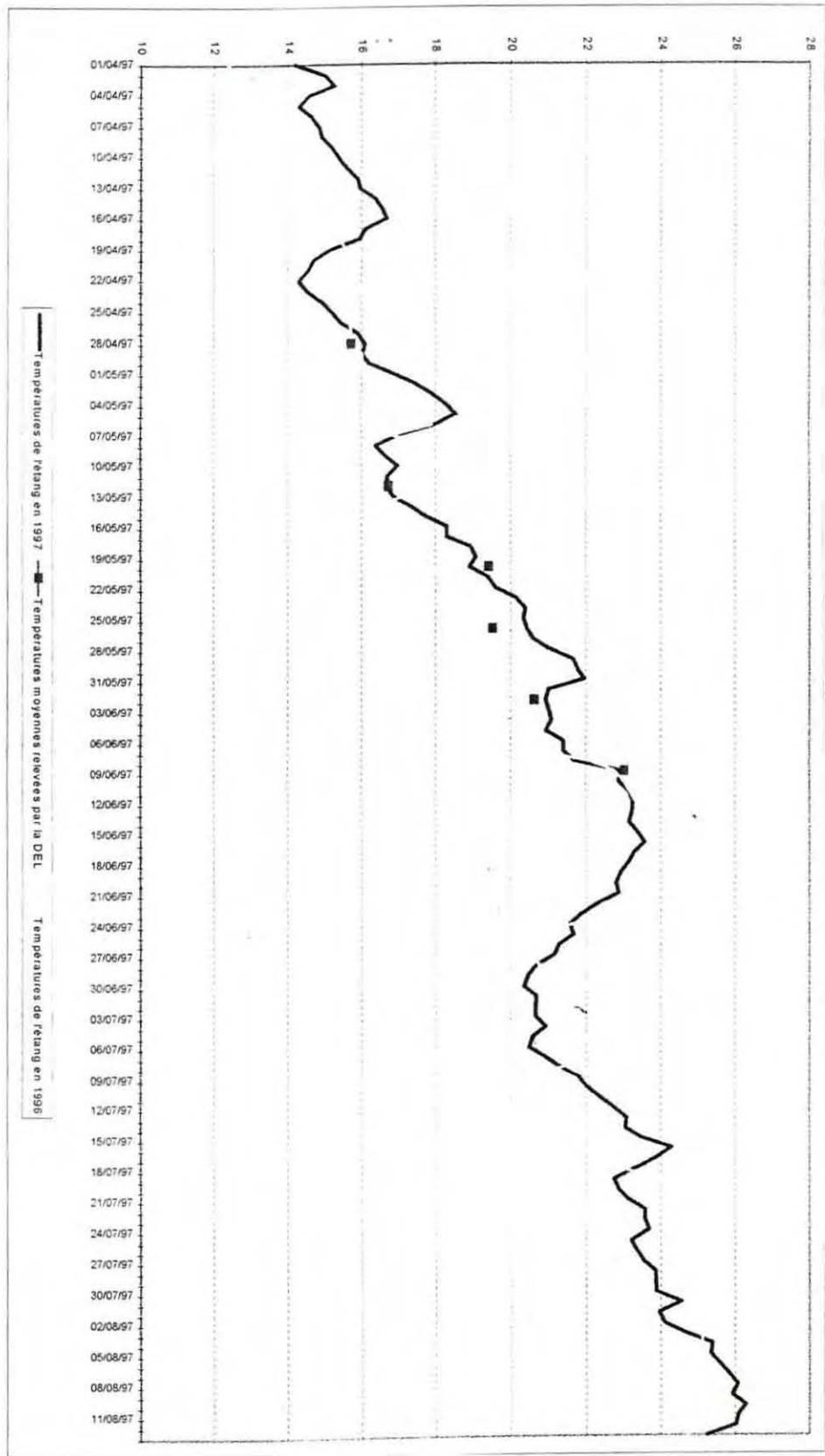


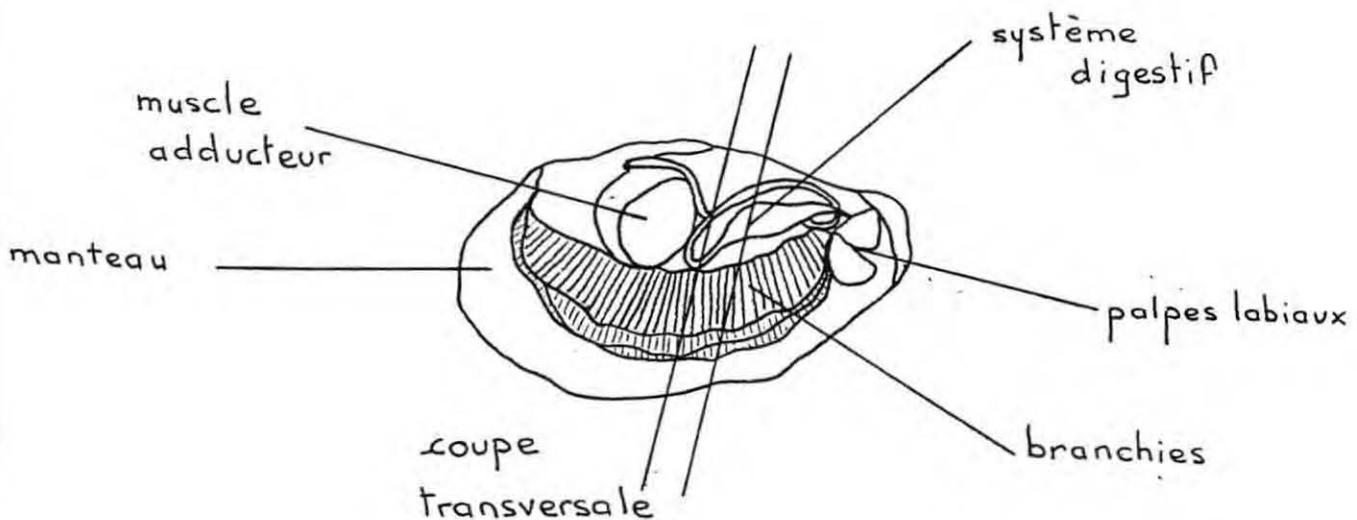
Figure 22 : Températures de l'eau en 1996 et 1997

2.3. Autres mortalités constatées :

Nous avons été amenés dans le cadre du suivi de la mortalité estivale d'*Ostrea edulis* à analyser par histologie les lots d'huîtres plates : 9724, ,9750,9752-E,9753.

2.3.1. Les méthodes histologiques :

On prélève une tranche de l'individu en pratiquant une coupe transversale permettant ainsi d'avoir sur une même coupe, les branchies, le manteau et la glande digestive.



