

Du concept de santé à la détermination d'intervalles de référence chez l'huître creuse Crassostrea gigas

Cyrille François

▶ To cite this version:

Cyrille François. Du concept de santé à la détermination d'intervalles de référence chez l'huître creuse Crassostrea gigas. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2019. Français. NNT: 2019LAROS022. tel-02900287

HAL Id: tel-02900287 https://theses.hal.science/tel-02900287

Submitted on 16 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Ifremer

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE EUCLIDE

Ifremer

Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE)

Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M)

Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM, La Tremblade)

THÈSE

présentée par :

Cyrille FRANÇOIS

soutenue le 04 Octobre 2019 pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline: Sciences et technologie

Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

Du concept de santé à la détermination d'intervalles de référence chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

JURY:

Catherine Trumel Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Rapporteur

Laurent Barillé Professeur, Université de Nantes, Rapporteur

Guylaine Collewet IRSTEA Rennes, Examinateur Tristan Renault Ifremer Nantes, Directeur de thèse

Je remercie les membres du jury : le Professeur Catherine Trumel et le Professeur Laurent Barillé d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Docteur Guylaine Collewet de me faire l'honneur d'être examinateur de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues à Ifremer, en particulier Tristan Renault, directeur de thèse, chercheur en pathologie et Joël Haure chercheur en physiologie, pour leurs contributions directes à ce travail de thèse par leurs échanges scientifiques et la participation à la rédaction d'articles.

Ce travail a été effectué à la station Ifremer de La Tremblade et je remercie les membres de la Plateforme Expérimentale des Mollusques Marins de La Tremblade (PMMLT), des laboratoires de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM) et Environnement Littoral des Pertuis Charentais (LERPC) qui ont participé.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Acc: nombre d'accumulations ou nombre d'excitations

AFSSAPS : agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé

ARS : agence régionale de santé

ASVCP : société américaine de pathologie clinique vétérinaire

BP: bande passante

CDSS: commission des déterminants sociaux de la santé

DICOM : norme standard pour la gestion informatique des données issues de l'imagerie

médicale [Digital imaging and communications in medicine]

DDPP: direction départementale de la protection des populations

DDTM : direction départementale des territoires et de la mer

DGAL : direction générale de l'alimentation

DGS: direction générale de la santé

Flip: angle de bascule

FOV : champ de vue [Field Of View]

GDS: groupement de défense sanitaire

GTV: groupement technique vétérinaire

IRM : imagerie par résonance nucléaire

LGPMM : laboratoire de génétique et de pathologie des mollusques marins (Ifremer La

Tremblade)

LPI: laboratoire de physiologie des invertébrés (Ifremer, Argenton)

NAC : nouveaux animaux de compagnie

NGS : séquençage de nouvelle génération

NRC: conseil national de la recherche

OMS : organisation mondiale de la santé

OVS : organisme à vocation sanitaire

OVVT : organisation vétérinaire à vocation technique

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PIPAME : pôle interministériel de prospective et d'anticipation des mutations économiques

PMMB: plateforme des mollusques marins de Bouin (Ifremer, Bouin)

PMMLT: plateforme des mollusques marins de La Tremblade (Ifremer, La Tremblade)

QALS : comité d'assurance qualité et de normalisation des laboratoires

RI: intervalle de référence

RMN: résonance magnétique nucléaire

RT PCR : transcription inverse en chaîne par polymérase

RV : valeur de référence

SAGE : analyse en série de l'expression des gènes

T1: temps de relaxation longitudinal

T2: temps de relaxation transversal

TE: temps d'écho

TR: temps de répétition

- Figure 1. Perspectives disciplinaires et santé chez l'être humain
- Figure 2. Proposition de perspectives disciplinaires sur le sujet de la santé chez les mollusques marins
- Figure 3. Choix de la physiopathologie pour l'étude de la santé biologique des mollusques marins
- Figure 4. Distributions supposées des valeurs d'un biomarqueur chez une population «en bonne santé » et chez une population « en mauvaise santé »
- Figure 5. Relations entre les termes liés aux valeurs de référence
- Figure 6. Représentation schématique d'une distribution de référence, d'un intervalle de référence, des limites de références et des intervalles de confiances (CI) des limites
- Figure 7. Statuts réglementaires d'un biomarqueur de santé employé lors d'essai clinique
- Figure 8. Schéma du dispositif d'acquisition pour la détermination de valeurs de référence de CR et d'OCR
- Figure 9. Dispositif en cours de réalisation d'acquisitions pour la détermination de CR et d'OCR
- Figure 10. Échelle clinique proposée pour l'évaluation de la santé de C. gigas
- Figure 11. Principe de l'imagerie par résonance magnétique anatomique
- Figure 12. Acquisition d'images IRM pour l'estimation de la masse de chair de *C. gigas*
- Figure 13. Schéma type de croisements pour l'obtention des populations d'étude
- Figure 14. Hypothèses pour la détermination de l'énergie de maintien (No Net Production NNP)
- Figure 15. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population U1 diploïde non sélectionnée
- Figure 16. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population U5 diploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1

- Figure 17. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population EC triploïde non sélectionnée
- Figure 18. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population DA triploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1
- Figure 19. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population I tétraploïde non sélectionnée
- Figure 20. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population III tétraploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1
- Figure 21. Absence de différence significative au seuil de 5% entre les valeurs moyennées de CR sur les deux premières heures et celles journalières de J1 à J3 chez les *C. gigas* « témoins » de 5/6 populations d'étude
- Figure 22. Absence de différence significative au seuil de 5% entre les valeurs moyennées d'OCR sur les deux premières heures et celles journalières de J1 à J6 chez les *C. gigas* « témoins » de populations d'étude
- Figure 23. Courbes ROC à J2 et J3 de l'échelle clinique
- Figure 24. Estimation de la masse de chair de *C. gigas* avec et sans antenne tête dans l'IRM Siemens AVANTO
- Figure 25. Exemple de distorsion géométrique selon la position du corps mesuré dans l'IRM
- Figure 26. Exemple de variation spatiale d'intensité selon la position du corps mesuré dans l'IRM
- Figure 27. Dispositif d'enceintes pour l'acquisition IRM en un passage de soixante-neuf huîtres creuses
- Figure 28. Poster exposant la mise au point d'une application permettant le traitement automatisé d'images IRM pour estimer la masse de chair sur un grand nombre d'huîtres
- Figure 29. Variations des moyennes des masses de chair sèche estimées en fonction du temps, chez trente huîtres infectées (I) et trente huîtres non infectées (NI)

Figure 30. Variations de température mesurées sur un yaourt par fibre optique et par IRM à différents TE en fonction du temps, après correction des variations de phase non liées à la température

Figure 31. Variations de température mesurées par fibre optique et par IRM à TE 15,5 ms sans et avec correction en fonction du temps sur une huître creuse placée dans l'IRM à température ambiante

Figure 32. Exemple de cartographie d'écart de température sur la première image acquise sans (à gauche) et avec (à droite) correction de la phase (TE 15,5 ms) sur l'ensemble de la chair d'une huître creuse

Figure 33. Poster exposant le projet IMAGIGAS au colloque Physiomar les 18-21 septembre 2017 à Cambridge

Figure 34. Dialogue entre recherches et applications pratiques dans le domaine de la santé chez *C. gigas*

Tableau I. Natures et techniques d'identification de biomarqueurs

Tableau II. Fonctions des biomarqueurs

Tableau III. Stratégie et choix de couple biomarqueur / méthode d'acquisition

Tableau IV. Facteurs de variations biologiques du CR chez C. gigas

Tableau V. Facteurs de variations biologiques de l'OCR chez C. gigas

Tableau VI. Facteurs de variations pré-analytiques et analytiques du CR et de l'OCR chez *C. gigas*

Tableau VII. Critères d'inclusion et d'exclusion d'individus du groupe échantillon de référence

Tableau VIII. RI de CR et OCR d'un échantillon de référence de *C. gigas* diploïdes (masse totale humide 6,23-83,64 g, masse de chair sèche 0,06-1,87 g) nourries avec 30 à 40 cellules µl⁻¹ d'*Isochrysis affinis galbana* (clone T-iso) et placées dans une eau de mer à la température de 22°C et à la salinité de 32 ‰

Tableau IX. Comparaison des valeurs moyennes sur deux heures de CR et d'OCR chez les échantillons de référence et de validation interne à la température de 22°C et à la salinité de 32 ‰

Tableau X. Comparaison de valeurs moyennes sur deux heures de CR et d'OCR chez les échantillons de populations d'étude à la température de 22°C et à la salinité de 32 ‰

Tableau XI. Analyse de variances à deux facteurs (niveau de sélection, ploïdie) pour les biomarqueurs étudiés sur des échantillons (n=20) de six populations d'étude.

Tableau XII. Analyse de variances à un facteur (ploïdie) pour les biomarqueurs étudiés sur des échantillons (n=40) d'huîtres creuses diploïdes (2n), triploïdes (3n), tétraploïdes (4n)

Tableau XIII. Synthèse des différences significatives au seuil de 5% entre les valeurs moyennées de CR et d'OCR des deux premières heures avant et celles deux heures après immersion en EMC ainsi que les valeurs moyennées à J1, J2, J3, J4, J5 et J6 chez les huîtres creuses à l'issue fatale et celles survivantes.

