



**Recherche de pathogène en zones
conchylicoles – Mise en place d’un système
d’alerte**

11/10/2022

**Elodie PICHON
Olivier ROUSSEAU**

Table des matières

1.	Design des amorces et sondes – validation de la spécificité in silico	3
1.1.	Design du multiplexe : pathogene 1 :	3
1.2.	Design du multiplexe : pathogene 2 :	3
2.	VALIDATION DES DESIGN DU MULTIPLEXE PATHOGENE 1 : 3	
2.1.	Obtention des témoins positifs :	3
2.2.	Validation des conditions dPCR sur témoin positif en simplex	4
	2.2.1. OsHV-1	4
	2.2.2. Vibrio aestuarianus	4
	2.2.3. Vibrio splendidus crassostrea et tasmaniensis	4
	2.2.4. Plasmide : pGV1512	5
2.3.	Validation des conditions dPCR du multiplexe sur mélange de Témoins positifs	5
3.	Mise en place de l'extraction et prise d'essai dPCR sur la matrice EAU DE BASSIN	5
3.1.	Homogénéisation et Concentration par ultrafiltration	5
3.2.	Extraction d'acides nucléiques à partir du concentrat	5
3.3.	Détermination de la prise d'essai pour l'analyse dPCR	6
4.	Mise en place de l'extraction et prise d'essai dPCR sur la matrice D'HUITRE	6
4.1.	Homogénéisation/broyage : Température ambiante (TA) vs. Azote (AZ)	6
4.2.	Extraction KITA (tampon lyse1 (TPLYSE1) vs. Lyse2 (TPLYSE2)) ET KITB (PBS 1X (PBS) vs. tampon lyse (TPLYSE)) via la quantification du gène de ménage de crassostrea gigas (RpL7)	7
4.3.	Détermination de la prise d'essai pour l'analyse dPCR	8
5.	Description des méthodes d'obtention des mesures	9
5.1.	Mesures des pathogènes : mise en place de prélèvements d'eau et d'huitres sur 3 emplacements	9
5.2.	Redressement des mortalités	9

5.3.	Redressement des données d'environnement	10
6.	Analyse des mesures de pathogènes dans l'eau et dans les huîtres	11
6.1.	Mesures de pathogènes par sites	12
6.2.	Mesures par Pathogènes	14
7.	Comparaison mesures d-PCR vs Mortalités : étude directe	17
7.1.	Mesures par sites	17
7.2.	Premières conclusions	18
8.	Comparaison mesures d-PCR vs Environnement	18
8.1.	Comparaisons mesures d-PCR dans l'eau - Températures	19
8.2.	Comparaisons mesures d-PCR dans les huîtres - Températures	20
9.	Comparaison mesures d-PCR vs Mortalités : Approche par niveaux et cadrans	20
9.1.	Principes des niveaux	20
9.2.	Les résultats par niveaux	21
9.3.	Principes des cadrans	22
9.4.	Résultats par cadrans : identification de corrélations et de tendances	22

Première partie : création des outils de mesure

1. Design des amorces et sondes – validation de la spécificité in silico

1.1. Design du multiplexe : pathogene 1 :

Le multiplexe pathogene 1 comprend 5 cibles (3 bactéries, 1 virus et 1 plasmide) :

- Cible *Vibrio aestuarianus subsq.francensis* et *cardii* : gyrase B
- Cible *Vibrio splendidus tasmaniensis*: MreB et cible sur *crassostrea* : topoisomerase A
- Cible Ostreid Herpesvirus-1 (OshV-1) : polymerase
- Cible supplémentaire : Plasmide de virulence pGV1512 de *Vibrio splendidus*

Un DESIGN supplémentaire a été effectué ciblant un gène de ménage de *crassostrea gigas*, qui permettra de discriminer différents kits d'extractions :

- Gène de ménage *crassostrea gigas* : Rpl7

Du Y, Zhang L, Xu F, Huang B, Zhang G, Li L. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. Fish Shellfish Immunol. 2013 Mar;34(3):939-45. doi: 10.1016/j.fsi.2012.12.007. Epub 2013 Jan 26. PMID: 23357023.

1.2. Design du multiplexe : pathogene 2 :

Le multiplexe pathogene 2 comprend 5 cibles de parasites :

- Cible *Mikrocytos mackini*: sous unité 18S
- Cible *Marteilia refringens* : ITS sous unité 28S-18S
- Cible *Perkinsus marinus* : ITS sous unité 5,8S
- Cible *Bonamia ostreae* : sous unité 5,8S
- Cible *Bonamia exitiosa* : sous unité 5,8S

Remarque : Le multiplexe pathogene 2 n'a pas été validé dû à la difficulté de l'obtention des témoins positifs.

2. VALIDATION DES DESIGN DU MULTIPLEXE PATHOGENE 1 :

2.1. Obtention des témoins positifs :

Les témoins positifs bactériens ont été obtenu chez Belgian Coordinates Collections of Microorganisms : <https://bccm.belspo.be>

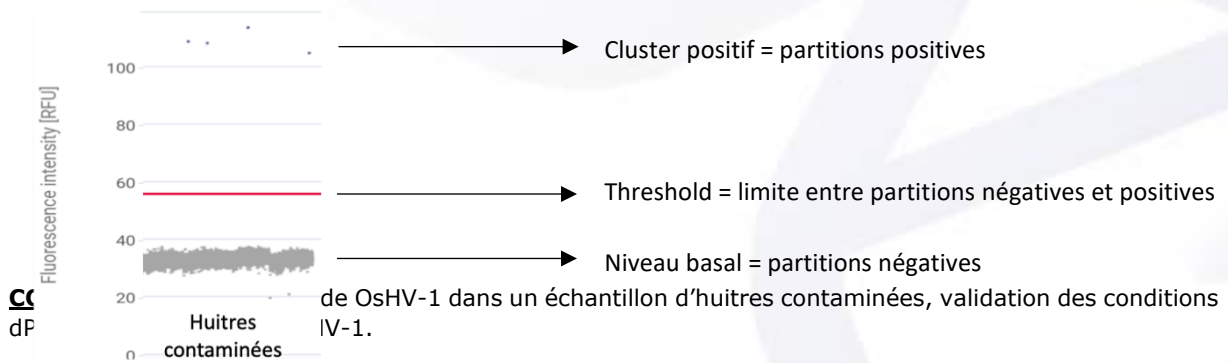
- LMG 20012 -> *Vibrio splendidus tasmaniensis*
- LMG 22240 -> *Vibrio splendidus Crassostrea*
- LMG 24517 -> *Vibrio aestuarianus subq.francensis*
- LMG 07909 -> *Vibrio aestuarianus subsq.aestuarianus (cardii)*

Le témoin positif viral a été obtenu à partir d'huitres contaminées fournies par Mr Guy SANCHEZ

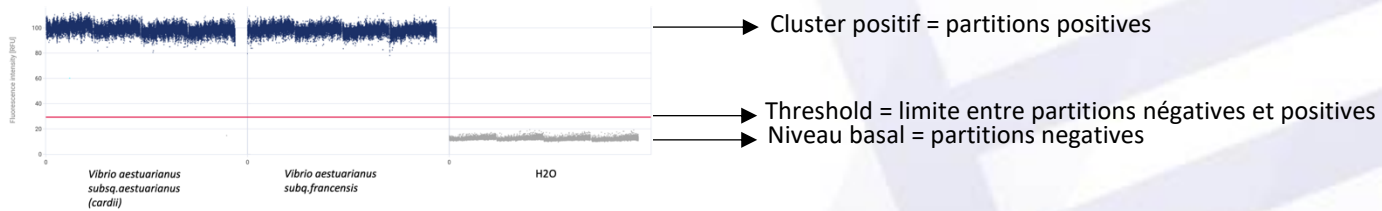
- - Ostreid Herpesvirus-1 (OshV-1)