Ensuite, le prélèvement est fixé en fonction de l'étude qui va être faite :

- histologie classique : fixation au Davidson,
- microscopie électronique : fixation au Carson.

Nous avons pratiqué des fixations par le liquide de Davidson.

2.3.1.1. Inclusion à la paraffine :

Les tissus après avoir été prélevés et placés en fonction de la taille dans des tubes de type Eppendorf ou dans des piluliers sont fixés dans le liquide de Davidson composé de :

- | | |
|--------------------|-----------|
| • eau de mer | 3 volumes |
| • alcool éthylique | 3 volumes |
| • formol à 40% | 2 volumes |
| • glycérine | 1 volume |

- acide acétique à 10% rajouté au moment de l'emploi

En fonction de la taille des individus, la fixation s'effectue durant 24 à 48 h.

Ensuite, les pièces sont déshydratées par trempage dans trois bains successifs d'alcool :

- alcool à 70° : 3 x 6 h
- alcool à 95 ° : 3 x 6 h
- alcool absolu : 3 x 6 h

L'alcool est éliminé par un bain de Butanol (3 x 12 h ou séjour indéterminé). Enfin, la pièce est placée à l'étuve dans de la paraffine 58°.

2.3.1.2. Préparation des coupes :

Les animaux sont alors inclus à la paraffine, dans des cassettes porte objet, qui servent à fabriquer un bloc. Celui-ci est ensuite débarrassé de l'excès de paraffine avec une lame de scalpel afin de dégager un prisme de forme trapézoïdale. On peut alors pratiquer des coupes d'environ 5 μm à l'aide d'un microtome type Minot. Ce système de coupe offre la possibilité de faire des coupes fines et qui se soudent entre elles pour former un ruban. Une coupe sera prélevée et déposée au milieu d'une lame dans un liquide d'étalement, ici en l'occurrence de l'eau distillée. La lame sera placée sur une platine chauffante, puis égouttée et séchée à l'étuve.

2.3.1.3. Coloration des coupes :

Afin de pouvoir observer les tissus au microscope photonique, il est nécessaire de procéder à une coloration des coupes. Les types de coloration varient en fonction de ce que l'on veut observer.

Avant coloration, il faut en premier lieu débarrasser les coupes de la paraffine ayant servi à l'inclusion. Pour cela les lames sont traitées pendant 10 mn dans deux bains successifs de toluène, solvant de la paraffine. Ensuite, on élimine le solvant en traitant les lames par deux bains d'alcool éthylique. Les lames sont alors rincées longuement à l'eau courante en borrel pour être réhydratées. La coloration peut avoir lieu.

On utilise dans ce cas la coloration au trichrome de Masson :

Les coupes sont colorées à l'hématoxyline de Groat¹⁰ pendant 5 mn, puis lavées à l'eau courante. Ensuite, elles subissent une coloration par le mélange Fuchsine - Ponceau¹¹ pendant 5 mn et sont rincées à l'eau acétique. La troisième coloration se fait à l'orangé - G molybdique pendant 5 mn et les lames sont à nouveau rincées à l'eau acétique. Enfin, la dernière coloration fait intervenir le vert lumière pendant 5 mn et

¹⁰ Préparation présentée en annexe 4.

¹¹ Préparation présentée en annexe 5

l'on rince à l'eau acétique. Enfin, les coupes sont déshydratées. L'examen au microscope peut commencer.

2.3.2. Résultats des examens :

Les résultats des examens ainsi que les caractéristiques des lots sont présentés dans le tableau suivant :

N° lot	Nb individus	Date prélèvement	lieu d'élevage	type de fixation	Examen	Résultat
9724	30	04/06/97	Thau	Davidson	cœur	2 Bonamia
9750	10	07/07/97	Thau	Davidson	coupe transversale (GD, M, BR)	4 Bonamia
9752-E	24	15/07/97	Leucate	Davidson	coupe transversale (GD, M, BR)	1 Marteilia
9753	30	17/07/97	Thau (origine éclosérie)	Davidson	coupe transversale (GD, M, BR)	RAS

Ainsi, nous pouvons constater qu'il y a peu de Marteilia qui a été découvert (1 cas sur 64 individus examinés sur coupe transversale). En effet, il semble que de façon générale, les huîtres plates soient peu porteuses de Marteilia dans le bassin de Thau. On peut parfois en signaler la présence mais en très faible proportion.

Toutefois, la présence de Marteilia ou de Bonamia dans les coquillages examinés ne permet pas de conclure à la relation entre la présence des parasites et la mortalité observée. De plus, nous manquons d'éléments pour pouvoir analyser au mieux les causes de cette mortalité.

CONCLUSION

Discussion-Conclusion

Le travail réalisé au cours de ce stage avait pour but de permettre l'étude des causes de mortalité chez les huîtres creuses *Crassostrea gigas* et chez les huîtres plates *Ostrea edulis*. Plusieurs axes ont été définis en relation avec les études menées par l'IFREMER.

La première partie de ce travail a été focalisée sur la connaissance des principaux agents pathogènes de *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*. Trois agents ont été isolés, il s'agit de l'herpès-like virus soupçonné d'être la cause de mortalités importantes chez le naissain d'huîtres creuses, de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* à l'origine de nombreux cas de mortalité de l'huître plate *Ostrea edulis*. Cela permet ainsi de mieux comprendre leur développement à l'intérieur de leur hôte et les conséquences qu'ils peuvent entraîner sur le plan physiologique.

La deuxième partie de ce rapport est constituée par le travail personnel réalisé durant mon stage. Il s'agissait de mettre en oeuvre des méthodes d'analyse de la mortalité estivale de 1997 et d'exprimer les résultats obtenus.

Ainsi, au cours des mois de Juin et Juillet, nous avons pu analyser environ 850 individus dans le cadre du suivi de la mortalité estivale chez *Crassostrea gigas*. Ces 850 individus étaient regroupés par pools et nous avons donc pu répertorier 32 pools positifs et 141 pools négatifs. Le but était avant tout d'essayer de prouver l'existence d'une relation entre la présence d'HLV et les mortalités constatées. Pour cela, des analyses statistiques basées sur le test du Chi-deux ont été pratiquées. Ainsi, nous avons pu démontrer que les variables présence d'HLV et mortalité étaient liées ($X^2 = 23.72$, ddl = 1, $p = 1.11 \times 10^{-6}$) tout comme les variables date de mise en eau et présence d'HLV ($X^2 = 12.74$, ddl = 2).