Tableau XIV. Note d'échelle affectée aux animaux exposés à OsHV-1 en fonction du temps

Tableau XV. Note d'échelle affectée aux animaux témoins en fonction du temps

Tableau XVI. Spécificités et sensibilités pour les différentes notes attribuées de l'échelle à clinique à J2 et J3

Tableau XVII. Statistique c à J2 et J3 de l'échelle clinique

Tableau XVIII. Comparaison de masses de chair sèche moyennes estimées par IRM en fonction de deux facteurs Date et État I / NI chez trente huîtres infectées (I) et trente huîtres non infectées (NI)

Tableau XIX. Comparaison des masses de chair sèches et leurs variations entre t0 et t0+72h estimées selon le modèle statistique expérimental et le modèle physiologique

Tableau XX. Principaux résultats et difficultés rencontrées pour objectiver la santé biologique de *C. gigas* par le suivi de biomarqueurs d'intérêt

TABLE DES MATIÈRES

INT	ROE	วบตา	TON	1
			IE SANTÉ DES SANTÉS	
			origines du mot santé	
	1.:	1.	Etymologie grecque	3
	1.	2.	Etymologie latine	4
2	2.	Un c	concept relatif	5
3	3.	Ses	acceptions actuelles	6
	3.	1.	La définition biomédicale de la santé	6
	3.:	2.	La définition de la santé par l'OMS	7
	3.3	3.	Evolution cyclique des définitions de la santé	8
4	١.	Des	usages aux catégories de santé	8
5	5.	Les	déterminants de santé	9
6	ò.	Un é	equilibre précaire	11
PAI	RTIE	II CC	DMMENT APPREHENDER LA SANTÉ CHEZ LES MOLLUSQUES MARINS ?	13
1		Le d	euil de la totalité et le choix d'une discipline scientifique	13
2	2.	L'int	ention du chercheur et le choix de la méthode de recherche en santé	16
3	3.	Obje	ectiver la santé biologique et énoncer la question de recherche	17
	3.	1.	Le suivi de biomarqueurs de santé	17
	3.	2.	De la normalité à la théorie des valeurs de référence	18
	3.	3.	De l'hypothèse théorique à la question de recherche	21
III C	НО	IX ET	SUIVI DE BIOMARQUEURS DE SANTÉ CHEZ L'HUITRE CREUSE	23
	 aria		nier enjeu : choix de biomarqueurs de santé et de méthodes d'acquisition de leurs s biologiques chez <i>C. gigas</i>	23
	1.	1.	Classification des biomarqueurs de santé	23
	1.	2.	Développement d'un biomarqueur de santé	25
	1.: d':		Appliquer une stratégie pour le choix de biomarqueurs de santé et de méthodes isition chez <i>C. gigas</i>	26
		•	puyer sur l'existant avec des biomarqueurs mesurables connus, qui seront employés p nination d'intervalles de référence	
	2.:	1.	Biomarqueurs de la prise alimentaire	28
	2.:	2.	Biomarqueurs de l'activité respiratoire	35
	2.:	3.	Dispositif d'acquisition et détermination de valeurs de CR, OCR, FTA, RTA	46

_		ttre en avant l'observation : examen physique de l'animal et proposition d'une é	
C	3.1.	Elaboration et validations d'un score clinique	
	3.2.	Proposition d'une échelle clinique pour évaluer la santé chez <i>C. gigas</i>	
4 c	l. D'a	utres approches en développement : estimation de la masse de chair et de la ter le par imagerie par résonance magnétique	mpérature
	4.1.	Masse de chair en tant que biomarqueur de l'état général de santé	54
	4.2. d'infla	Température corporelle en tant que biomarqueur de l'état général et marqueummation locale	
	4.3.	Dispositif d'acquisition utilisé et calculs des valeurs de biomarqueurs	56
5	. Sec	ond enjeu : constituer des populations de <i>C. gigas</i> présumées saines	58
	5.1.	Population de référence	58
	5.1	Groupe échantillon de référence pour la détermination de RI	59
	5.1	2. Groupe échantillon pour la validation interne des RI	60
	5.2.	Populations d'études	60
		NTERVALLES DE REFERENCE ET AUTRES RESULTATS D'INTERET DU SUIVI DE JEURS DE SANTE CHEZ L'HUITRE CREUSE	62
1	Tro	isième enjeu : proposition de RI du CR et de l'OCR	62
	1.1.	Détermination de RI du CR et de l'OCR chez une population de référence	62
	1.2.	Validation des RI du CR et de l'OCR	86
	1.3.	Valeurs observées de CR, OCR, FTA, RTA, NNP chez des populations d'étude d'les de niveaux de sélection et de ploïdies différents	
	1.4.	Pertinence du choix du CR et de l'OCR en tant que biomarqueurs de santé	91
2	. Pro	position d'une échelle clinique	101
3	. Est	mation de la masse de chair et la température corporelle par IRM	106
	3.1.	Estimation de la masse de chair à haut débit par IRM	106
	3.1	1. Développements méthodologiques	106
	3.1 d'ir	2. Suivi de la masse de chair sèche d'huîtres creuses à haut-débit par IRM lo fection expérimentale par OsHV-1	
	3.2.	Estimation de la température corporelle par IRM	113
	3.2	Développements méthodologiques	114
	3.2 exp	2. Suivi de la température corporelle d'huîtres creuses par IRM lors d'infecti érimentale par OsHV-1	
4	. Syn	thèse des résultats acquis par les approches développées dans la thèse	118
		ISCUSSION : APPRÉHENDER LA SANTE BIOLOGIQUE ET ENVISAGER LES AUTRES	119

1	1. Le c	oncept de santé des mollusques marins est-il précisé à l'issue de ces travaux de	
r	echerch	e ?	. 119
	1.1.	Premier enjeu : choisir des biomarqueurs d'intérêt de la santé biologique	. 121
	1.2.	Deuxième enjeu : constituer des populations d'huîtres creuses saines	. 122
	1.3.	Troisième enjeu : déterminer des valeurs et intervalles de référence	. 122
	1.4.	Quatrième enjeu : émettre des hypothèses sur la santé d'une population	. 124
2	2. Pers	spectives de recherche	. 125
	2.1. de plo	Comparer les valeurs observées de biomarqueurs entre populations d'étude de <i>C. gi</i> gities et de niveaux de sélection différents	•
	2.2.	Contribuer à la description de tableaux cliniques de maladies chez C. gigas	. 126
	2.3.	Développer l'imagerie médicale dans la recherche sur la santé de <i>C. gigas</i>	. 127
	2.4.	Identifier des déterminants de la santé chez C. gigas	. 128
	2.5.	Valider des biomarqueurs pour des mesures à haut débit et à grande échelle	. 129
	2.6.	Améliorer et valider l'échelle clinique	. 130
	2.7.	Confirmer les intervalles de référence de <i>C. gigas</i> et comprendre leurs implications	. 131
	2.8.	Vers la recherche sur le bien-être chez les mollusques marins	. 132
3	3. Арр	lications : diagnostiquer, pronostiquer et décider ?	. 132
	3.1.	Des outils de diagnostic et de pronostic chez C. gigas	. 132
	3.2.	Des outils de décision	. 133
RÉF	FÉRENCE	:S	. 135

INTRODUCTION

Considérée comme une préoccupation de tous, la santé n'est pas un concept facile à cerner. S'il n'existe pas une définition universelle de la santé, ses différents usages et acceptions permettent toutefois d'en préciser les dimensions biologique, psychique et sociale. En santé animale, la dimension biologique demeure la plus étudiée, mais il n'existe pas pour autant de définition consensuelle à portée internationale de la santé animale. Dès lors comment appréhender la santé chez les mollusques marins ?

La présente thèse se compose de cinq parties.

La première partie « une santé ... des santés » aborde la santé au sens large chez les êtres vivants et souligne l'étendu du concept de santé.

La seconde partie « comment appréhender la santé chez les mollusques marins ?» pose les choix de l'auteur en termes de discipline, de méthode et de théorie scientifiques pour étudier la santé chez l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) et énonce la question scientifique.

La troisième partie « choix et suivi de biomarqueurs de santé chez l'huître creuse » expose la stratégie de choix des biomarqueurs et les matériels et protocoles employés pour déterminer leurs variations physiopathologiques.

La quatrième partie « intervalles de référence et autres résultats du suivi de biomarqueurs de santé chez l'huître creuse » présente les résultats des expérimentations menées au cours de la présente thèse ainsi que leur valorisation.

La cinquième partie « discussion : appréhender la santé biologique et envisager les autres dimensions de la santé chez l'huître creuse » commente les résultats obtenus et soulève les perspectives associées et celles dépassant le cadre strict de cette thèse.

« La polysémie et la pluralité des dimensions de la santé rendent sa définition particulièrement délicate » (Cousteaux 2010). Paradoxe de la santé, qui est considérée comme une préoccupation de tous, mais pour laquelle il n'existe pas une définition universelle.