2.2. Validation des conditions dPCR sur témoin positif en simplex

2.2.1. OsHV-1

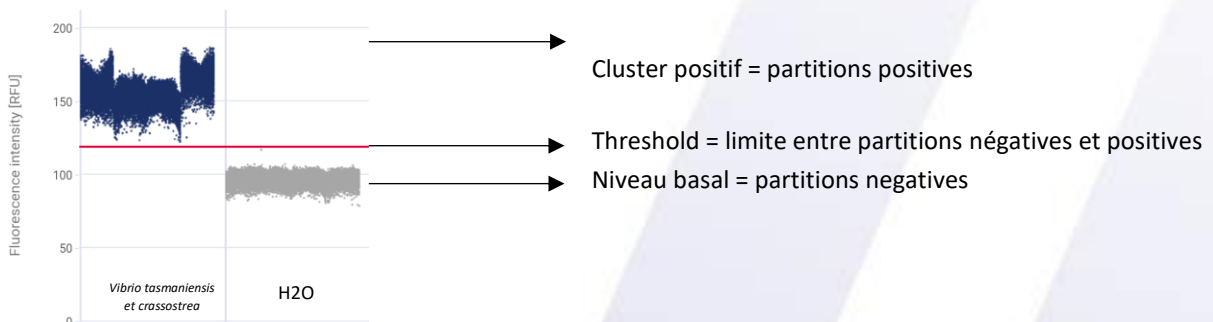


2.2.2. *Vibrio aestuarianus*



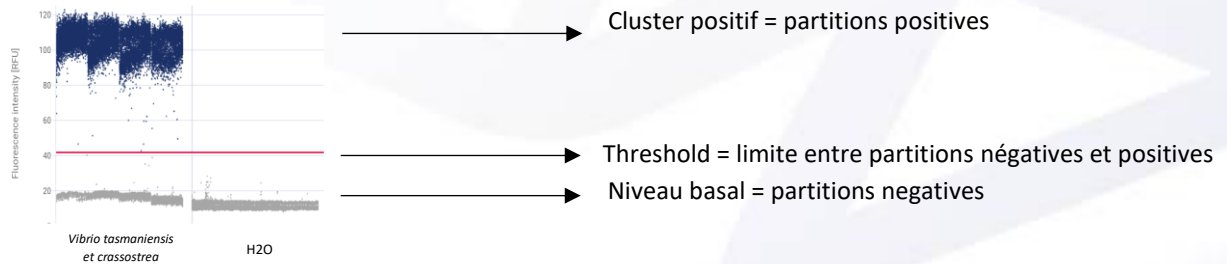
CONCLUSION : Détection de *Vibrio aestuarianus* sur deux souches (*vibrio aestuarianus subsq.aestuarianus et francensis*), validation des conditions dPCR du design ciblant *Vibrio aestuarianus*.

2.2.3. *Vibrio splendidus crassostrea et tasmaniensis*



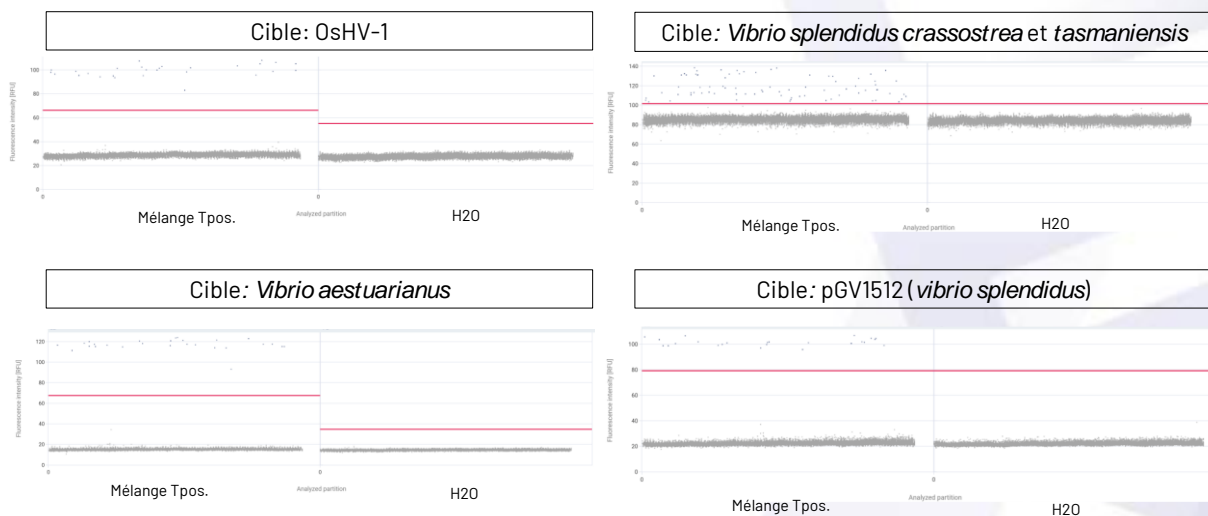
CONCLUSION : Détection de *Vibrio splendidus crassostrea et tasmaniensis* sur le mélange des deux souches, validation des conditions dPCR du design ciblant *Vibrio splendidus crassostrea et tasmaniensis*.

2.2.4. Plasmide : pGV1512



CONCLUSION : Détection du plasmide pGV1512 sur le mélange des deux souches (*Vibrio splendidus crassostrea* et *tasmaniensis*), validation des conditions dPCR du design ciblant le plasmide pGV1512.

2.3. Validation des conditions dPCR du multiplexe sur mélange de Témoins positifs



CONCLUSION : Détection des cibles OsHV-1, *vibrio aestuarianus*, *vibrio splendidus crassostrea/tasmaniensis* et le plasmide pGV1512. Validation des conditions dPCR du multiplexe.

3. Mise en place de l'extraction et prise d'essai dPCR sur la matrice EAU DE BASSIN

3.1. Homogénéisation et Concentration par ultrafiltration

L'homogénéisation à partir de 1L d'EAU de BASSIN et la concentration par ultrafiltration ont été développées par IAGE et ont fait l'objet d'un brevet publié en 2022 (brevet EUROPE N° 20306715.2).

3.2. Extraction d'acides nucléiques à partir du concentrat

A partir du concentrat d'EAU DE BASSIN deux kits d'extractions ont été comparés : KITA vs KITB. Six concentrats d'EAU DE BASSIN ont été extraits à partir des deux kits. La quantification du gène de ménage Rpl7 (cf : Figure 1) obtenu avec le KITB est supérieure pour 5 échantillons par rapport à la quantification obtenu pour le KITA.

Le KITB a été choisi pour l'extraction de concentrat d'EAU de BASSIN.

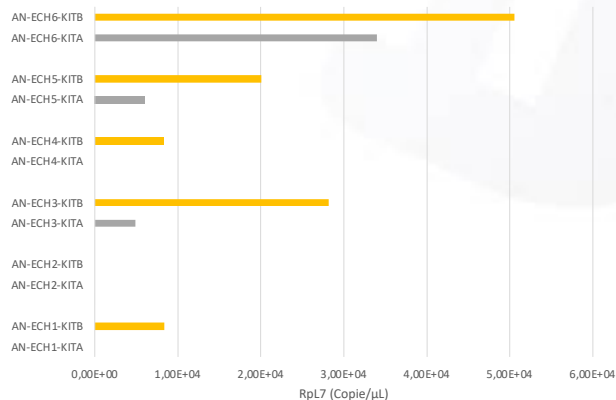


Figure 1 : Quantification (copie/μL) par dPCR du gène RpL7 dans 6 échantillons d'EAU DE BASSIN extraits avec un KITA et un KITB.

3.3. Détermination de la prise d'essai pour l'analyse dPCR

A partir du même échantillon, la prise d'essai pour la dPCR a été testée de 4 à 12 μL. Ci-dessous la Figure 2 présente la quantification des 3 cibles : *v.aestuarianus*, *v.splendidus crassostrea/tasmaniensis* et le plasmide pGV1512 en fonction de la prise d'essai. Une inhibition de quantification (cf : Figure2) est observée à partir d'une prise d'essai de 10 μL pour la cible *v.splendidus crassostrea/tasmaniensis*.

La prise d'essai pour les échantillons a été définie à 4 μL qui permet d'avoir une bonne représentativité de l'extrait et d'éviter l'inhibition de PCR (prise en compte de l'hétérogénéité des échantillons d'EAU DE BASSIN dû au type de prélèvement et à la zone de prélèvement).

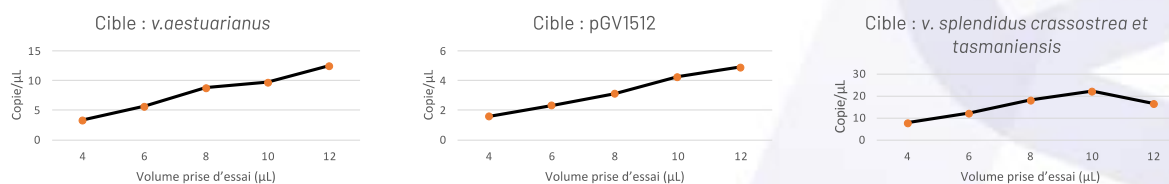


Figure 2 : Quantification (copie/μL) par dPCR des cibles *v.aestuarianus*, *v.splendidus crassostrea/ tasmaniensis* et le plasmide pGV1512 en fonction de la prise d'essai (4 à 12 μL).

4. Mise en place de l'extraction et prise d'essai dPCR sur la matrice D'HUITRE

4.1. Homogénéisation/broyage : Température ambiante (TA) vs. Azote (AZ)

A partir du même pool d'huîtres, 50 % ont été broyées à température ambiante (TA) et 50 % ont été broyées avec de l'azote (AZ). Dans les deux conditions, le broyage a été effectué à l'aide du 2010 Geno/Grinder®.