Nous avons donc émis des hypothèses concernant les facteurs possibles d'induction de mortalité. Il semble presque certain que les paramètres zootechniques suivants jouent un rôle primordial :

- la température joue un rôle indirect dans les mortalités, car elle accélère le métabolisme des individus. De plus, les températures de l'eau étant plus élevées dans le bassin de Thau que dans les bassins d'où provient le naissain, il existe un problème d'acclimatation des coquillages.

- L'âge de l'animal est également important puisque ce sont principalement les huîtres jeunes (naissain) qui sont touchées.

- Les individus en gamétogénèse peuvent aussi être fragilisés, car c'est une période à forte consommation énergétique et qui affaiblit l'organisme et le rend ainsi plus vulnérable.

- Le stress provoqué par le transfert des coquillages ou par le collage est aussi soupçonné.

Toutefois, même si ces paramètres peuvent être considérés comme des facteurs favorisant la mortalité, ils ne peuvent pas l'expliquer en totalité. Ainsi, lorsque des disparités existent dans les mortalités comme c'est le cas ici, il est alors logique de soupçonner la présence d'un agent viral, en l'occurrence, nous avons pu démontrer la présence d'HLV dans de nombreux pools présentant des mortalités. Sachant que la température ou le stress peuvent provoquer le passage de l'état latent du virus à un état peu productif voire à un état d'infection aiguë, les mortalités pourraient peut-être, être en partie expliquées.

Le suivi de la mortalité estivale chez *Ostrea edulis* nous a permis d'identifier 16 cas de *Bonamia* parmi 470 individus examinés. Cette année, le taux d'infestation par *Bonamia* est donc relativement faible (3.4%) par rapport à 1996. On peut expliquer cette différence par la température moins élevée en 1997 par rapport à 1996. Toutefois, il faut rester prudent, car de nombreuses huîtres se sont décollées ou sont mortes et ne contenaient plus de chair permettant d'identifier la cause du décès, les prélèvements en vue de recherche de *Bonamia* sont effectués sur les huîtres restantes et vivantes, on ne peut donc pas établir de relation entre la mortalité et l'infestation par *Bonamia*.

Il est toujours extrêmement difficile de combattre les maladies dont sont victimes les mollusques. Nous ne disposons à l'heure actuelle que de peu de moyens. En effet, les huîtres possèdent un système de défense immunitaire assez particulier. Contrairement aux vertébrés et aux êtres humains, elles ne possèdent pas de lymphocytes à l'origine des réponses immunitaires. Seul, le mécanisme de phagocytose permet de lutter contre les corps étrangers.

Ainsi, pour lutter efficacement contre les maladies qui affectent les coquillages, les chercheurs ont tenté de trouver des "remèdes". De nombreux programmes de recherche ont été mis en oeuvre afin de pallier aux mortalités que subissent les coquillages :

- *en génétique*, on cherche à sélectionner et isoler des souches résistantes aux parasites, par exemple pour le *Bonamia* (études réalisées en 1997 chapitre sur les mortalités estivales chez *Ostrea edulis*),
- *en pathologie*, on est désormais capable de reproduire en laboratoire l'infection virale par l'herpès-like virus. Ainsi, il est possible d'induire la maladie à des larves cette étape conduira très probablement à la confirmation du pouvoir pathogène de ce virus pour le naissain,

- *en physiologie*, on teste les réactions des coquillages à différents stress environnementaux,

- *en zootechnie*, on tente d'améliorer les techniques d'élevage après identification des facteurs favorisant les mortalités et le développement des agents pathogènes.

De plus, des directives visant à réglementer les transferts de coquillages d'une zone à l'autre ont été mises en place.

Mais il faut savoir que l'élimination pure et simple d'un pathogène est impossible à l'heure actuelle et avec les moyens dont nous disposons. En effet, nous sommes dans l'impossibilité de créer un vaccin qui pourrait être inoculé aux huîtres en raison de leur système de défense immunitaire. On ne peut également pas techniquement traiter directement dans le milieu qui est trop vaste. Pour limiter l'impact des parasites sur les coquillages, seules deux actions sont possibles :

- la destruction totale du cheptel dans les zones atteintes,
- la prévention qui passe par la responsabilisation des professionnels.

Quelques règles simples devraient être respectées :

- observer régulièrement ses coquillages (amaigrissement, lésions visibles à l'oeil nu,
- signaler à l'IFREMER toute mortalité et phénomène anormal dès leur apparition,
- s'informer sur les risques potentiels,
- ne jamais effectuer de transfert ou de vente pour l'élevage en cas de mortalité,
- ne jamais introduire des coquillages en provenance de pays non agréés sans autorisation, en effet il est indispensable d'appliquer les dispositions réglementaires mises en place (Directive n° 91/67/CEE du 21/01/91).

En conclusion, je dirais que ce stage m'a énormément apporté tant sur le plan des connaissances pathologique que moralement. En effet, faisant partie du milieu conchylicole, j'ai franchi la barrière et j'ai pu observer et participer au travail qu'effectue l'IFREMER pour préserver la qualité du bassin de Thau. La pathologie est un domaine ô combien passionnant mais à la fois assez frustrant, car peu de moyens sont à notre disposition pour combattre efficacement les maladies des coquillages. De nombreux horizons restent encore à explorer avec l'espoir qu'un jour, nous serons un peu moins impuissants face à la nature et ses méfaits.

Bibliographie

Amanieu M, Legendre P., Trousselier M., Frisoni G.F. (1989), *Le programme Ecothau : théorie écologique et base de modélisation*, in *Océanologica acta*, vol12, N° 3, p 189-200.

Antona M. (1993), *Données économiques sur la Conchyliculture française*, in *Coquillages*, I.T.S.V.F., 129-146.

Austin farley C., Banfield W.G., Kasnic jr G. et Foster W.S. (1972), *Oyster Herpes-type virus*, in *Sciences*, vol 178, p759-760.

Bethesda, MD : Department of Health and Human services (1992), *Polymerase chain reaction - Xerosing DNA*, in *News tools for tomorrow healthResearch*. Article Internet, p 1-2.

Bloom M.V., *Polymerase Chain reaction*, Carolina Biological Supply Company. Article Internet, p 1-9.

Bonami J.R., Vivares C.P., Bréhélin M. (1985), *Etude d'une nouvelle haplosporidie parasite de l'huître plate ostrea edulis : Morphologie et cytologie de différents stades*, *Protistologica* T. XXI, fasc 2, p 161-173.

Bréhélin M., Bonami J.R., Cousserans F., Vivarès C.P. (1982), *Pathologie animale - Existence de formes plasmodiales vraies chez Bonamia ostreae parasite de l'huître plate Ostrea edulis*, *C. R. Acad. Sc. Paris t 295*, p 45-48.

Caceres-Martinez J., Robledo J.A.F, Figueras A. (1995), *Presence of Bonamia and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster ostrea edulis, in the ria de Vigo, Galicia*, *Aquaculture* 130, p 15-23.