Nous proposons dans cette première partie de réaliser une analyse sémantique du terme santé, « à travailler à partir de l'étymologie, en mettant en relief les acceptions successives de ce mot selon les champs dans lesquels il est ou a été utilisé pour faire comprendre les significations du mot aujourd'hui » (Eymard *et al.* 2004). Il s'agit également de se donner un système de références avant d'introduire ce que pourrait être la santé des mollusques marins.

1. Des origines du mot santé

Le terme santé est employé par plusieurs cultures et il serait vain d'attribuer son origine à l'une d'elle en particulier. Dès lors, il faut faire un choix de présentation et comme Pichot (2008), choisissons les étymologies grecque et latine et dressons leurs liens avec l'étymologie de la santé dans les autres cultures indo-européennes.

L'origine du terme santé dans d'autres cultures, en particulier asiatiques, est diversement renseignée dans les écrits et même si elle est d'un intérêt certain, nous posons le choix de ne pas la détailler ici.

1.1. Etymologie grecque

Déjà dans l'Antiquité, plusieurs mots étaient employés pour définir la santé.

Ugieia

Ugieia est la bonne santé, mais aussi la guérison et la médecine. Il s'agirait d'un mot composé comprenant *eus* bon et *zoe* ou *bios* vie et signifierait alors la bonne vie. Elle a donné hygiène en français.

Hexis

Hexis a de nombreux sens en lien avec la santé : état habituel du corps, état habituel de l'esprit, tempérament. Hexis associé à cacos mauvais, se dit cachexia, la mauvaise santé, qui a donné cachexie en français.

Nosos

Nosos signifie maladie et également folie, désastre ou malheur. Nosos a donné nosologie et nosographie en français. L'étymologie de nosos est inconnue.

Pathos

Pathos désigne également la maladie, ce que l'on éprouve et subit, ce qui affecte le corps ou l'âme en bien ou en mal. L'étymologie de pathos est inconnue. Pathos a donné plusieurs termes qui associent la maladie, la douleur à la passivité. Les latins l'ont retranscrit dans passivus passif et patiens qui supporte ou endure. De pathos à patiens, le patient en français est un malade qui endure.

1.2. Etymologie latine

Sanitas

En latin, la santé est désignée par le nom commun sanitas qui signifie santé du corps, mais aussi santé de l'esprit, raison ou bon sens. Sanitas est lui-même issu de l'adjectif sanus qui signifie sain, mais aussi raisonnable, sensé, sage. L'étymologie de sanus est inconnue. Dérivant de sanus, le verbe sano signifie guérir, remédier, réparer. S'y rattachent sanatio guérison, santivus curatif, sanabilis guérissable et salutaire. Les mots apparentés à sanitas renvoient donc à l'idée de bonne santé ou de rétablissement de cette santé, qui concerne le corps mais aussi l'esprit. Sanus semble être la racine de différents termes relatifs à la santé dans plusieurs langues indo-européennes: sanidad en espagnol, sanita en italien, gesund sain et Gesundheit santé en allemand, sanity santé mentale ou jugement sain et soundness santé ou solidité en anglais, pour n'en citer que quelques exemples.

Salus

Le nom commun salus signifie entier, intact mais aussi sain, en bonne santé, salut. Est donc sain, celui qui est entier, intact. Saluer quelqu'un, est aussi lui souhaiter la santé. Il a donné saluber salubre, salutaire, salubritas salubrité, salveo être en bonne santé, salvo guérir. L'étymologie de salus est indo-européenne et se retrouve également dans sauf en français, salud santé et saludo salut en espagnol, salute santé et saluto salut en italien. Cette étymologie a donné holos entièrement, tout en grec, dont découlent hail ou hi salut et health santé en anglais, heilen guérir et Heil, Wohl bien-être en allemand, pour n'en citer que quelques exemples.

Valetudo

Du verbe valeo être fort, vigoureux, valetudo signifie bonne santé quand il est utilisé seul, et plutôt état de santé quand il est complété par un adjectif bona bon ou mala mauvais. Valetudo peut donc aussi bien désigner la santé, l'état de santé (bon ou mauvais) et même la maladie. D'autres termes y sont apparentés dont invalidus faible ou impuissant, valetudinarus malade et valetudinarium hôpital, infirmerie.

Il ne semble pas exister de limite nette entre santé et maladie et il est difficile de donner un début et une fin à chacune d'elles. Intéressons-nous brièvement à l'étymologie du mot maladie et des termes qui lui sont associés.

Malum

Malum désigne la maladie et a donné malus méchant, malin, mauvais, malheureux et malignitas malignité, méchanceté. Ces termes sont du domaine de la santé morale, plus que de la santé physique ou de la santé mentale. L'étymologie de malum vient du grec meleos vain, inutile, misérable.

Morbus

Morbus signifie également maladie et a pour dérivés morbido, morbifer rendre malade, morbidus, morbosus malade et maladif. L'étymologie de morbus est inconnue.

Aegrotatio

Aegrotatio désigne la maladie, le mauvais état de santé. Il dérive de aeger malade physiquement ou mentalement, mais aussi douloureux, pénible. C'est donc aussi une sensation, une perception en plus d'être une maladie physique ou mentale. L'étymologie d'aeger est inconnue.

De cet exposé étymologique, il est possible déjà de constater que la santé est multiple (physique, mentale, morale, spirituelle ...), que « la santé et la maladie forment un complexe dans lequel elles entretiennent certains rapports à élucider » (Pichot 2008).

2. Un concept relatif

Des personnes interrogées sur les significations de la santé donnent des représentations différentes de la santé (Cottreel 2015). Il semblerait qu'il ne soit pas possible de la définir dans l'absolu et qu'elle soit différente selon les personnes, les époques, les lieux, les activités qui lui sont associées, en résumé le contexte.

Le concept de santé est ainsi relatif à plus d'un titre.

Il est souvent décrit comme un **état** auquel on oppose son contraire « la mauvaise santé », elle-même associée à des termes tels que maladie et handicap. Dans certains cas l'opposition est dépassée et il est fait mention de plusieurs états de santé, d'un **continuum dynamique** entre bonne et mauvaise santé.

Il s'appuie sur le **vécu** des individus différents les uns des autres « La santé comme phénomène collectif relevant de l'opinion publique » (Morin 2006). Cependant, la variété des représentations et des critères employés par les individus pour estimer leur état de santé personnel est telle qu'il est légitime de se poser la question si la définition de la « bonne santé » est collectivement partagée (Cousteaux 2010).

Il **évolue au cours du temps**. La santé a toujours eu une place importante dans la vie des personnes. D'une préoccupation centrale, elle est devenue un **droit**. « La santé est un droit fondamental de l'être humain et un facteur indispensable au développement économique et social » (OMS 1997).

Il est variable d'un site à un autre, selon ses caractéristiques socio-économiques et politiques par exemple. D'une nécessité d'avoir au moins une santé physique (conception utilitariste), nous accédons dans certains pays, dans certaines catégories socio-professionnelles au **bien-être** (conception hédoniste de la santé) (D'Houtaud 2003).

Il peut s'étendre et être associé à d'autres domaines que celui de la médecine. Pour n'en citer que deux, mentionnons la sociologie de la santé (Herzlich et Pierret 2010) et l'économie de la santé (Serré 2002). Mais il est aussi possible de s'intéresser à la santé de l'économie...

3. Ses acceptions actuelles

Certains corps de métiers se sont penchés sur la question de la santé et ont essayé de la définir, la référence à une définition étant importante pour l'exercice de leurs fonctions (Cottreel 2015).

3.1. La définition biomédicale de la santé

« Absence de maladies et d'infirmités »

Cette définition est relativement restrictive et ancienne. Elle provient du milieu médical, plus précisément du modèle biomédical qui est dominant en médecine depuis le milieu du XIXème siècle. Ce modèle place la maladie au centre, une maladie qu'il faut diagnostiquer, comprendre et le cas échéant traiter. La prise en charge du malade, du patient découle de ce centrage sur la maladie. La santé y est définie **en négatif** par rapport aux termes de **maladie**, d'**infirmité**. C'est « la vie dans le silence des organes » (Leriche 1936). Elle est d'intérêt pour les professionnels de santé dont le rôle est d'intervenir sur la maladie et le handicap pour en limiter leurs effets perturbateurs et pour rétablir la santé chaque fois que la science et la médecine le permettent.

La définition biomédicale de la santé, progressivement passée dans le langage commun, en a inspiré de nombreuses autres, pour évoluer vers une santé que l'on peut définir par ce qu'elle est (forme positive) et par ce qu'elle n'est pas (forme négative), mais toujours avec des termes empruntés au milieu médical. Un exemple est donné ici avec celle du centre national de ressources textuelles et lexicales.

« État physiologique normal de l'organisme d'un être vivant, en particulier d'un être humain qui fonctionne harmonieusement, régulièrement, dont aucune fonction vitale n'est atteinte, indépendamment d'anomalies ou d'infirmités dont le sujet peut être affecté» (CNRTL 2018).

3.2. La définition de la santé par l'OMS

« Etat complet de bien-être physique, mental et social qui ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité » (OMS 1946).