La quantification du gène RpL7 (cf Figure 3) ne montre pas de différence significative entre les deux conditions de température de broyage. Le broyage à l'azote rend le transfert de l'échantillon en tube de 50 mL après broyage et la pesée de celui-ci en microtube pour l'extraction plus aisé. Le broyage à l'azote a donc été choisi pour la matrice HUITRE.

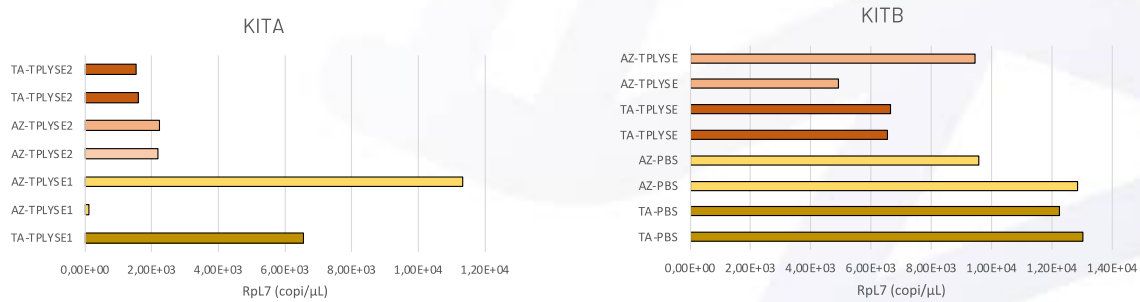


Figure 3 : Quantification (copie/μL) par dPCR du gène Rpl7 dans 2 échantillons d'HUITRES homogénéisés et broyés à température ambiante (TA) ou à l'azote (AZ). Puis extraits à partir du KITA (tampon lyse1 (TPLYSE1) vs. Lyse2 (TPLYSE2)) ET du KITB (PBS 1X (PBS) vs. tampon lyse (TPLYSE)).

4.2. Extraction KITA (tampon lyse1 (TPLYSE1) vs. Lyse2 (TPLYSE2)) ET KITB (PBS 1X (PBS) vs. tampon lyse (TPLYSE)) via la quantification du gène de ménage de *crassostrea gigas* (Rpl7)

Dans un premier temps, 2 kits d'extraction ont été comparés : KITA vs KITB. Pour le KITA, 2 tampons de lyse sont testés et pour le KITB 1 tampon de lyse vs PBS 1X est testé. Pour évaluer les 4 extractions la quantification du gène de ménages Rpl7 a été effectuée (cf Figure 3) après extraction du même pool d'huitres. La quantification du gène Rpl7 est plus élevée avec le tampon de lyse 1 avec le KIT A et le tampon PBS 1X avec le KIT B, en revanche la quantification n'a pas montré de différence significative entre KITA-TPLYSE1 vs KITB-PBS.

Pour pouvoir discriminer le KITA du KITB, deux paramètres ont été testés :

- La quantifications des 4 pathogènes pour un pool d'huitres juvéniles extrait à l'aide des KITA et KITB. (cf Figure4)
- Le volume de prise d'essai pouvant être utilisé en dPCR sans risque d'inhibition (cf Figure5)

La quantification des 4 pathogènes est plus élevée avec le KITB vs KITA et le volume de prise d'essai à partir de l'extrait avec le KITA montre une inhibition de PCR à partir de 4μL vs 10μL pour le KITB. Le KITB a été choisi pour l'extraction de la matrice HUITRE.

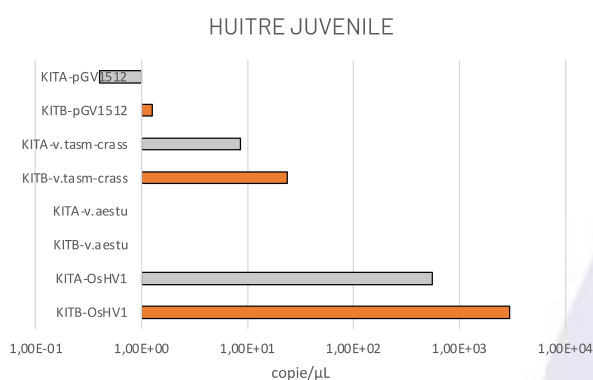


Figure 4 : Quantification (copie/μL) des 4 cibles du multiplexe pathogen1en dPCR dans un échantillon d'huitres extrait avec le KITA vs KITB.

4.3. Détermination de la prise d'essai pour l'analyse dPCR

A partir du même échantillon extrait avec le KITB, la prise d'essai pour la dPCR a été testée de 2 à 10 μL . Ci-dessous la Figure 5 présente la quantification de OsHV-1 en fonction de la prise d'essai. Aucune inhibition de quantification n'est observée jusqu'à 10 μL .

La prise d'essai pour les échantillons a été définie à 5 μL , ce qui permet d'avoir une bonne représentativité de l'extrait et d'éviter l'inhibition de PCR (prise en compte de l'hétérogénéité des échantillons HUITRE (Adulte et/ou Juvénile)).

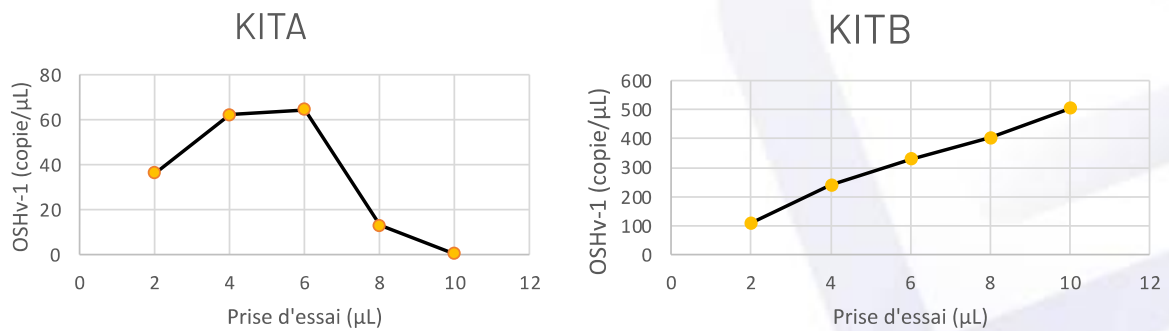
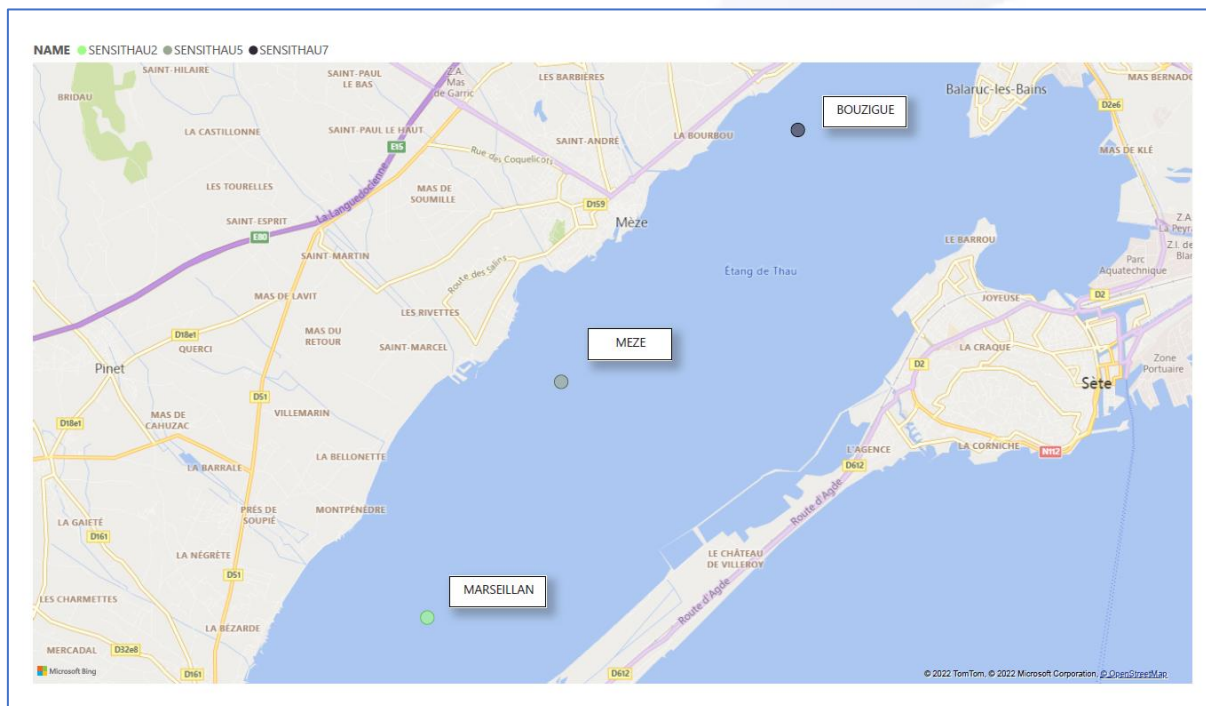


Figure 5 : Quantification par dPCR (copie/ μL) de la cible OsHV-1 en fonction de la prise d'essai (2 à 10 μL) à partir du même échantillon extrait à l'aide du KITA et du KITB.