Comps M., Cochenec N. (1993), *A Herpes-like virus from european oyster Ostrea edulis*, *Journal of invertebrate pathology* 62, p 201-203.

Comps M., Pichot Y. & Deltreil JP. (1980), *Mise en évidence d'une microsporidie parasite de Marteilia refringens agent de la maladie de la glande digestive de Ostrea edulis*, *Rev. Inst. Pêches marit.*, 43 (4), 409-412.

Dabat M.H., D'artigues M., Garrabe M., Gigaroff H., Girardin M. et Girin M. (1992), *Etudes régionales à caractère socio-économique dans le secteur de la pêche et de l'aquaculture*, COFREPECHE Centre d'Etudes et de projets avec la participation d'IFREMER

Deslous-Paoli J.M. (1994), *Les lagunes méditerranéennes*, Equinoxe N° 50, p 4 - 9.

Elziere Papayanni P. (1993), *Evolution des connaissances sur la pathologie des coquillages*, in Coquillages, I.T.S.V.F., 147-188.

Erlich H.A., (1992), *PCR technology, Principles and applications for DNA Amplification*, W.H. Freeman & Co, 7-38.

FAO (1993), *Production de l'Aquaculture*, Rev. 5.

Fauvel Y. (1985), *L'ETANG DE THAU / COMPETITION DANS L'EXPLOITATION, UNE REDITE*, IFREMER DRV-SDA.

Fauvel Y. (1986), *Du golfe du Lion à l'étang de Thau, tribulations d'une huître indigène*, IFREMER DRV-SDA.

Fouche D. (1997), *Etat des connaissances sur la pathologie chez les mollusques bivalves*, R. Int. DEL, La Tremblade.

Galstoff P.S. (1964), *The american oyster Crassostrea virginica Gmelin*, Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service, vol. 64.

Giovannoni V. (1987), *Des jardiniers de l'eau, Genèse d'une culture, La conchyliculture à Bouzigues*, mémoire de maîtrise, Université paul valery Montpellier III.

Griffais R. (1993), *Amplification enzymatique de l'ADN (P.C.R)*, Institut Pasteur, Laboratoire des Chlamidiales et des Rickettsiales.

Grizel H. (?), *Epidémiologie des bivalves*, Com. Int.

Hamon P.Y. et Pichot Y. (1994), *La conchyliculture en Méditerranée*, 1^{ère} et 2^{ème} partie, Equinoxe N° 53 p 25-35 et 54 p 21-32.

Hervio D. (1992), *Contribution à l'étude de Bonamia ostrea (Asctospora) protozoaire parasite de l'huître Ostrea edulis (Bivalvia), et à l'analyse des interactions Hôte - parasite*, Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand.

Laboratoire de génétique , Aquaculture et pathologie Unité de recherche en pathologie et immunologie générales La Tremblade (1996), *Session de formation à l'utilisation de la technique PCR pour le diagnostic de l'infection à Herpesvirus chez les huîtres, de la théorie aux petites recettes*, Publ. int. IFREMER.

Lairmore T.C. (1990), *Method : Polymerase chain reaction*, article Internet, p1-3.

Larzul D. (1989), *La PCR : Principes et applications*, Immunianal.Biol. Spéc., 16,19-28.

Larzul D.(1993), *La PCR un procédé de répliation in vitro*, Coll. Genie génétique G2, Technique et documentations Lavoisier, 23-67, 237-244.

Le Deuff R.M.(1995), *Contribution à l'étude de virus de mollusques marins : Iridovirus et Herpesvirus. Description et Caractérisation biochimique, cycle de multiplication viral, diagnostic et étude épidémiologique*. Thèse de doctorat, U.F.R. biochimie et Biologie cellulaire Bordeaux II.

Le Deuff R.M., Nicolas J.L., Renault T & Cochennec N (1994), *Experimental transmission of a Herpes-like Virus to axenic larvae of pacific Oyster, Crassostrea gigas*, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14(2),69-72.

Le Deuff R.M., Renault T, Gérard A. (1996), *Effects of temperature on Herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster. Crassostrea gigas*, Dis aquat. org. Vol 24, p 149-157.

Maurin C. (1977), *La conchyliculture française*, Rev. Travaux Inst. Pêches Mar. Tome XL fascicule 2, p 153-347.

Mazouni N. (1995), *Influence des élevages ostréicoles sur le fonctionnement d'un écosystème lagunaire méditerranéen. Etude in situ de l'influence des filtreurs (coquillages et épibiontes) sur les flux de matières particulaire et dissoute*, Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée Aix- Marseille.

Montes J., Anadon R., Azevedo C. (1994), *A possible cycle for Bonamia ostreae on the basis of electron microscopy studies*, Journal of invertebrate pathology 63, p 1-6.

Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachère E., Mialhe E. et Grizel H. (1992), *Interactions between Bonamia ostreae (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of Ostrea edulis and Crassostrea gigas (Mollusca: Bivalvia) in vitro system establishment*, Journal of invertebrate pathology 59, p 235-240.

Perkins F.O. (1976 a), *Ultrastructure of sporulation of the european flat oyster pathogen Marteilia refringens. Taxonomic implications*. Journ. Protoz. (23) 1, p 64-74.

Perkins F.O. (1988), *parasite morphology, strategy, and evolution, structure of protistan parasites found in bivalve molluscs*, American Fisheries Society Special Publication N° 18, p 93-11.

Perraudin Christophe, *La maladie hémocytaire de l'huître plate à Bonamia Ostreae*, Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

Pichot P., Juge C., Guillou J.L. (1990), *La « malaïgue de l'été 1990 dans l'étang de Thau*, Pub. Int. IFREMER

Pichot Y. (1984), *Contribution à l'étude des protozooses de l'huître plate Ostrea edulis*, Thèse de doctorat, USTL Montpellier.

Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H. & Rabouin M.A. (1979), *Recherches sur Bonamia Ostrea Gen. N., SP. N., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L.*, Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 (1), 131-140.

Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., Raboin M.A. (1980), *Recherches sur Bonamia ostreae GEN. N. SP. N., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L.*, Rev. Trav. Pêches marit., 43(1), p 131-140.

Pichot Y., *Polymerase Chain Reaction (réaction d'amplification enzymatique) Technique*, Com. pers.

Pichot Y., Comps M., Deltreil J.P. (1979), *Recherches sur Haplosporidium sp.(Haplosporida - Haplosporidiidae) parasite de l'huître plate Ostrea edulis L.*, Rev. trav. Inst. Pêches marit., 43 (4), 405-408.

Quignard J.P., (1997), *Pourquoi gérer et aménager les lagunes ?*, cours du Master Chef de Projet et d'Exploitation en Aquaculture CREUFOP.