Issue de la Constitution de l'OMS signée le 22 juillet 1946 et entrée en vigueur le 07 avril 1948, cette définition est une acception plus ambitieuse du concept de santé.

La santé est à la fois biologique (plutôt que physique), psychique (plutôt que mentale), sociale et ne se limite donc pas au maintien de l'intégrité et au bon fonctionnement mécanique du corps. Il a même été envisagé d'y ajouter une dimension spirituelle sur le sens que l'on donne à la vie (OMS 2005). Par l'énoncé de ces différentes dimensions, la santé n'apparaît plus comme le sujet d'intérêt du seul milieu médical, d'autres professions et disciplines vont pouvoir confirmer leur légitimité dans le sujet de la santé. Cette définition combine les formes positive, ce qu'elle est (ses dimensions) et négative, ce qu'elle n'est pas (maladie, infirmité) mais dans un rapport à l'équilibre modifié. Le centre s'est en quelque sorte déplacé vers l'être humain (biologique, psychique, social et spirituel) sans toutefois omettre totalement les maladies et infirmités ... héritages de la définition biomédicale.

Cette définition peut susciter de nombreux commentaires et questionnements, nous pouvons en souligner les principaux (Mias 1996).

La santé est définie en référence au bien-être. Ce dernier est perçu par l'homme, qui peut donc de son propre chef se dire ou non en bonne santé, puisque c'est son bien-être personnel qui définit la santé. Cela peut parfois aboutir à des erreurs avec une personne qui dans l'instant présent se perçoit en bonne santé, alors qu'échappant en quelque sorte au monde médical, elle développe à bas bruit une maladie non diagnostiquée.

Atteindre l'état complet de bien-être peut également soulever plusieurs interrogations. S'agit-il vraiment d'un état statique ou plus d'une succession, d'un continuum dynamique ? «Notre vie n'est que mouvement » (Montaigne 1595). Ce continuum n'est pas « sans interruption et sans rupture, d'un état complet de bien-être jusqu'à la mort, en passant par toutes les formes de maladies et d'incapacités » (Contandriopoulos 2006).

Que représente également le qualificatif complet et comment mesurer cette complétude ? « La santé n'est même, dans les sociétés comme dans les organismes individuels, qu'un type-idéal qui n'est nulle part réalisé tout entier. Chaque individu sain en a des traits plus ou moins nombreux ; mais nul ne les réunit tous » (Durkheim 1893).

La définition « officielle » de la santé par l'OMS est ambitieuse et a le mérite d'apporter une vision globale multidimensionnelle de l'être humain. Elle sert d'accord aux Etats membres de l'OMS pour l'élaboration de politiques de santé publique et est donc d'intérêt pour tous ses acteurs (élus, administrateurs, techniciens...).

Il est à noter qu'il n'existe pas de définition consensuelle à portée internationale de la santé animale, équivalente à celle proposée par l'OMS pour la santé humaine (Nicks et Vandenheede 2014).

3.3. Evolution cyclique des définitions de la santé

De nombreuses définitions ont été proposées pour nuancer ou compléter la définition de l'OMS.

Certaines ont émanées de professionnels de la santé (gestionnaire de santé, corps médical, chercheurs en biologie et en médecine...). D'autres professions ont également abordé la santé, mais sous l'angle des interfaces qu'elle entretient avec d'autres domaines, générant ainsi de nouveaux sujets à étudier, voire des thématiques de recherche (économie de la santé, sociologie de la santé...).

Nous voyons ainsi poindre un **cycle** récurrent : d'une préoccupation commune à tous mais mal définie, suivent des définitions techniques pour chaque corps de métier particulier dans sa spécialité, puis le concept de santé voit sa portée s'élargir et concerner plusieurs professions et retourner dans le langage commun avec des définitions de plus en plus étoffées.

Aussi des chercheurs ont tenté de décrire cette évolution, de théoriser les courants de pensée, d'englober l'ensemble des acceptions et de présenter différents **modèles de définitions** de santé, voire une **topographie du concept de santé** (Herzlich 1969, Pierret 1984, Contandriopoulos 2006, McDowell 2017). Ces tentatives, au même titre que celle exposée ici dans la présente thèse, ont toutes en commun de n'être qu'une vue partielle, un instantané du concept de santé.

4. Des usages aux catégories de santé

S'il n'existe pas de définition unique, il est possible de proposer plusieurs catégories de santé qui englobe les usages actuels de ce concept et laisse le champ ouvert à ceux à venir : selon qu'il s'agit d'un individu ou d'un groupe et selon qu'il s'agit de santé concernant l'être humain ou les animaux. Cette catégorisation de la santé en fonction des usages, des cibles de la santé peut également contribuer à poser des notions qui seront développées en partie II de la présente thèse quand il sera question de préciser la santé des mollusques marins.

Chez l'être humain, la santé **individuelle** relève de l'individu, du médecin traitant et d'autres corps professionnels qui sont impliqués spécifiquement dans la santé de cet individu. Elle peut embrasser l'ensemble des dimensions de la santé à l'échelle de l'individu. Celui-ci est même incité à être responsable et acteur de sa santé (Saout 2008) ce qui préfigure une santé **personnalisée**. La santé **collective** prend le nom de **santé publique**. Elle concerne un groupe d'individus et relève d'organisations de santé à différentes échelles (ARS, DGS, Ministère des Solidarités et de la Santé en France et OMS au niveau international).

Chez les animaux, la santé **individuelle** concerne surtout les animaux domestiques de compagnie (chien, chat, NAC, cheval). Elle relève de l'animal, de son "propriétaire", de son entraineur le cas échéant et du vétérinaire praticien. Elle correspond surtout à une santé biologique, mais elle est peut également être mentale et sociale, révélée par les progrès en éthologie animale. La santé **collective** prend le nom de **santé de cheptel** ou **de troupeau** quand elle est considérée au niveau d'une exploitation et relève alors des animaux d'élevage, de leur éleveur et des vétérinaires praticiens et publiques. Elle peut être considérée à une échelle géographique plus importante, prendre le nom de **santé publique vétérinaire** et relever d'organisations de santé animale à différents niveaux (OVS, GDS, OVVT, GTV, DDTM pour la santé des mollusques marins, DDPP pour la santé des autres animaux, DGAL, Ministère de l'Agriculture en France et OIE au niveau international). Cette dernière catégorie est d'intérêt pour appréhender la santé des mollusques marins.

Nous pouvons réfléchir à cette catégorisation selon les usages de la santé.

La dichotomie entre santé humaine et santé animale est discutable. Avec l'existence de zoonoses, le lien entre la santé de l'animal et celle de l'être humain est confirmé, au moins au niveau de la dimension biologique de la santé. Certains agents infectieux peuvent se transmettre de l'homme à l'animal dans le cas de zooanthroponoses ou d'animal à l'homme dans le cas d'anthropozoonoses. Si la santé humaine a fait l'objet d'une définition « officielle » multidimensionnelle, ce n'est pas le cas de la santé animale qui reste souvent entendue comme une absence de maladie (Nicks et Vandenheede 2014). Il est dès lors difficile de se prononcer sur les dimensions psychique/morale, sociale et spirituelle chez l'animal. Il reste au demeurant qu'avec des initiatives telle que *One Health*, une seule santé, santé publique – santé animale – santé environnementale peuvent être associées dans une approche systémique (OIE 2011, Gibbs 2014).

La dichotomie entre santé individuelle et santé collective est également discutable. Avec l'existence de contagion, le lien entre la santé de l'individu et la santé collective est confirmé, au moins dans la dimension biologique de la santé. Sa dimension sociale met également en jeu le rapport des individus à la société, notamment en termes d'adaptation, d'insertion, d'entraide... La santé est une ressource individuelle et collective (Mias 1996).

Cette catégorisation selon les usages est donc artificielle, mais elle est reflète comment les usagers, à la fois acteurs et patients, s'organisent à différentes échelles pour identifier, comprendre, prévenir et gérer ce qui peut modifier ou affecter leur santé.

5. Les déterminants de santé

Les déterminants de la santé peuvent se définir comme l'ensemble des « facteurs personnels, sociaux, économiques et environnementaux qui déterminent l'état de santé des individus ou des populations » (OMS 1999). Ils interagissent et influent sur la santé d'une personne ou d'une population, sans être nécessairement les causes directes d'une atteinte de la santé.

Plusieurs modèles conceptuels de déterminants de la santé ont été proposés (Lalonde 1974, Evans et Stoddart 1990, Dahlgren et Whitehead 1991, Solar et Irwin 2007, OMS CDSS 2009). Ces modèles explicatifs se complètent et abordent souvent les mêmes facteurs, mais les regroupent différemment en catégories. Certains de ces modèles ont aussi fait l'objet de travaux de pondération visant à étudier l'importance relative de différentes catégories de déterminants (Dever 1976, Stronks *et al.* 1996).

Des listes « officielles » de déterminants de la santé ont également été proposées par différentes organisations (OMS, Ministère de la Santé ou Direction de la Santé dans différents pays) dans le cadre de la mise en œuvre de politiques de santé publique.

Comprendre le rôle des déterminants de la santé peut aider à identifier quels facteurs ont des répercussions sur la santé d'un homme ou d'un animal et à proposer des approches de santé individuelle et collective plus adaptée, à privilégier la prévention plutôt que le traitement ou les mesures de police sanitaire.