Deuxième partie : mise en œuvre terrain et résultats des mesures

5. Description des méthodes d'obtention des mesures

5.1. Mesures des pathogènes : mise en place de prélèvements d'eau et d'huîtres sur 3 emplacements



Mesures D-PCR : valeurs instantanées :

- Prélèvements réguliers d'huîtres creuses adultes et juvéniles (sans information sur les ploidies) et d'eau de mer (prélèvements ponctuels) sur des tables de trois sites
- Mesures de cibles de pathogènes des huîtres avec les procédés présentés plus haut

Mortalité : valeurs cumulées entre 2 relèves :

- Relevés mensuels des huîtres restées vivantes sur les mêmes tables que les prélèvements pour mesures

Données d'environnement : valeurs instantanées

- Valeurs remontées en continu (plusieurs mesures par jour) par des capteurs situés sur des tables également à proximités des 3 sites de prélèvement
- Représentation : moyenne quotidienne

5.2. Redressement des mortalités

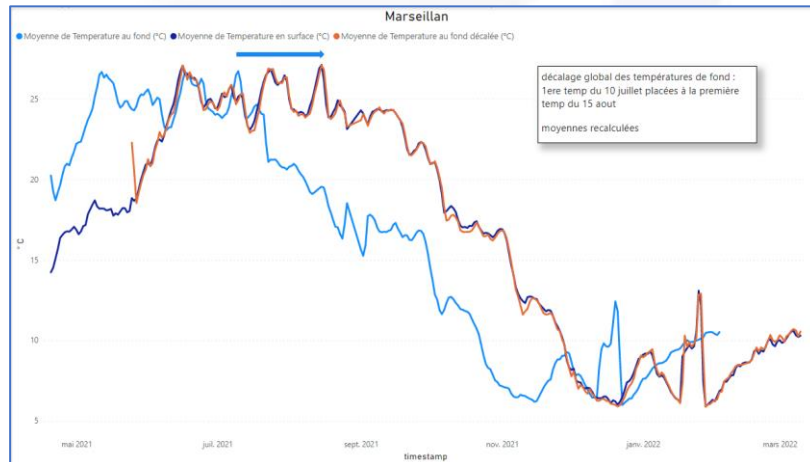
Obtention des mesures de mortalités sur les 3 mêmes sites.

Les traitements suivants ont été réalisés pour pouvoir exploiter les données :

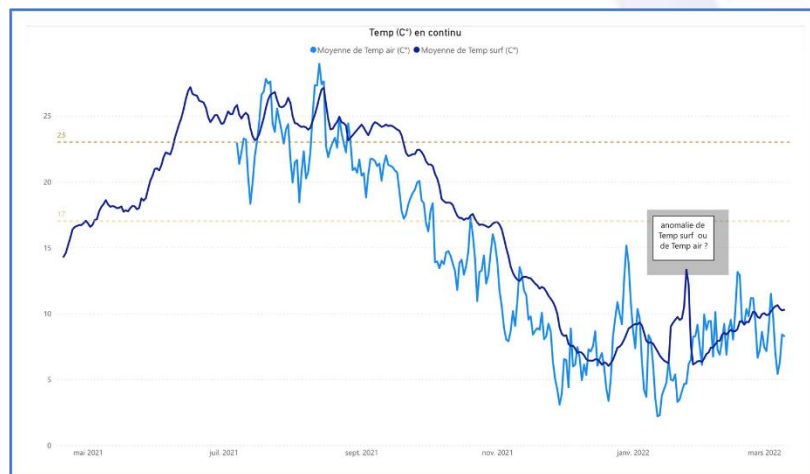
- Exploitation du fichier ROL_MORTA_ALL_DATA sur 3 sites proches des sites de prélèvement d'eau et d'huîtres pour les mesures en D-PCR
- Exclusion des huîtres HP
- Calcul d'une « mortalité mensuelle » comme différence des mortalités cumulées entre deux dates
- Correction des cas de mortalités mensuelles négatives (erreurs de saisies)

5.3. Redressement des données d'environnement

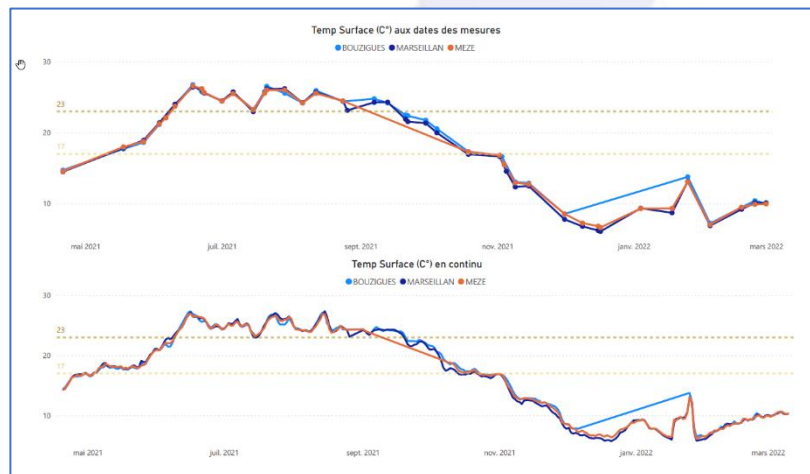
- Problème de récupération des données : décalage des dates pour certains indicateurs
→ Analyse seulement de la température de surface



- Anomalies ponctuelles régulières : capteurs sans doute défectifs à certaines dates
- Un pic de température anormal fin janv 2022

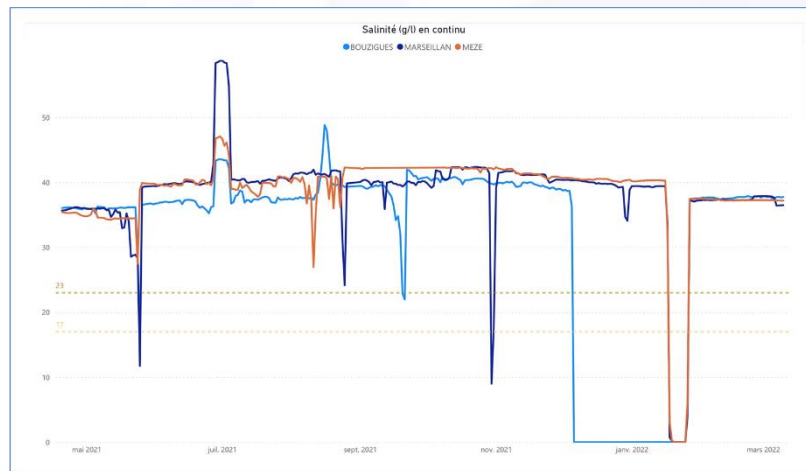


- Températures de l'eau : peu de variations entre sites : on retient une courbe identique pour les 3 sites



- Salinité : décrochages suspects (problèmes de capteurs ?) sans lien avec les précipitations

Salinité Bouzigues apparemment inférieure à celle des autres à partir de juin 2021 : explication à produire ?



- Comparaison salinité- température eau de surface :

- pas de liens apparents
- Valeurs anormales conjointes fin janv 2022



- ➔ On ne retiendra dans la suite de cette première étude que la courbe de variation de la température pour des comparaisons avec les mesures de pathogène.

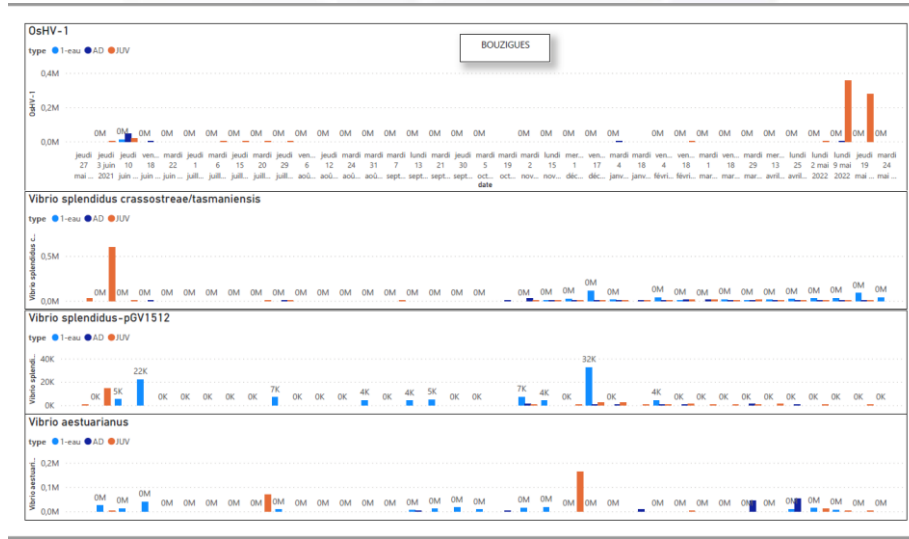
6. Analyse des mesures de pathogènes dans l'eau et dans les huîtres

- Représentations : échelle normale et échelle log (pour mieux voir les valeurs faibles)
- Résultats concluants de mesures dans l'eau (détection de toutes les cibles) et sur des huîtres
- En première analyse, difficile de tirer des conclusions en termes de liens entre les mesures dans l'eau et celles dans les huîtres
- Rappel : mesures huîtres : mesure sur un échantillon de plusieurs huîtres mélangées
- Plus de données semblent nécessaires ; une distinction entre nature d'huîtres (2N,3N, ...) serait utile au regard des variations de mortalités
- La méthode de prélèvement eau est à approfondir : distance ? Direction ?