Raimbault R. (1984), *La conchyliculture en Méditerranée française*, Haliotis, Rev. Sté française de malacol. Vol 14.

Renault T (1997), *La traque des chercheurs*, in L'ostréiculteur français, Mars- avril 1997 N° 105, p 33-34.

Renault T., Cochenec N., Grizel H. (1995), *Bonamia ostreae*, parasite of the european flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the japanese osyster *Crassostrea gigas*, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15(3), p 78-80.

Renault T., Lipart C., Le Deuff R.M., Chollet B. & Haffner P. (1996), *Synthèse des résultats concernant l'étude du virus de type herpes et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection*, Pub. int. IFREMER..

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

Tony s. Ma, MD, PhD (1995), *Applications and limitations of Polymerase Chain Reaction Amplification*, reprinted from CHEST vol.108, 1393-1404.

Tournier H., Audabram D., Landrein S. et Deslous-Paoli J.M. (1990), *L'oxygène en été dans l'étang de Thau, Contribution à l'étude du risque de malaigues*, Pub. Int. IFREMER.

Annexe - 1 Présentation des techniques de détection : La PCR

1 Introduction :

La PCR ou Polymerase Chain Reaction est une technique utilisée pour amplifier le nombre de copies d'une région spécifique de l'ADN dans le but de produire suffisamment d'ADN pour que le diagnostic soit possible. Elle a été découverte en 1983 par Kary Mullis et présentée à la communauté scientifique en 1985. Depuis, c'est une des techniques les plus utilisées en biologie moléculaire.

2 Qu'est ce que la PCR ?

C'est une réaction enzymatique de polymérisation de l'ADN, c'est à dire : on amplifie spécifiquement une séquence d'ADN double brin par action cyclique d'une enzyme Polymerase. Les copies d'ADN néosynthétisées servent ensuite de matrice au cours des cycles d'amplification suivants. Chaque cycle d'amplification permet de doubler le nombre de copies de la séquence cible. Ainsi, une PCR étant constitué de 30 à 35 cycles, on obtient finalement 2^{30} à 2^{35} copies (plus d'un milliard de copies). Une réaction en chaîne s'établit donc par la répétition des trois étapes du cycle.

3 La structure d'ADN :

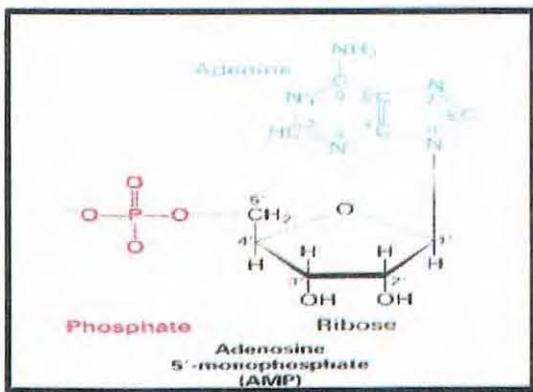


Figure 1 : Exemple de nucléotide

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de nucléotides. Il est présent normalement à l'intérieur des cellules sous la forme d'un complexe de deux bandes de polynucléotides, qui, à un niveau moléculaire, se complètent l'une et l'autre. Les deux bandes de polynucléotides sont composées d'un sucre : le désoxyribose (ou ribose pour l'ARN), d'une base et d'un phosphate.

L'ADN utilise quatre bases pour générer un code à quatre lettres :

- Adénine,
- Thymine,
- Cytosine,
- Guanine.

qui forment des paires complémentaires, c'est-à-dire : l'Adénine va s'associer avec la Thymine et la Guanine va s'associer avec la Cytosine.

Les deux brins d'ADN sont orientés anti-parallèlement et tournent sur eux-mêmes afin de former une double hélice en raison des contraintes géométriques liées aux bases.

Les extrémités de chaque brin sont désignées par 3' et 5' rappelant ainsi que les phosphates relient le carbone 3' d'un sucre au carbone 5' d'un autre. Ceci apporte une polarité à la chaîne de nucléotides et impose un sens de lecture. Ainsi, les polarités des deux brins d'ADN sont inverse l'une de l'autre et le code d'un des brins est le complément inverse du code de l'autre (fig. 14).

Figure 2 : Appariement spécifique des bases puriques et pyrimidiques

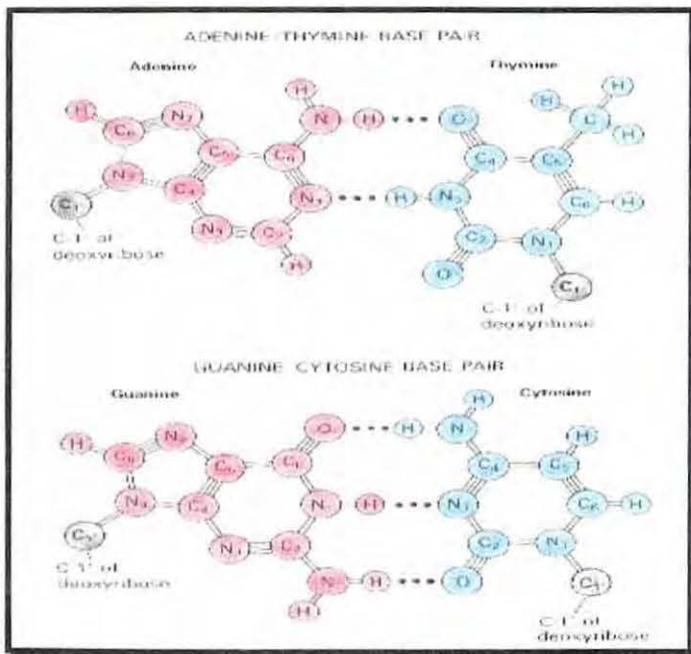
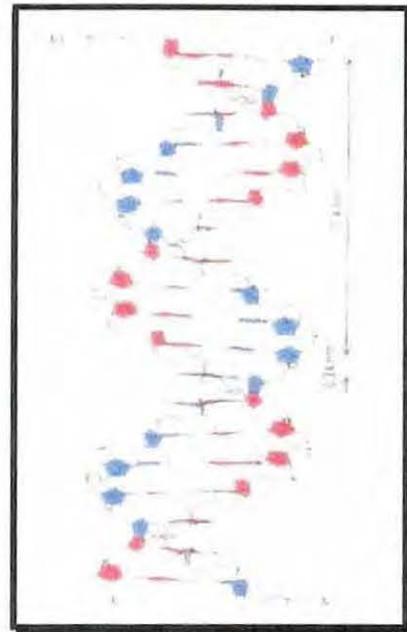


Figure 3 : Représentation schématique de la double hélice de l'ADN



4 Description de la technique de la PCR :

La Polymerase Chain Reaction requiert l'enchaînement de trois étapes pour arriver au produit final. En premier lieu, il est indispensable de séparer les deux brins d'ADN en double hélice afin d'obtenir deux segments d'ADN simples qui vont servir de matrice.