Maintenant, si comme l'énonce Pichot (2008) « la santé et la maladie forment un complexe », partagent-elles pour autant les mêmes déterminants ?

D'après Contandriopoulos (2006), « les travaux scientifiques récents sur les facteurs qui affectent la santé des populations montrent que les facteurs, les situations, les contextes qui sont porteurs de santé, c'est-à-dire qui accroissent « la possibilité pour le vivant de s'accomplir » (Foucault 1997), mobilisent des mécanismes qui ne sont pas de même nature que ceux qui sont à l'œuvre quand il s'agit de diagnostiquer, de traiter, voire de prévenir des maladies spécifiques (Evans et al. 1996, Drulhe 1997). D'un côté, quand on veut agir sur la santé en tant que capacité à vivre bien et longtemps, les interventions ciblent l'environnement dans lequel interagissent les individus, aussi bien l'environnement physique (milieu de travail, conditions de logement, salubrité, pollution, etc.) que l'environnement économique et social (pauvreté, chômage, isolement, exclusion, etc.), ou encore l'environnement culturel (droit de la personne, éducation, accès à l'information et aux connaissances, etc.). D'un autre côté, quand on veut agir sur la santé en réduisant l'incidence, la durée, l'intensité ou les conséquences des maladies spécifiques dont souffrent les individus, les interventions visent le fonctionnement biologique et psychique des êtres humains et leurs comportements. Il s'agit, dans ce cas, de modifier le cours des différents processus biologiques et psychiques affectés par la maladie.... ».

Les déterminants sont actuellement surtout considérés par les organisations en charge de la santé publique et commencent également à intéresser celles qui s'occupent de la santé de troupeaux et la santé publique vétérinaire. L'approche qui vise à s'appuyer sur les déterminants de la santé et à « adopter une démarche holistique pour la prévention des maladies épidémiques/épizootiques et la préservation de l'intégrité des écosystèmes à travers la reconnaissance des liens entre la santé humaine, celle des animaux domestiques et celle de la faune sauvage » tend à se généraliser (Stephen et Karesh 2014) et peut être considérée comme une voie à encourager pour la santé des mollusques marins.

6. Un équilibre précaire

Changement de paradigme ?

D'une santé où la maladie occupait une place centrale, un déplacement s'est en quelque sorte opéré, replaçant l'être humain comme patient et acteur central de sa santé.

Mais pouvons-nous concevoir autant de santés que d'individus ? Ce sont les usages qui semblent déterminer le périmètre de la santé. Elle apparaît comme une ressource à la fois individuelle et collective. Mais ceux-ci n'ont pas pour autant la maîtrise totale de leur santé. Il existe des déterminants de la santé sur lesquels ils peuvent influer et d'autres qui semblent leur échapper. C'est peut-être le fait que certains de ces déterminants sont d'un accès difficile, qui incite les usagers à étendre à nouveau le périmètre et à considérer une santé englobant santé publique – santé animale – santé environnementale. Il ne s'agit plus alors d'avoir l'homme au centre en tant que principal concerné et bénéficiaire de la santé, mais d'entreprendre une promotion équilibrée de la santé chez les êtres vivants au sens large.

Car il s'agit bien d'équilibre ou plutôt de la **gestion des déséquilibres**.

D'un homme entre ciel et terre en équilibre, déjà suggéré au sixième siècle avant Jésus-Christ par Lao Tseu dans le Dao de jing (cité par Cheng 1983), prenons sciemment un raccourci et allons directement à 1932 pour aborder le terme d'**homéostasie**.

Dans *The Wisdom of the body*, Cannon (1932) énonce: « Les êtres vivants supérieurs constituent un système ouvert présentant de nombreuses relations avec l'environnement. Les modifications de l'environnement déclenchent des réactions dans le système ou l'affectent directement, aboutissant à des perturbations internes du système. De telles perturbations sont normalement maintenues dans des limites étroites parce que des ajustements automatiques, à l'intérieur du système, entrent en action et que de cette façon sont évitées des oscillations amples, les conditions internes étant maintenues à peu près constantes [...]. Les réactions physiologiques coordonnées qui maintiennent la plupart des équilibres dynamiques du corps sont si complexes et si particulières aux organismes vivants qu'il a été suggéré qu'une désignation particulière soit employée pour ces réactions : celle d'homéostasie ».

L'homéostasie désigne donc la capacité d'un système à se maintenir dans un état à peu près constant, dans sa forme et ses conditions internes, en dépit des perturbations externes. Ce terme a été utilisé par la suite dans différents domaines de la biologie, de la sociologie (Wiener 1958) et de façon plus générale dans l'étude des systèmes.

Prenons ensuite un second raccourci assumé et envisageons la santé des êtres vivants sous l'angle de la théorie des systèmes (Von Bertalalanffy 1968). La fonction première d'un système est sa propre conservation.

Or un système qui « fonctionne » est en déséquilibre dans le sens où il ne cesse d'échanger avec son environnement, d'autres systèmes. Plus qu'un état constant, il s'agit d'un déséquilibre dynamique, contrôlé, régulé. A contrario un système dans un état d'équilibre complet pourrait être un système ne réalisant plus de flux d'entrées et de sorties d'énergie, ayant épuisé les possibilités d'échanges, un système fermé assimilable à un système mort.

Le principe de conservation appliqué au système vivant pourrait être invoqué pour expliquer le continuum dynamique déjà mentionné dans le concept de santé. Un système parfaitement régulé aurait la faculté de revenir à son état initial après une perturbation.

Lors d'atteinte de la santé, un être vivant ne revient jamais à l'état précédant l'atteinte, mais évolue vers un état différent qu'il s'efforce d'être aussi proche que possible de l'état initial. Mais la santé est-elle conditionnée par l'homéostasie ?

L'étude des fonctions physiologiques de certains êtres vivants a conduit à proposer le terme de **conformité**. Lors d'une perturbation externe, ceux-ci ne sont pas capables de réguler étroitement certaines fonctions qui sont alors directement dépendantes de la perturbation, du facteur modifié ; ils sont dits conformes pour ce facteur, les fluctuations de ses fonctions suivent celles de ce facteur. Il demeure toutefois des limites biologiques, au-delà desquelles ces êtres vivants ne supportent plus ces fluctuations (limites organiques, preferendum pour des réactions biochimiques, ...), traduisant en quelque sorte leurs aptitudes à s'adapter à leur environnement.

S'agit-il aussi de **résilience**, **de résistance ou de récupération** au sens où l'entendent les écologues ?

La résilience écologique est la capacité d'un système vivant à retrouver les structures et les fonctions de son état de référence après une perturbation. La résistance est la capacité d'un système à rester fondamentalement inchangé lorsqu'il est soumis à une perturbation. Quant à la récupération, elle est la capacité d'un système à retrouver la croissance ou toute autre caractéristique affectée négativement après une perturbation (Holling 1973, Grimm et Wissel 1997). Mais existe-t-il vraiment des systèmes vivants capables de revenir à « un état de référence » après perturbation ?

Avec des initiatives pluridisciplinaires visant à mieux appréhender le concept de santé, il est possible que des idées de prime abord non acceptées dans une discipline, puisse être testées dans une combinaison de disciplines pour être finalement intégrées dans le corpus conceptuel et théorique de la santé.

Il est justement question maintenant, après s'être muni d'un système de références, de resituer la présente thèse.

Comment appréhender ce concept chez les mollusques marins ? Les mollusques marins sont-ils si particuliers qu'il faille envisager des approches différentes de celles employées chez les autres espèces animales ? Dans quelle(s) discipline(s) se positionner, par quelle(s) méthode(s) aborder cette problématique et sur quelles questions scientifiques précises se focaliser ?

1. Le deuil de la totalité et le choix d'une discipline scientifique

Face à un sujet aussi vaste que la santé, est-il approprié de se restreindre dans une « division de sciences » ?

Bernard (1865) a ainsi rapporté : « toutes nos divisions de sciences ne sont pas dans la nature ; elles n'existent que dans notre esprit qui, à raison de son infirmité, est obligé de créer des catégories de corps et de phénomènes afin de mieux les comprendre en étudiant leurs qualités ou propriétés sous des points de vue spéciaux ».

S'il est assez commun en recherche de se limiter à un « point de vue particulier », est-ce adapté pour étudier les différentes dimensions de la santé des mollusques marins ?

Eymard *et al.* (2004) indiquent que « quelle que soit la méthode de recherche utilisée, le chercheur ne peut prétendre saisir la totalité de ce qu'il étudie... Il est nécessaire d'assumer d'avoir à travailler avec un point de vue particulier, qui ne permet de regarder qu'une partie de la réalité. Chaque méthode « invente » son objet de recherche et la traite ensuite comme un tout, alors qu'il ne s'agit que d'un fragment... En somme, il faut au chercheur faire le deuil de la totalité : ce qu'il dira ne sera valable que dans l'enceinte de sa méthode ... et des théories convoquées ».