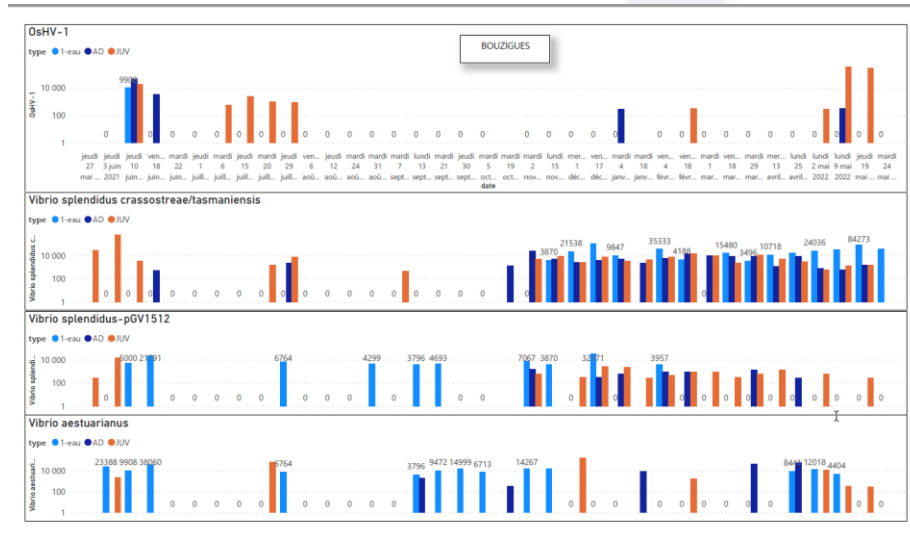
6.1. Mesures de pathogènes par sites

BOUZIGUES :

Echelle normale



Echelle Log :

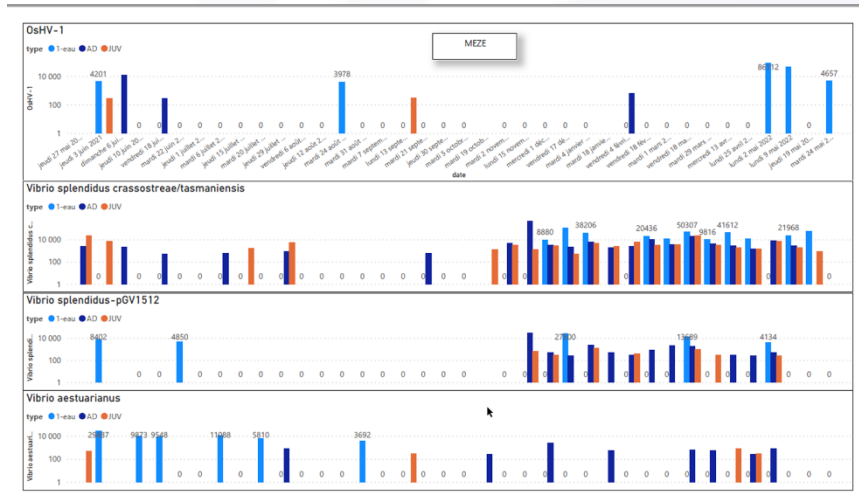


MEZE :

Echelle normale

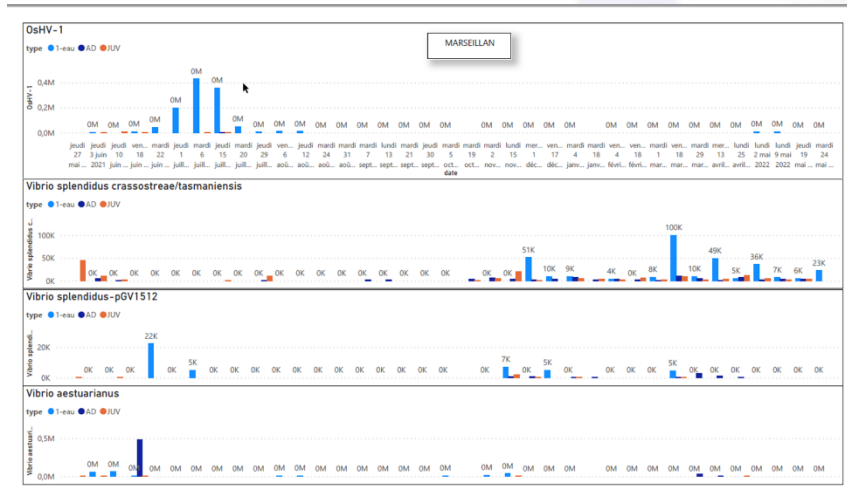


Echelle Log :

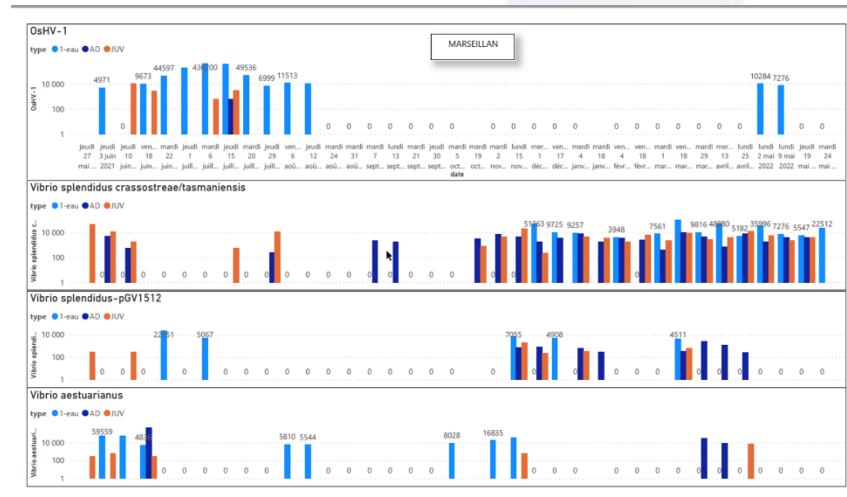


MARSEILLAN :