Cependant, une chaîne de nucléotides ne peut être copiée sans l'aide d'une courte séquence de nucléotides appelée **amorces** qui va permettre de démarrer le processus. Ces amorces constituent les premiers nucléotides de la copie. Quand l'hybridation des amorces a été effectuée, une enzyme polymérase prend le relais en ajoutant des nucléotides aux amorces constituant ainsi une copie parfaite du brin d'ADN initial.

4.1. Dénaturation de l'ADN :

Elle est réalisée à 94° C pendant 1 mn. La température élevée permet la séparation des deux brins d'ADN en un simple brin par la rupture des liens Hydrogène entre les bases. Le brin obtenu servira de matrice pour l'amplification ultérieure.

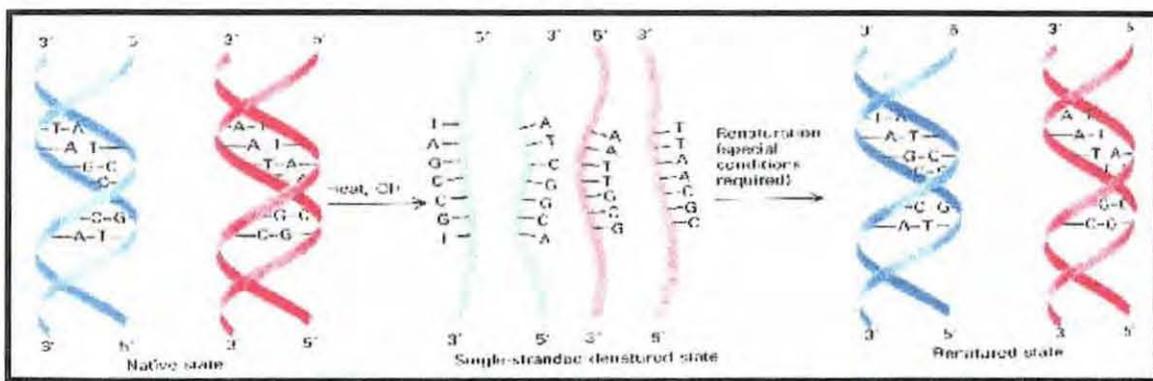
4.2. Annealing ou hybridation des amorces :

Elle est réalisée à 50° C pendant 1 mn. Les amorces sont des oligonucléotides, de séquence définie (25 à 30 bases de nucléotides). Elles servent de départ à la polymérisation et s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice, de part et d'autre de la séquence d'amplification de façon complémentaire. L'hybridation est d'autant meilleure qu'il y a un grand nombre d'amorces.

4.3. Polymérisation :

Elle est réalisée à 72°C pendant 1 mn. C'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation ou étape d'élongation. On utilise une enzyme Polymerase

Figure 4 : Schéma de la dénaturation et de l'hybridation de l'ADN



thermorésistante qui a été isolée à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus* et appelée TAQ polymérase.

Cette enzyme a la propriété de rester stable et active à température élevée (jusqu'à 95°C).L'enzyme polymérise à partir de l'extrémité 3' des amorces, un brin d'ADN de séquence complémentaire. Si la matrice contient un nucléotide A(Adénine), l'enzyme va ajouter à l'amorce le nucléotide T (Thymine), de même, si la matrice contient un nucléotide C (Cytosine), l'enzyme va ajouter le nucléotide G (Guanine) à l'amorce et ainsi de suite jusqu'à la fin du brin d'ADN.La polymérisation donne donc deux brins d'ADN à partir d'un brin. Ces deux brins sont la copie conforme des brins d'ADN ayant servi de matrice.

Ces trois étapes sont répétées environ 30 à 35 fois permettant ainsi d'obtenir 2^{30} à 2^{35} copies de la séquence d'ADN initiale.

5 Déroulement de la PCR :

5.1. Obtention de l'ADN à amplifier :

L'ADN est obtenu à partir d'un broyat d'huîtres mélangé avec de l'eau distillée puis vortexé et centrifugé afin d'obtenir un surnageant. Celui-ci sera prélevé et servira d'échantillon en PCR.

5.2. Les amorces :

Il y en a quatre :

- amorce 3 : 5' GCCA [REDACTED] GCG 3' }
• amorce 4 : 5' GGG [REDACTED] GACC 3' } dites
- amorce 5 : 5' CGC [REDACTED] CCC 3' }
• amorce 6 : 5' CCCG [REDACTED] TG 3' } dites internes

Le choix de ces amorces peut s'effectuer à partir de deux méthodes, l'une utilisant des critères thermodynamiques et l'autre utilisant des critères statistiques. Mais ce choix est déterminant pour la réalisation de la PCR. Ces amorces ont été testées sur des lots de naissains de deux espèces *C. gigas* et *O. edulis* et permettent de détecter l'herpès-like virus.

Les amorces sont généralement constituées de 20 à 30 bases choisies pour être complémentaires du brin à amplifier. De plus, un équilibre doit exister entre le nombre de GC et le nombre de AT (45 à 55 % de GC).

Les amorces 3-4 et 5-6 servent à réaliser la *nested-PCR*. Elle est basée sur la réalisation de deux PCR successives permettant ainsi d'obtenir une double amplification de la séquence d'ADN. La première PCR ou PCR -1 est réalisée avec le couple d'amorces 3-4 dites externes. Le produit de cette PCR est ensuite amplifié au cours d'une deuxième PCR ou PCR -2 qui utilise le couple d'amorces 5-6 dites internes car ce couple d'amorces vient se localiser au cours de la PCR -2 à l'intérieur de la zone amplifiée lors de la PCR -1. Le changement d'amorces entre PCR-1 et PCR-2 permet d'augmenter la spécificité de la réaction.

5.3. Le chlorure de magnésium :

Il est fourni en même temps que l'enzyme et sert de cofacteur. En effet, les ions Mg^{++} interviennent dans la spécificité de reconnaissance des substrats nucléotidiques triphosphates : les dNTPs. Le contrôle de la concentration en ions magnésium est fondamental pour la réussite de l'amplification enzymatique :

- une concentration élevée entraînera une hybridation non spécifique des amorces,

- une baisse de la quantité de magnésium entraînera une diminution de l'activité enzymatique et donc du nombre de séquences synthétisées.