Dans sa tentative de topographie du concept de santé, Contandriopoulos (2006) explore les dimensions biologiques, sociales et psychiques de l'être humain et les met en regard des disciplines scientifiques qui sont connues pour s'intéresser à la santé de l'homme. Dans la figure 1, chaque dimension de la santé est placée sur un axe et les champs de connaissances pertinents à l'analyse de chaque dimension sont indiqués. Il est à noter que Contandriopulos (2006) n'attribue pas un axe spécifique pour la dimension spirituelle ... mais considère la spiritualité comme un élément de la dimension psychique de l'être humain.

Pouvons-nous considérer les mêmes dimensions de santé chez les mollusques marins ? Malgré cette incertitude, l'exercice transposé aux mollusques marins est proposé dans la figure 2. Chaque dimension supposée de la santé des mollusques marins est placée sur un axe ; les disciplines se focalisant actuellement sur les mollusques marins ou contribuant à des comparaisons avec l'être humain sont indiquées.

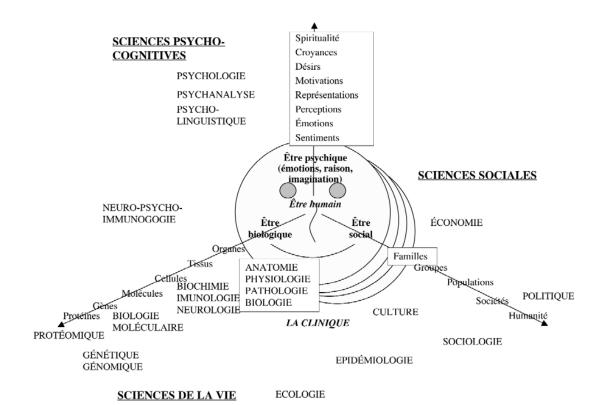


Figure 1. Perspectives disciplinaires et santé chez l'être humain (Contandriopoulos 2006)

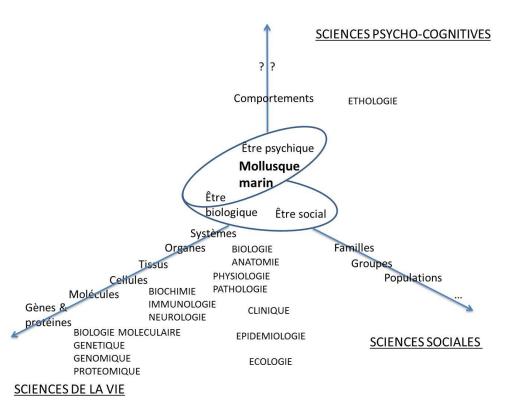
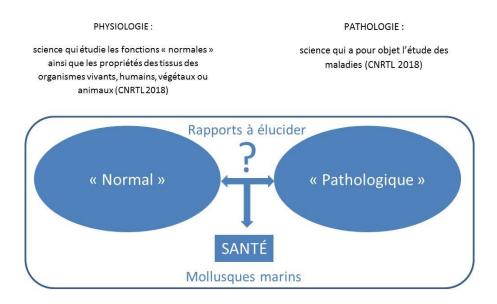


Figure 2. Proposition de perspectives disciplinaires sur le sujet de la santé chez les mollusques marins

Pour certaines disciplines des sciences sociales et des sciences psycho-cognitives, il semble que les mollusques ne constituent pas des modèles appropriés à étudier. Toutefois, cette même incertitude a pu être formulée par le passé dans les sciences du vivant et pourtant peu de champs de connaissances n'ont pas fait l'objet d'études chez les mollusques marins. Ces deux figures ont en commun de mettre les êtres vivants au centre avec leurs différentes dimensions, de présenter la « division de sciences » tout en suggérant les positions et les liens des disciplines entre elles.

Il reste à faire un choix. La santé des mollusques marins, dans le cadre de la présente thèse, doit-elle être la problématique d'une seule discipline? En quoi est-elle d'ailleurs une problématique?

Dans le complexe maladie - santé déjà mentionné, ces deux concepts ne sont pas indépendants et ne sont pas réductibles l'un à l'autre. La maladie n'est pas l'inverse de la santé, comme le souligne Canguilhem dans le Normal et le Pathologique (Canguilhem 1966). Pour considérer aussi les formes positive et négative du concept santé, contribuer à élucider le complexe maladie - santé, pourquoi ne pas essayer de déterminer ce qui relève du « Normal » et le comparer ce qui relève du « Pathologique » ? N'envisager que le « Pathologique » serait dans un sens, se satisfaire de la définition biomédicale de la santé. Dans l'exercice de la présente thèse, nous nous limiterons certes à la seule dimension biologique des mollusques marins, mais en se plaçant dans le champ de la **physiopathologie**, qui est souvent considérée comme la convergence de deux disciplines, la physiologie et de la pathologie (figure 3), un début de pluridisciplinarité.



PHYSIOPATHOLOGIE : Étude des troubles fonctionnels d'un organisme ou d'un système organique et de ses réactions au cours d'une maladie (CNRTL 2018)

AUTRES APPROCHES PLURIDISCIPLINAIRES

Figure 3. Choix de la physiopathologie pour l'étude de la santé biologique des mollusques marins

En n'abordant que la dimension biologique de la santé par la physiopathologie, nous nous garderons bien de généraliser et d'extrapoler aux autres dimensions, d'autres approches pluridisciplinaires sont à promouvoir en parallèle à cette thèse.

2. L'intention du chercheur et le choix de la méthode de recherche en santé

Il n'existe pas de bonnes ou de mauvaises méthodes de recherche. Il peut être utile de prendre un peu de hauteur et d'inventorier les méthodes appliquées dans cette problématique de recherche et de choisir celle qui semble appropriée à la question de recherche que nous énoncerons. Plusieurs auteurs ont proposé une typologie des méthodes de recherche, applicable de façon générale ou pour une discipline donnée. Parmi eux, Eymard *et al.* (2004) ont proposé une liste de méthodes appliquées en recherche sur la santé.

« La méthode expérimentale produit une ou plusieurs explications généralisables des phénomènes par des savoirs objectivés (qui peuvent cependant être remis en cause ultérieurement). Pour ce faire, elle s'appuie sur les résultats du test d'une « hypothèse théorique ». L'hypothèse met en relation de cause à effet une ou plusieurs variables indépendantes et une ou plusieurs variables dépendantes. Cette méthode facilite la mise à jour d'invariants et la généralisation.

La méthode différentielle étudie la variabilité des comportements des sujets vivant le même phénomène. Elle est centrée sur ce qui différencie les sujets en tenant compte de facteurs intrinsèques ou extrinsèques. Elle propose à partir de la recherche de corrélations entre des variables individuelles, de repérer des catégories de fonctionnement des sujets.

La méthode clinique¹ produit des savoirs sur un phénomène à partir du récit des sujets. Le chercheur en méthode clinique s'intéresse à la parole du sujet social qu'il rencontre et écoute dans son expérience de la santé [...]

La méthode de l'ethnos s'intéresse aux groupes sociaux et à leur sentiment d'appartenance à une communauté [...] Le chercheur étudie les codes, les rituels, les procédures, les habitus d'un groupe social identifié considéré comme une tribu par rapport à un phénomène étudié, [par exemple face à un handicap ou une maladie ...]

En **méthode historique**, le chercheur souhaite comprendre et expliquer certains faits ou phénomènes à partir de leurs traces historiques. Il définit une ou plusieurs périodes de l'histoire qui constituent le contexte historique de l'observation du fait ou du phénomène étudié [...]

Chaque méthode de recherche possède à la fois de l'intérêt et des limites pour son objet d'étude. C'est l'intention du chercheur, qui oriente le choix de la méthode ».

ethnologique. La recherche clinique n'est pas en soi une méthode.

¹ Il est essentiel de différencier méthode clinique de recherche clinique. La recherche clinique est l'ensemble des recherches qui se réalisent « au pied du lit », au chevet ou au près du malade, du bénéficiaire ou du demandeur de soins. Ces recherches ont recours à différentes méthodes de recherche : méthodes expérimentales, méthode clinique, méthode différentielle, ainsi que les méthodes ethnographique ou

En abordant la seule dimension biologique de la santé des mollusques marins, par la physiopathologie, nous proposons ici de choisir intentionnellement la **méthode expérimentale**, car elle semble appropriée à la question scientifique ciblée dans ce travail de thèse ; il s'agit bien d'un choix assumé en connaissance des intérêts et limites de cette méthode.

3. Objectiver la santé biologique et énoncer la question de recherche

Comment étudier le « normal » et le « pathologique » chez les mollusques marins et générer un « savoir objectivé » par la méthode expérimentale ? Un mollusque marin peut être décrit fonctionnellement en physiopathologie par le suivi de descripteurs, d'indicateurs, de biomarqueurs qui seront observés ou mesurés dans le cadre d'un dispositif de terrain ou d'un dispositif expérimental en conditions de laboratoire.

3.1. Le suivi de biomarqueurs de santé

Parmi ces différents mots aux significations proches, nous utiliserons le terme de **biomarqueur** tel que défini par Atkins *et al.* (2001): « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ».

Dès lors déterminer ce qui relève du « normal » est peut-être établir les valeurs d'un biomarqueur dans cette première condition ; déterminer ce qui relève du « pathologique » est peut-être décrire les fluctuations d'un biomarqueur dans cette seconde condition.