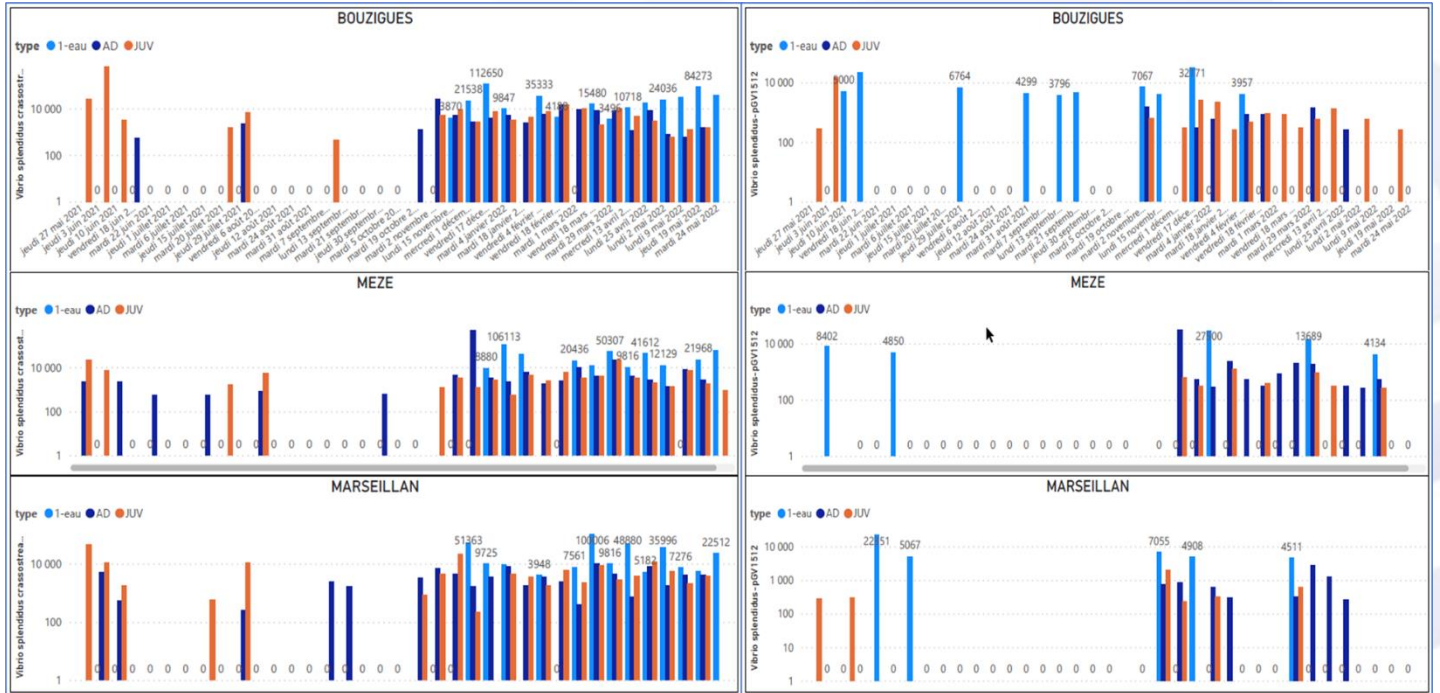
Echelle normale



Echelle Log :



Echelle Log



Troisième partie : comparaison des mesures en d-PCR avec les données de mortalités et d'environnement

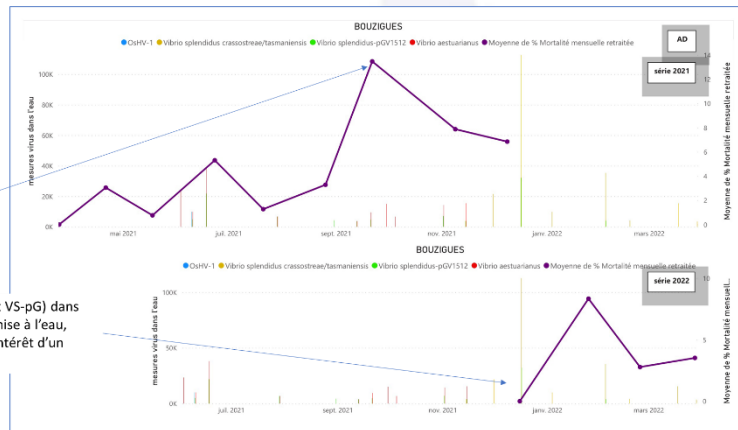
7. Comparaison mesures d-PCR vs Mortalités : étude directe

7.1. Mesures par sites

Nous présentons ici des comparaisons entre mesures et mortalités qui semblent donner des pistes de corrélation

AD BOUZIGUES :

Pic de « surmortalité » : mortalité mensuelle au dessus de 5%
En dessous : on peut considérer que c'est une mortalité « naturelles ».



Pic splendide (VS et VS-pG) dans l'eau juste après la mise à l'eau, suivi de mortalité : intérêt d'un test préalable ?

AD MEZE :

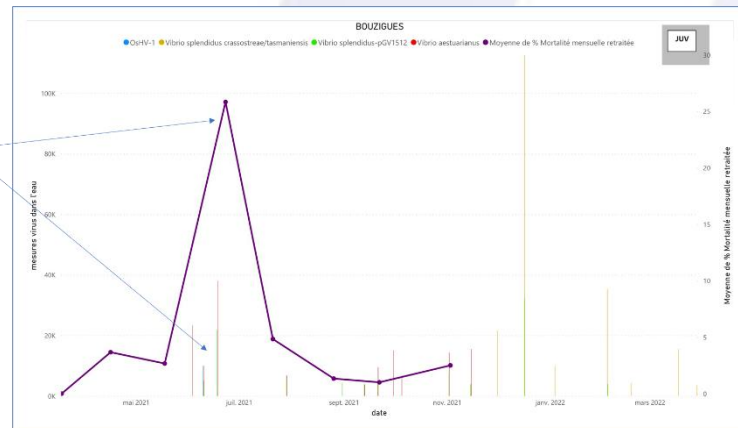
Pas de lien l'accroissement de la mortalité et les mesures (pas de détection en sept-oct)



Pic splendide (VS et VS-pG) dans l'eau juste après la mise à l'eau, suivi de mortalité : intérêt d'un test préalable ?

JUV BOUZIGUES :

Concomitance mesures – pic intéressante



7.2. Premières conclusions

La comparaison directe entre les **mortalités** et les **mesures dans l'eau** semble donner quelques pistes de corrélations. Elle est à approfondir : les mesures dans l'eau peuvent donner des indications sur ce qui affecte les huitres restantes.

Toutefois, ces comparaisons sont à prendre avec prudence :

- Les mortalités sont très locales (différences d'intensités et de dates entre espèces et entre duplicats), or

(1) les mesures sont réalisées sur des échantillons récupérés sur des sites apparemment différents de ceux dont on connaît la mortalité : faire un lien est donc plus délicat,

(2) les mesures D-PCR sont instantanées alors que les comptages de mortalité sont cumulés (sur le mois).

Comptage de mortalités et mesures D-PCR doivent être fait sur les mêmes sites

→ **Nécessité de poursuivre l'étude pour étudier l'effet de prélèvements agrégés au mois (grâce aux préleveurs automatiques), ou mieux, plusieurs prélèvements agrégés fractionnés dans le mois**

- La comparaison entre les mortalités et les **mesures sur les huitres** est plus délicate :

(1) sites différents,

(2) pas d'indications sur les natures des huitres échantillonnées alors que la nature de l'huitre a un impact sur la mortalité

(3) on ne sait pas si les huitres prélevées seraient mortes ou auraient survécu

8. Comparaison mesures d-PCR vs Environnement

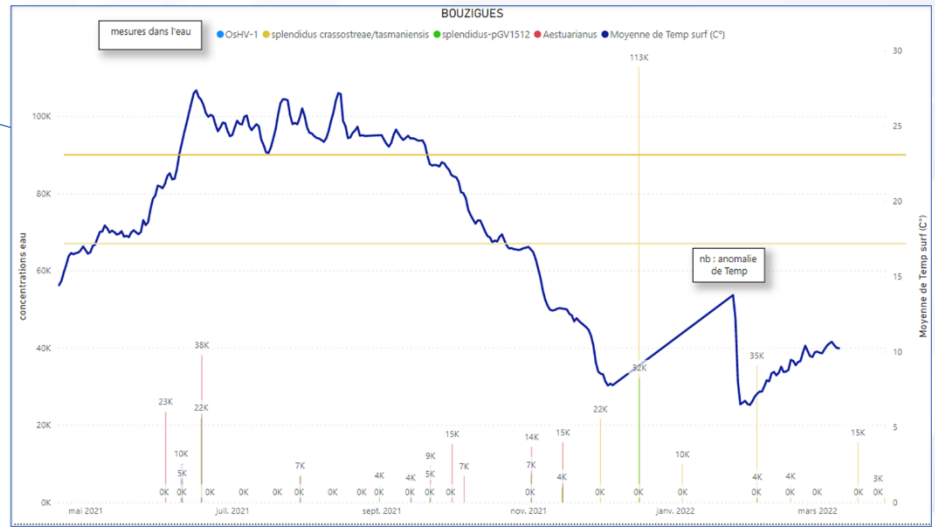
Comparaison seulement avec température moyenne de surface. La question est de savoir si l'on peut identifier une corrélation entre les mesures de pathogène et la température de l'eau (des études en laboratoire ont montré un lien entre la température et la mortalité des juvéniles).