6 Préparation de la PCR :

6.1. Traitement des échantillons :

a. Les larves :

Manipulations

- Peser 50 mg de larves
- Broyer les larves avec 50 μ l d'eau distillée dans tubes Eppendorf
- Placer au bain marie bouillant 10 mn
- Centrifuger le tout 5 mn à 8000 rpm, à 4 °C

Matériel

Gants, pipette Pasteur, balance
Microtubes Eppendorf, piston Pellet
Bain marie, portoir flottant
Centrifugeuse réfrigérée

b. Le naissain < 3 mm :

Manipulations

- Sécher les animaux
- Peser (X g) et réunir les animaux par pool de 5 (6 pools) dans tubes Eppendorf
- Broyer les animaux avec X ml d'eau distillée
- Placer au bain marie 10 mn
- Centrifuger 5 mn à 8000 rpm à 4°C

Matériel

Gants
Papier absorbant
Balance, tubes Eppendorf
Piston Pellet à usage unique
Bain marie, portoir flottant
Centrifugeuse réfrigérée

c. Le naissain > 3 mm :

On constitue un échantillon de 30 animaux qui seront regroupés par pool de 5.

Manipulations

- Ouvrir le naissain et retirer la chair
- Sécher les animaux et les réunir par pool dans des boîtes de Pétri
- Dilacérer les tissus et conserver sur glace
- Peser 0.5 g d'animaux dans tubes Eppendorf
- Broyer les tissus avec 0.5 ml d'eau distillée
- Placer au bain-marie bouillant 10 mn
- Centrifuger 5 mn à 8000 rpm à 4°C

Matériel

Gants
papier absorbant, boîtes de Pétri
lames de rasoir, bac à glace
Tubes Eppendorf, Pipettes Pasteur, balance
Piston Pellet à usage unique
Bain-marie, Portoir flottant
Centrifugeuse réfrigérée

Certaines précautions sont en prendre concernant la manipulation des échantillons :

- Changer les gants entre chaque pool ainsi que les lames de rasoir.
- Les pistons Pellet sont à usage unique, il faut aussi les changer entre chaque pool.
- Les pipettes Pasteur servant à la pesée des échantillons sont aussi changées entre chaque pool.

La centrifugation du broyât permet d'obtenir un surnageant qui va servir d'échantillon à analyser par PCR.

6.2 : Mise en œuvre de la réaction de PCR :

Le diagnostic par PCR nécessite la prise de précautions générales. En effet, il faut avant tout éviter les risques de contamination au cours des diverses manipulations. Pour cela, les préparations vont se faire dans des pièces distinctes, avec du matériel spécifique à chaque manipulation. Il faudra donc trois pièces distinctes :

- pour la préparation des réactifs,
- pour la préparation des échantillons,
- pour la mise en route de la PCR.

La PCR qui est réalisée au laboratoire de pathologie d'IFREMER - Palavas est en fait la *nested PCR*. Celle-ci se déroule en deux étapes :

- une PCR -1 réalisée à partir des surnageants
- une PCR -2 réalisée à partir des produits de la PCR -1.

6.3 : Réalisation de la PCR -1 :

Elle nécessite la préparation d'un mélange réactionnel appelé *mix -1* qui contient les éléments indispensables à la réalisation de la PCR, c'est à dire :

• H ₂ O	31.6 μ l	x n
• Tampon	5 μ l	x n
• Mg Cl ₂	5 μ l	x n
• dNTPs	5 μ l	x n
• amorce 31	31 μ l	x n
• amorce 41	41 μ l	x n
• Taq	0.4 μ l	x n

	49 μ l	x n

n = nombre de tubes (échantillons + témoins positifs + témoins négatifs)

Ce mélange sera réparti à hauteur de 49 μ l dans des tubes Eppendorf, il sera ensuite ajouté 1 μ l d'échantillon. Le tout enfin est placé dans le thermocycleur qui permet la réalisation des trois étapes de la PCR (94°C, 50°C, 72°C).

A la suite de la PCR -1, on peut réaliser une électrophorèse qui va permettre d'identifier les lots contenant le virus.

6.4 : Réalisation de la PCR -2 :

0.1 μ l des échantillons issus de la PCR -1 sera mélangé à 49.9 μ l du mix -2 :

• H ₂ O	32.5 μ l	x n
• Tampon	5 μ l	x n
• dNTPs	5 μ l	x n
• MgCl ₂	5 μ l	x n
• amorce 5	1 μ l	x n
• amorce 6	1 μ l	x n
• Taq	0.4 μ l	x n

	49.9 μ	x n

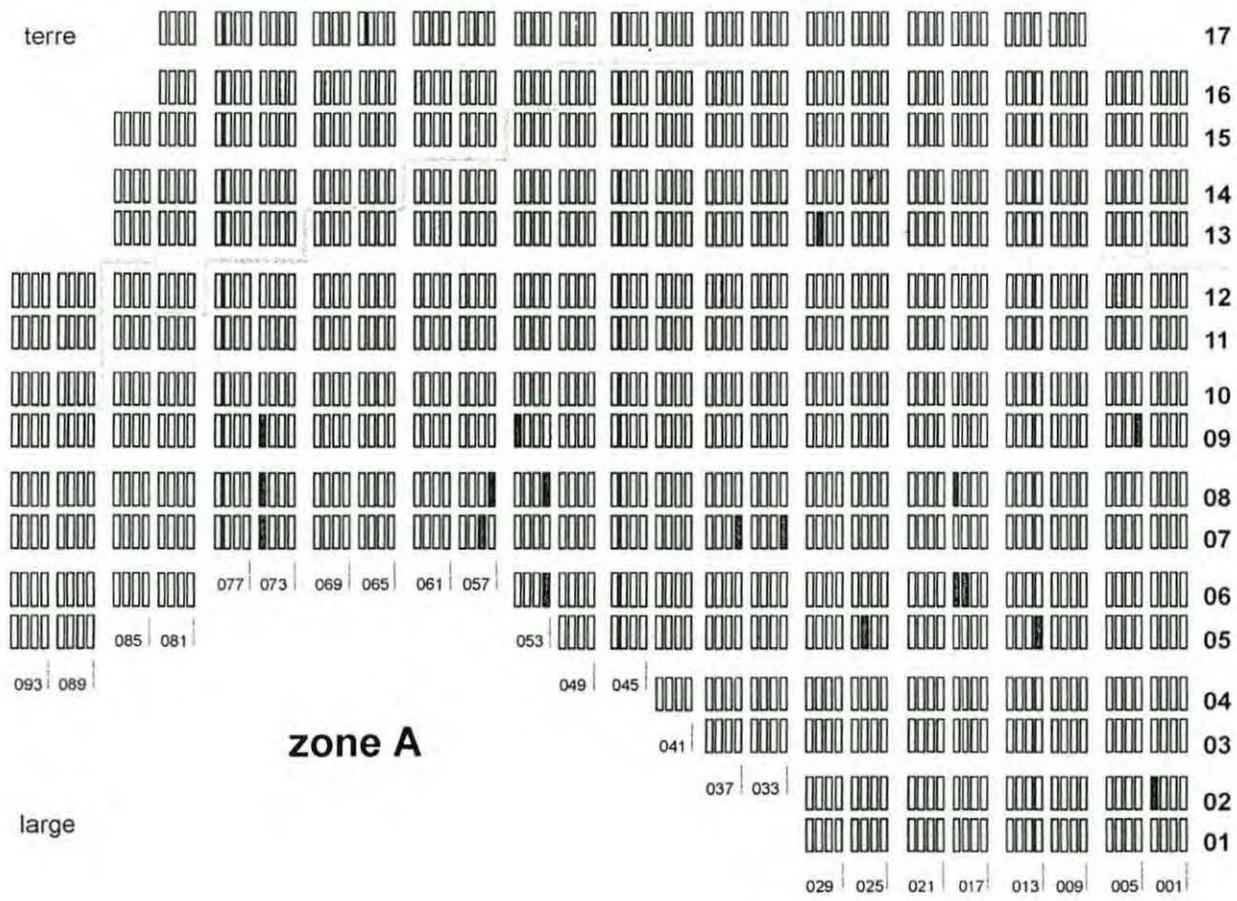
Les tubes sont alors placés dans le thermocycleur pour subir une amplification de l'ADN contenu dans les échantillons. Puis, on effectuera une électrophorèse qui permet la lecture des résultats.