L'identification de biomarqueurs devient alors un enjeu et les approches pour y parvenir sont nombreuses. Ainsi, Delpech (2011) inventorie plusieurs étapes historiques d'identification de biomarqueurs, témoignant de l'étendue de leurs champs d'application et des évolutions technologiques permettant de les caractériser. Des premiers biomarqueurs proposés en s'appuyant sur les connaissances en physiopathologie, d'autres ont été mis au jour par l'acquisition de connaissances en génétique par analyse de génome entier, développement de puces à ADN, étude d'association entre une maladie et des marqueurs appelés Single Nucleotide Polymorphism (SNP) et des approches visant à repérer les séquences régulatrices responsables de variations de l'expression des gènes. L'ensemble de ces approches évolue vers l'acquisition de données à haut débit. « On peut espérer que des biomarqueurs présentant un intérêt [...] seront bientôt découverts » mais « le problème devient bioinformatique compte tenu de la masse gigantesque d'informations à traiter » (Delpech 2011). Mais au-delà des différences entre disciplines, entre dispositifs expérimentaux, l'enjeu réel est bien l'identification de biomarqueurs d'intérêt, dont les variations objectivables, mesurées ou observées traduisent effectivement des changements de santé chez les mollusques marins. Le choix de biomarqueurs dans le cadre de la présente thèse est exposé et justifié en partie III.

3.2. De la normalité à la théorie des valeurs de référence

Chez l'être humain et de nombreux animaux, des valeurs « normales » de biomarqueurs ont été proposées ; celles-ci ont été déterminées en réalisant des mesures ou des observations chez des échantillons de populations réputées en « bonne santé », la sélection rigoureuse de ces populations et échantillons constituant un enjeu majeur. Cette démarche a longtemps reposé sur le préconçu qu'un être vivant est en « bonne santé » quand il est dans la « norme », ou exprimé autrement, que ses valeurs de biomarqueur s'inscrivent dans la distribution de valeurs du biomarqueur obtenues chez une population en « bonne santé », distribution qui pourrait prendre la forme d'une loi normale.

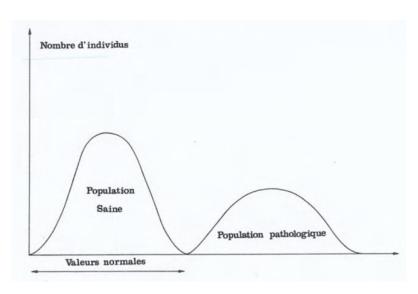


Figure 4. Distributions supposées des valeurs d'un biomarqueur chez une population «en bonne santé » et chez une population « en mauvaise santé » (d'après Siest *et al.* 1981)

Est aussi sous-jacente l'idée que des êtres vivants sont en « bonne santé » quand ils sont capables de maintenir leurs variables biologiques dans une frange de valeurs, un intervalle où leur fonctionnement tend vers l'optimal. En dehors de cet intervalle, il serait possible d'être en « mauvaise santé ». Le lien entre homéostasie et santé est donc relevé chez l'être humain et certains animaux. Mais qu'en est-il chez des animaux considérés comme conformes pour certaines de leurs fonctions physiologiques ? Existe-t-il une seule distribution chez les populations « en bonne santé » et une seule distribution chez les populations en « mauvaise santé » ou « en réalité un recouvrement des distributions des sujets sains et des distributions des sujets malades » (Siest et al. 1981) ?

Dans the theory of reference values: an unfinished symphony, Siest et al. (2013) exposent les différentes étapes qui ont conduit à faire évoluer la terminologie des valeurs « normales » ou usuelles, parfois nommées constantes médicales, pour préférer celles de valeurs de référence et d'intervalles de référence, introduites pour la première fois en 1969 (Gräsbeck et Saris 1969). Y sont également présentées les implications des différentes organisations nationales et internationales représentatives des laboratoires d'analyses et des cliniciens, qui ont contribué à standardiser les approches pour la détermination d'intervalles de référence, leur validation et le cas échéant leur transfert à d'autres structures.

Ces informations sont regroupées sous forme de recommandations dans deux principaux documents, l'un dédié à l'être humain, régulièrement mis à jour (CLSI 2008), l'autre aux animaux (ASVCP-QALS 2011). Dans l'importante littérature scientifique qui a trait aux valeurs et intervalles de référence, il convient de citer deux publications qui ont servi de base de réflexion à la présente thèse : une revue sur le sujet des valeurs de référence (Geffré et al. 2009) et un recueil de recommandations sur la détermination de novo d'intervalles de référence chez les animaux (Friedrichs et al. 2012).

Pour appliquer cette théorie à la santé des mollusques marins, il convient de préciser les termes qui lui sont associés (figure 5).

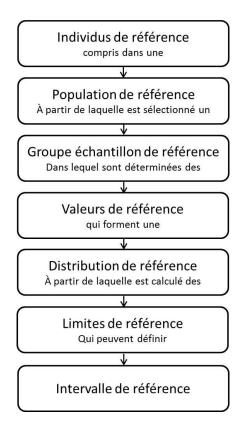


Figure 5. Relations entre les termes liés aux valeurs de référence (d'après CLSI 2008)

Les **individus** de **référence** sont les individus « en bonne santé » pouvant être sélectionnés pour une étude de détermination d'intervalle de référence. Le concept de santé étant relatif, c'est par l'application de critères d'inclusion et d'exclusion bien définis, que l'expérimentateur s'assure de l'emploi d'individus présumés en « bonne santé ».

L'ensemble des individus de référence constitue la **population de référence**.

Un groupe échantillon de référence est sélectionné parmi la population de référence. La taille de l'échantillon doit permettre l'application des tests statistiques.

La valeur de référence (RV) est la valeur mesurée ou observée d'un paramètre d'intérêt, par exemple un biomarqueur, chez un individu de référence. L'ensemble des RV constitue la distribution de référence.

Les **limites de référence** sont des valeurs issues de l'analyse statistique de la distribution de référence et constituent les bornes de l'intervalle de référence. Une valeur de référence qui représente une valeur déterminée chez un individu de référence, n'est pas synonyme à une limite de référence, qui est une valeur dérivant de tous les résultats obtenus dans le groupe échantillon de référence.

L'intervalle de référence (RI) contient seulement une fraction des valeurs mesurées chez les individus de référence, la fraction centrale correspondant généralement à 95% des valeurs de la distribution comprise entre les fractiles 0,025 et 0,975 (Solberg 1987). Puisque l'étude s'appuie sur l'utilisation d'individus réputés « en bonne santé », 5% des individus en « bonne santé » ont des valeurs mesurées ou observées en dehors des limites de référence. En d'autres termes, il est tout à fait possible d'obtenir des valeurs en dehors de l'intervalle de référence chez des individus « en bonne santé », mais cela doit être peu fréquent.

Comme les références limites sont déterminées sur un échantillon de la population, il ne s'agit pas de vraies limites, mais de limites estimées. L'intervalle de confiance d'une limite de référence (CI) indique l'imprécision de cette estimation sur la limite considérée (figure 6). Cette estimation dépend de la taille de l'échantillon.

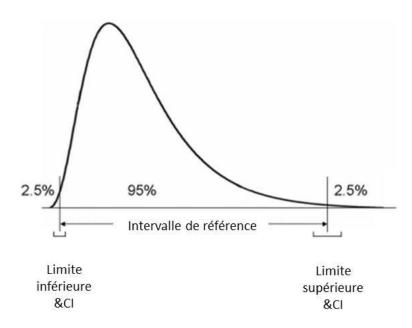


Figure 6. Représentation schématique d'une distribution de référence, d'un intervalle de référence, des limites de références et des intervalles de confiances (CI) des limites (d'après Geffré et al. 2009)

Déterminer des valeurs, distribution, limites et intervalle de référence est une première étape. Il est important de souligner qu'il s'agit d'informations descriptives d'un biomarqueur de santé dans une population de référence présumée saine. En particulier, les limites de référence ne sont pas des limites qui peuvent être transposées d'emblée dans une autre population à statut indéterminé et permettre de trancher entre « bonne » et « mauvaise santé » chez les individus de cette nouvelle population et adopter directement une décision médicale.

Dans une seconde étape, ces données descriptives peuvent être employées, principalement dans deux types d'approches (Siest *et al.* 1981) :

- la comparaison de RV entre elles (comparaison de valeurs obtenues chez des populations saines mais différentes pour d'autres caractéristiques, étude des variations d'intervalles de référence sur une population étudiée sur le long terme, transfert d'intervalles de référence entre laboratoires d'analyses, choix des examens en classant les examens selon leur pouvoir discriminant, comparaison des méthodes et appareils et définition de la variabilité analytique permise, utilisation pour l'étude d'effets de médicament...),
- la comparaison d'une valeur observée² à des RV (chez un individu supposé sain : dépistage d'une affection non décelable cliniquement, classification dans un groupe à risques, probabilité d'apparition d'une maladie, exploration dynamique, comparaison de bilans successifs à intervalles réguliers ; chez un individu reconnu malade par une autre approche (diagnostic de laboratoire ou examen clinique par exemple) : surveillance de l'évolution d'une maladie, suivi des effets d'un traitement...).