Échelle des dates :

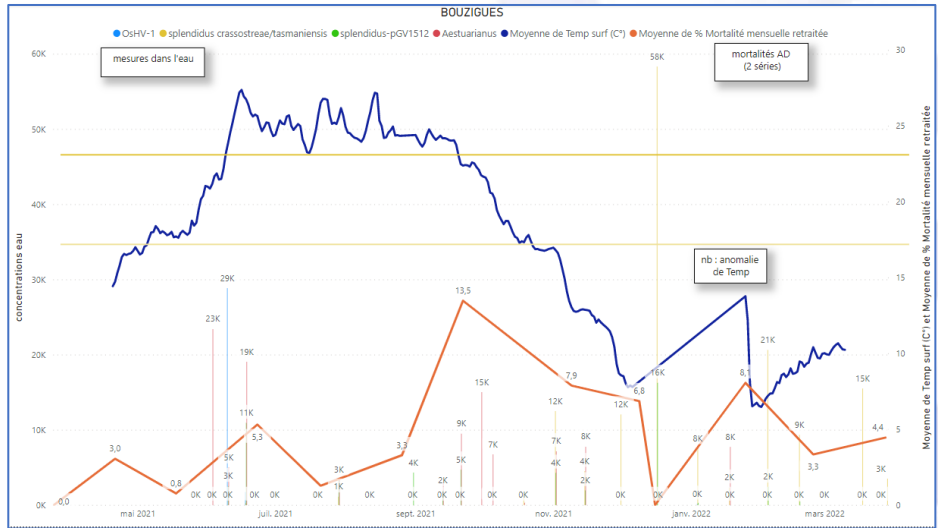
- Représentation en échelle « continue » (ie toutes les dates) : pour voir la dynamique dans le temps et en échelle « événement » (ie seulement chaque date de prélèvement) : pour mieux voir les valeurs et distinguer les pathogènes
 - Températures : identification des seuils « sensibles » d'après la recherche : 17° et 23°
 - Les mesures D-PCR sont instantanées : pas de cumul à faire
- Sujet d'étude à poursuivre : il faudrait disposer de plus de mesures, en particulier aux moments des variations plus rapides de températures

8.1. Comparaisons mesures d-PCR dans l'eau - Températures

Principal pic en dehors des temp sensibles

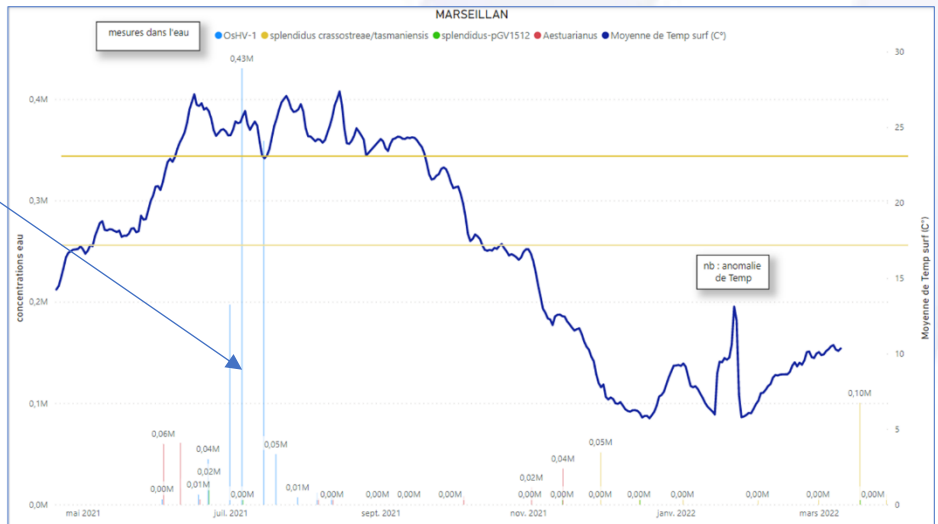


Ajout de la courbe de mortalité mensuelle : pas de conclusions claires par rapport aux températures



Principal pic en dehors des temp sensibles

Idem, pas de tendances évidentes

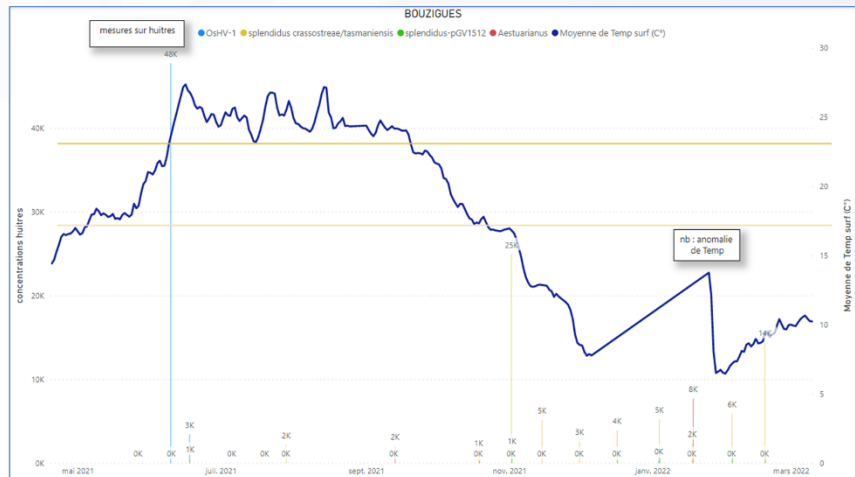


8.2. Comparaisons mesures d-PCR dans les huitres - Températures

Les autres sites font apparaître la même absence de corrélation : pic de mesures de pathogène en dehors des périodes sensibles

Pics en sortie de période de T° sensible

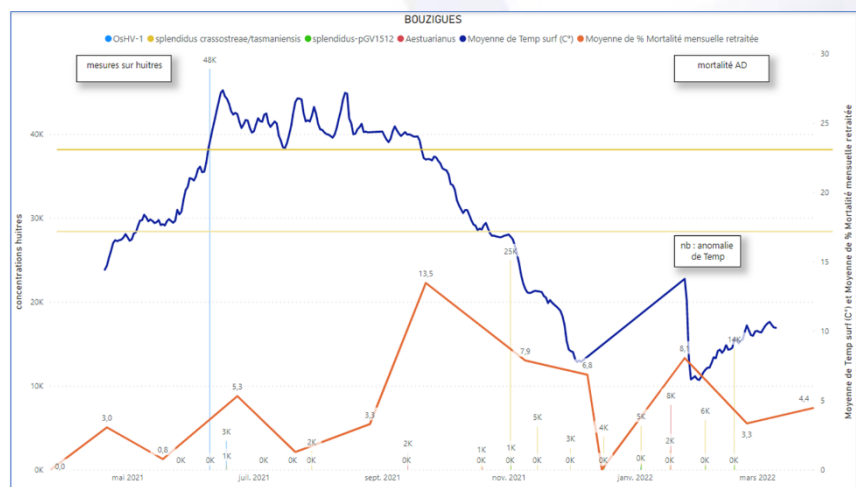
mais présence également en période d'hivers



Ajout de la courbe de mortalités

Liens entre les 3 paramètres difficiles

mesures huitres : usage plus délicat car destructif (seraient-elles mortes ou non ?)



Il semble à ce stade difficile d'établir des liens entre les mesures de pathogène et les températures. On note un pic de mortalité l'hivers, qui semble contraire à un effet des températures.

9. Comparaison mesures d-PCR vs Mortalités : Approche par niveaux et cadrans

On cherche à simplifier la représentation des résultats pour réduire les variations ponctuelles et faire ressortir des tendances.

9.1. Principes des niveaux

- On recherche les liens entre mortalités et mesures dans l'eau
- On compare des mortalités cumulées du mois avec des mesures ponctuelles peu nombreuses réalisées dans la même période
- Pour réaliser une première analyse, on qualifie pour chaque période (les périodes correspondent aux intervalles entre les dates des mesures des mortalités) chacun des deux paramètres uniquement par niveaux, selon des seuils arbitraires :
 - o Mortalité : une valeur « **Basse** » ou « **Haute** », par rapport à un seuil fixé arbitrairement à **5%**
 - o Mesures de pathogène : par rapport à un seuil fixé arbitrairement à au moins une mesure de concentration supérieure à 20 000 ug/l dans la période

- Valeur « - » : pas de mesure dans la période considérée (la date indiquée dans une colonne est celle de fin de période)
- Valeur 0 : des mesures ont été réalisées, tous les résultats sont en dessous des seuils de détection (sera compté comme B ensuite)
- Valeur B (Basse) : toutes les mesures sont sous le seuil retenu
- Valeur H (Haute) : il y a une seule mesure au-dessus du seuil / valeur D (Double) : il y a au moins deux mesures au-dessus du seuil ; (les deux seront compté comme H ensuite)

9.2. Les résultats par niveaux

Mesures de pathogènes dans l'eau :

		2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022	2022	2022	2022
		5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
	période	18/05/2021	23/06/2021	21/07/2021	26/08/2021	22/09/2021		09/11/2021	09/12/2021	25/01/2022	24/02/2022	28/03/2022	03/05/2022	31/05/2022
Bouzigues	1-eau	-	D	0	B	B	-	B	H	H	H	B	H	D
Meze	1-eau	-	H	B	B	B	-	0	B	D	H	H	D	D
Marseillan	1-eau	-	D	D	B	0	-	B	D	B	B	H	D	H