N° lot	Date PCR
9711	03/06/97
9712	03/06/97
9713	23/06/97
9715	30/07/97
9718	09/06/97
9719	09/06/97
9720	09/06/97
	17/06/97
9721	09/06/97
9722	03/07/97
	17/06/97
9723	17/06/97
9723	23/06/97
9730	17/06/97
9732	17/06/97
9733	23/06/97
9738	01/07/97
	03/07/97
9739	01/07/97
9740	01/07/97
9741	01/07/97
9743	01/07/97
9744	03/07/97
	07/07/97
9745	18/08/97
9746	18/08/97
9747	30/07/97
9749	30/07/97
9753	30/07/97
	21/07/97
	22/07/97
	24/07/97
	29/07/97
9754	30/07/97
	21/07/97
	22/07/97
	24/07/97
	29/07/97
9756	04/08/97
9757	04/08/97
9759	18/08/97
9761	18/08/97

Lots positifs							
N° lot	Prod	Elevage	Origine	Arrivée	structure	mortalité	remarques
9715	CN	Thau	Arcachon	Mars	naissain		
9720	CN	Leucate	Arcachon	Mai	naissain	80%	bordure sud
9722	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	60%	
9723	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	80%	mortalité dans bassin
9732	E	Thau	Saint Philibert	Mai	une à une	80%	pochon zone C
9733	E	Thau	Barfleur	Mai	une à une	50%	lanternes vers Meze
9738	CN	Thau	Arcachon	juin	naissain	40%	meme lot que 9723 en pochon
9745	E	Thau	barfleur	Mai	naissain	0	suite 9733, conservé dans bac
9747	CN	Thau			naissain	20%	stock
9754	E	Thau	barfleur	Juillet	une à une	0	manip pré-développement

Lots négatifs							
N° lot	Prod	Elevage	Origine	Arrivée	structure	Mortalité	remarques
9711	CN	Thau	Arcachon	Janvier	naissain	0	
9712	CN	Thau	Arcachon	Fevrier	naissain	0	pochons table face au mas en terre
9713	CN	Thau	Arcachon	Fevrier	naissain	0	
9713	CN	Thau	Arcachon	Fevrier	naissain	0	
9718	CN	Leucate	Arcachon	Mars	naissain	80	
9719	CN	Leucate	Arcachon	Mai	naissain	50	mortalité dans son bassin, visite 11/06 qq mortes coquilles vides mortalité terminée
9721	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	50	
9730	CN	Leucate	Arcachon	Mai	naissain	80	bordure sud
9739	CN	Thau	Bretagne	Mai	naissain	0	m lot que 9723
9740	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	0	m table que lot 9741 à mortalité
9741	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	70	suite 9722+9723, mortalité bordure de table
9743	E	Thau	Barfleur	Mai	une à une	0	idem lot 9733
9744	E	Thau	Barfleur	Juillet	une à une	0	
9746	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	50	sur m table que 9733
9749	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	0	stock
9756	E	Thau	Barfleur	Juillet	une à une	0	
9759	CN	Thau	Arcachon	Mai	naissain	0	sortie contrôle
9761	E	Thau	Irlande	Août	une à une	0	

**Annexe - 3 Cartographie des tables de la zone A contenant du
naissain**



ANNEXE - 4 : PREPARATION DES COMPOSANTS DE LA RÉACTION DE FEULGEN ROSSENBECK

- **Réactif de Schiff** : selon la méthode de Lillie

Dissoudre :

- Fuschine basique 1 g
- Métabisulfite de sodium en poudre 1.9 g
- Acide chlorhydrique 0.15 N 100 ml

Laisser la solution se décolorer en l'agitant de temps en temps ; après décoloration presque totale (12 à 14 h), ajouter :

- Charbon activé 0.5 g

Agiter, laisser reposer puis filtrer.

- **Eau sulfureuse de rinçage** : préparation à froid

- Solution aqueuse à 10 % de métabisulfite de sodium 1 vol
- eau 19 vol

Annexe - 5 : Préparation des composants du trichrome de Masson

- **Hématoxyline de Groat** : préparation à froid

1^{ère} solution :

- Acide sulfurique concentré 0.8 ml
- Alun de fer 1 g
- Eau distillée 50 ml

2^{ème} solution :

- Hématoxyline 0.5 g
- Alcool à 95 ° 50 ml

Après dissolution, mélanger les deux solutions, laisser reposer pendant 1 heure et filtrer ; se conserve pendant 3 mois environ.

- **Fuschine Acide - Ponceau** : préparation à froid

- Fuschine acide 0.1 g
- Ponceau 0.2 g
- Eau distillée 300 ml

Après dissolution, ajouter :

- Acide acétique 0.6 ml

Conservation illimitée.

- **Orangé G - molybdique** : préparation à froid

- Orangé G 2 g
- Eau distillée 100 ml
- Acide phosphomolybdique 3 à 5 g

- **Vert lumière** : solution acétique, préparation à froid

- Vert lumière 0.1 g
- Eau distillée 100 ml

Ajouter :

- Acide acétique 2 ml

Conservation illimitée.