Mortalités par niveaux :

mortalités	AD	2020	25/03/2021	21/04/2021	18/05/2021	23/06/2021	21/07/2021	26/08/2021	22/09/2021		09/11/2021	09/12/2021						
	AD	2021										16/12/2021	25/01/2022	24/02/2022	28/03/2022	03/05/2022	31/05/2022	20/06/2022
	JUV	2021	18/03/2021	16/04/2021	18/05/2021	23/06/2021	21/07/2021	26/08/2021	22/09/2021		09/11/2021							
	JUV	2022														03/05/2022	31/05/2022	20/06/2022
Bouzigues	2N	AD	2020	B	B	B	B	B	B	H	-	H	H					
Bouzigues	3N	AD	2020	B	B	B	B	B	B	H	-	H	H					
Bouzigues	2N	JUV	2021	B	B	B	H	H	B	B	-	B						
Bouzigues	3N	JUV	2021	B	B	B	H	B	B	B	-	H						
Bouzigues	Nat	JUV	2021	B	B	B	H	B	B	B	-	B						
Bouzigues	2N	AD	2021										B	H	B	H	B	B
Bouzigues	3N	AD	2021										B	H	B	B	B	H
Bouzigues	Nat	AD	2021										B	B	B	B	B	B
Bouzigues	2N	JUV	2022													B	B	H
Bouzigues	3N	JUV	2022													B	B	H
Bouzigues	Nat	JUV	2022															B
Meze	2N	AD	2020	B	B	B	B	B	B	B	-	H	H					
Meze	3N	AD	2020	B	B	B	B	B	B	B	-	H	H					
Meze	2N	JUV	2021	B	B	B	H	H	B	B	-	B						
Meze	3N	JUV	2021	B	B	H	H	B	B	B	-	B						
Meze	Nat	JUV	2021	B	B	B	H	B	B	B	-	B						
Meze	2N	AD	2021										B	H	B	B	B	H
Meze	3N	AD	2021										B	H	B	B	B	H
Meze	Nat	AD	2021										B	B	B	B	B	B
Meze	2N	JUV	2022													B	B	H
Meze	3N	JUV	2022													B	B	H
Meze	Nat	JUV	2022															B
Marseillan	2N	AD	2020	B	B	B	B	B	B	H	-	B	B					
Marseillan	3N	AD	2020	B	B	B	H	B	B	H	-	B	B					
Marseillan	2N	JUV	2021	B	H	B	H	H	B	B	-	B						
Marseillan	3N	JUV	2021	B	B	B	B	B	B	B	-	H						
Marseillan	Nat	JUV	2021	B	B	B	B	B	H	B	-	B						
Marseillan	2N	AD	2021										B	B	B	B	H	H
Marseillan	3N	AD	2021										B	H	B	B	B	B
Marseillan	Nat	AD	2021										B	B	B	B	B	B
Marseillan	2N	JUV	2022															
Marseillan	3N	JUV	2022															
Marseillan	Nat	JUV	2022													B	H	H

On note :

AD :

- En 2021, des mortalités basses au printemps-été, suivie d'une mortalité élevée des AD l'hivers 2021-2022 (autant celles mises à l'eau en 2020 que celles mises à l'eau en 2021), sur Bouzigues et Marseillan en particulier
- En 2022, des mortalités plus importantes au printemps, dès mars 2022

JUV :

- Une mortalité élevée des JUV sur les deux saisons, qui semble centrée sur juin en 2021 et avril en 2022 ; la mortalité de 2022 semble plus forte
- La mortalité 2022 semble plus fréquente et plus précoce

→ **C'est cohérent avec des mesures dans l'eau élevées en juin 2021 et de décembre 2021 à mai 2022**

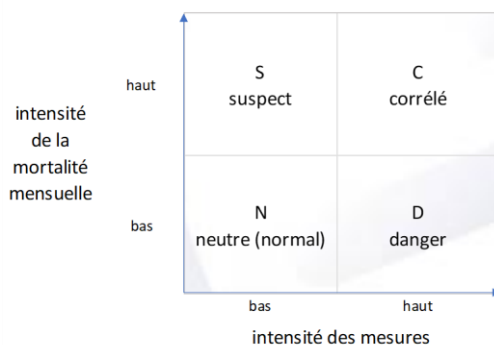
→ Pour aller plus loin : approche par « cadran »

9.3. Principes des cadrans

On cherche à vérifier l'existence de corrélations possibles à partir des niveaux identifiés ci-dessus, et à orienter la poursuite des études.

Le cadran pour représenter les mesures et les mortalités

- Chaque période entre deux mesures de mortalité sera affectée dans le cadran selon la valeur haute ou basse de la mortalité et des mesures
- On fait apparaître 4 cas
 - o N : situation qualifiée de normale ou neutre
 - o D : situation de « danger » : concentrations élevées de pathogènes à un moment dans l'eau sans forte mortalité observée dans la période (mais risque de contamination ensuite ?)
 - o S : situation suspecte : forte mortalité sans mesures élevées de pathogènes : mesures insuffisantes ? Ou pas au bon moment ?
 - o C : corrélation entre mesures élevées et forte mortalité



9.4. Résultats par cadrans : identification de corrélations et de tendances

Les types d'huitres sont cumulés dans ce tableau :

		2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022	2022	2022	2022	2022	2022
		5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
Bouzigues	AD	2020	-	C	N	N	S	-	S	C						
Meze	AD	2020	-	D	N	N	N	-	S	S						
Marseillan	AD	2020	-	C	D	N	S	-	N	D						
Bouzigues	JUV	2021	-	C	S	N	N	-	S							
Meze	JUV	2021	-	C	S	N	N	-	N							
Marseillan	JUV	2021	-	D	C	S	N	-	S							
Bouzigues	AD	2021								D	C	D	S	D	D	D
Meze	AD	2021								N	C	D	D	D	C	C
Marseillan	AD	2021								D	S	N	D	C	C	C
Bouzigues	JUV	2022										N	D	D	C	C
Meze	JUV	2022										D	D	D	C	C
Marseillan	JUV	2022										D	C	C	C	C

C	corrélés	15
S	suspect	12
D	danger	17
N	neutre	16

Observations :

- On note une forte corrélation sur les JUV : lien entre la détection dans l'eau et une mortalité importante immédiate ou à la période suivante
- Les cas « C » sont souvent proches de cas « S » ou « D », ce qui renforce la présomption de lien
- Cela tend à confirmer la possibilité d'établir des liens entre les mesures dans l'eau et la mortalité, sans pouvoir dire à ce stade si la mesure précède la mortalité ou en résulte.

Cela ouvre des pistes de travail :

- **Tester les eaux et les huitres avant leur implantation dans un nouvel environnement**
- **Poursuivre les investigations pour identifier plus précisément les mécanismes d'apparitions des pathogènes dans l'eau versus la mortalité constatée.**

Complément : cadran des niveaux mesures de pathogène – mortalités par types d’huitre :

type :			2N	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022	2022	2022	2022	2022	2022	
				5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			
Bouzigues	AD	2020		-	D	N	N	S	-	S	C									
Meze	AD	2020		-	D	N	N	N	-	S	S									
Marseillan	AD	2020		-	D	D	N	S	-	N	D									
Bouzigues	JUV	2021		-	C	S	N	N	-	N										
Meze	JUV	2021		-	D	S	N	N	-	N										
Marseillan	JUV	2021		-	D	C	N	N	-	N										
Bouzigues	AD	2021									D	C	D	S	D	D	D			
Meze	AD	2021									N	C	D	D	D	D	C			
Marseillan	AD	2021									D	N	N	D	C	D	C			
Bouzigues	JUV	2022												N	D	C				
Meze	JUV	2022												D	D	C				
Marseillan	JUV	2022																		

type :			3N	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022	
				5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			
Bouzigues	AD	2020		-	C	N	N	S	-	S	C									
Meze	AD	2020		-	D	N	N	N	-	N	S									
Marseillan	AD	2020		-	C	D	N	S	-	N	D									
Bouzigues	JUV	2021		-	C	N	N	N	-	S										
Meze	JUV	2021		-	C	N	N	N	-	N										
Marseillan	JUV	2021		-	D	D	N	N	-	S										
Bouzigues	AD	2021									D	C	D	N	D	D	D			
Meze	AD	2021									N	C	D	D	D	D	C			
Marseillan	AD	2021									D	S	N	D	D	D	D			
Bouzigues	JUV	2022												N	D	C				
Meze	JUV	2022												D	D	C				
Marseillan	JUV	2022																		

type :			Nat	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022	
				5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6			
Bouzigues	AD	2020		-	-	-	-	-	-	-	-									
Meze	AD	2020		-	-	-	-	-	-	-	-									
Marseillan	AD	2020		-	-	-	-	-	-	-	-									
Bouzigues	JUV	2021		-	C	N	N	N	-	N										
Meze	JUV	2021		-	C	N	N	N	-	N										
Marseillan	JUV	2021		-	D	D	S	N	-	N										
Bouzigues	AD	2021									D	C	D	N	D	D	D			
Meze	AD	2021									N	D	D	D	D	D	D			
Marseillan	AD	2021									D	N	N	D	D	D	D			
Bouzigues	JUV	2022																		
Meze	JUV	2022																		
Marseillan	JUV	2022													D	C	C			