Nous n'avons jusqu'à présent considéré qu'un biomarqueur isolément. Mais pour appréhender la santé, le raisonnement peut être réalisé sur plusieurs d'entre eux. La santé est un tout global et la variation d'un biomarqueur isolé ne peut pas être interprétée séparément.

3.3. De l'hypothèse théorique à la question de recherche

Théorie, concepts et termes ont été présentés, le cadre est posé.

L' « hypothèse théorique » à tester devient :

La santé biologique des mollusques marins peut être décrite par le suivi de biomarqueurs de santé et l'application de la théorie des valeurs de référence.

Parmi les mollusques marins, l'huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) constitue un modèle de choix. La production mondiale de *C. gigas* est estimée à 573 617 tonnes en 2016 (FAO 1950-2016). Les jeunes huîtres creuses, appelées naissains, proviennent soit du captage de naissains sauvages, soit sont produites dans des écloseries. Leurs caractéristiques génétiques peuvent différer. Le naissain dans la nature est diploïde et résulte de la fécondation externe entre parents au pédigrée inconnu.

_

² En complément d'une étude de détermination d'intervalles de référence, il est possible de réaliser d'autres études s'appuyant d'autres individus, soumis à des conditions similaires ou différentes et de comparer les valeurs obtenues de biomarqueur, appelées **valeurs observées** par rapport aux intervalles de référence déterminés dans la première étude.

Les naissains dans une écloserie peuvent être de ploïdies différentes (Guo *et al.* 1996, Piferrer *et al.* 2009, Benabdelmouna et Ledu 2015) et résultent du croisement de géniteurs qu'il est possible de sélectionner pour des caractères phénotypiques spécifiques, en particulier en termes de résistance accrue à des maladies (Dégremont 2015a).

Parmi les organismes pathogènes reconnus comme ayant un impact sur la santé de l'huître creuse, la bactérie Vibrio aestuarianus (Nicolas et al. 2002, Garnier et al. 2008) et le virus OsHV-1 (ostreid herpesvirus type 1) (Le Deuff et Renault 1999, Davison et al. 2005) font l'objet de recherches à la station Ifremer de La Tremblade, au Laboratoire de Génétique de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM) (Renault 2007, Travers 2018). La production de familles diploïdes, triploïdes et tétraploïdes d'huîtres creuses avec différents niveaux de sélection peut être réalisée sur le même site à la Plateforme des Mollusques Marins de La Tremblade (PMMLT). Quand il est question de réaliser des suivis de biomarqueurs, il est important de considérer les facteurs de variation pré-analytiques, analytiques et biologiques susceptibles d'interférer avec les variations du biomarqueur caractéristiques du phénomène à caractériser (Solberg 1988). Pour limiter les facteurs de variations biologiques non désirés, il est possible de choisir de produire les huîtres creuses aux caractéristiques génétiques connues, dans une écloserie avec un parcours zootechnique contrôlé et identique, dans un milieu protégé des infections à OsHV-1 et V. aestuarianus. Les démarches visant à réduire l'ensemble des facteurs de variations non désirés sont exposées dans la partie III de la présente thèse.

Considérant ces éléments, la question de recherche de la thèse est la suivante :

Après avoir choisi des biomarqueurs d'intérêt sur la santé biologique chez l'huître creuse (premier enjeu), constituer des populations d'huîtres creuses supposées saines (deuxième enjeu), est-il possible dans une première étude de déterminer des intervalles de référence de ces biomarqueurs dans un groupe échantillon de référence (troisième enjeu), puis de vérifier qu'ils apportent des éléments d'information permettant d'émettre des hypothèses sur la santé, en réalisant des études complémentaires de comparaison avec les valeurs observées de biomarqueurs chez des huîtres creuses infectées expérimentalement par OsHV-1 d'une part, par *Vibrio aestuarianus* d'autre part (quatrième enjeu) ?

1. Premier enjeu : choix de biomarqueurs de santé et de méthodes d'acquisition de leurs variations biologiques chez *C. gigas*

D'après le pôle Interministériel de Prospective et d'Anticipation des Mutations Economiques, « la découverte de biomarqueurs demande la coordination et l'intégration de disciplines et de technologies, qui de fait, sont présentes dans les laboratoires de recherche publics. Les développements technologiques nécessaires requièrent de plus en plus de la multidisciplinarité, des masses critiques et la capacité pour la recherche publique à travailler en projet et en partenariat public/privé » (PIPAME 2009).

Les biomarqueurs, tels que définis précédemment (partie II § 3.1, Atkins *et al.* 2001) sont utilisés dans de nombreux champs d'activités en lien avec la santé (PIPAME 2009, AFSSAPS 2011)³.

Ils sont utilisés en recherche et développement par exemple dans l'étude des maladies depuis les mécanismes biologiques jusqu'à l'expression clinique chez les individus affectés, dans la découverte et les développements précliniques et cliniques de nouveaux traitements médicamenteux.

Ils sont employés également en routine en biologie et pratique médicale, par exemple dans le cadre de la prévention pour identifier un danger et calculer un risque ou une prédisposition à une maladie, pour diagnostiquer une maladie dans une population, ou bien encore pour suivre l'évolution d'une maladie et adapter sa prise en charge thérapeutique.

1.1. Classification des biomarqueurs de santé

Les biomarqueurs de santé ont fait l'objet de plusieurs propositions de classification. Romanetto (2011) les considère ainsi selon :

- la nature de la variable mesurée (quantitative, semi-quantitative, qualitative),
- la nature du biomarqueur et la technique ayant permis son identification (tableau I),
- la fonction du biomarqueur (tableau II).

Dans le cas particulier de la recherche et du développement pharmaceutique, en particulier dans la phase de développement clinique accompagnée d'essais cliniques, des biomarqueurs sont également employés et classés en plusieurs catégories selon différents statuts réglementaires (figure 7).

³ Il est intéressant de noter que les écotoxicologues utilisent également des biomarqueurs, mais les définissent autrement et en ont d'autres applications, essentiellement dans la surveillance de l'environnement. Sur ce sujet : Maurice (1996) et Garric *et al.* (2010) exposent ces différentes utilisations en milieux dulçaquicole et marin ; NRC (1987), De Lafontaine *et al.* (2000) proposent des définitions et des classifications de biomarqueurs.

<u>Tableau I. Natures et techniques d'identification de biomarqueurs</u> (adapté de Scaros et Fisler 2005, Delpech 2011, Romanetto 2011)

Biomarqueurs	Techniques à bas débit	à moyen débit	à haut débit
Anatomopathologiques,	Examen physique, Microscopie	IRM	
physiopathologiques	optique et électronique, Imagerie	Dispositif d'exploration	
	médicale (radiographie,	fonctionnelle (banc de	
	échographie, scanner, IRM)	physiopathologie)	
Génomiques	Séquençage	Spectrométrie de masse	PCR, NGS
Transcriptomiques	RT PCR, Nothern Blot	SAGE	Puce à ADN
Protéomiques		Spectrométrie de masse,	Puce à protéines
		ELISA	Puce à anticorps
Métabolomiques	RMN, spectrométrie de masse,	RMN, spectrométrie de	
	chromatographie en phase gazeuse	masse, chromatographie	
		en phase gazeuse	

IRM imagerie par résonance nucléaire, NGS séquençage de nouvelle génération, PCR réaction en chaîne par polymérase, RMN résonance magnétique nucléaire, RT PCR transcription inverse en chaîne par polymérase, SAGE analyse en série de l'expression des gènes

Tableau II. Fonctions des biomarqueurs (d'après EMA 2010)

Biomarqueurs	Fonctions		
Physiopathologiques	Approfondir la connaissance des mécanismes physiopathologiques chez des		
	individus atteints d'une maladie		
Diagnostiques	Diagnostiquer les individus atteints d'une maladie		
Pronostiques	Déterminer l'évolution prévisible de la maladie et le niveau de risque associé pour		
	l'individu considéré		
Prédictifs	Différencier les patients qui sont plus ou moins à même de répondre à un		
	traitement, déterminer le traitement le plus à même de leur bénéficier.		

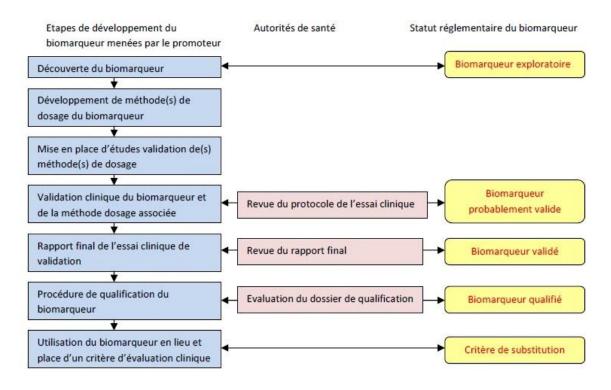


Figure 7. Statuts réglementaires d'un biomarqueur de santé employé lors d'essai clinique (Romanetto 2011 adapté de Marrer et Dieterle 2007)

Un critère d'évaluation clinique « Clinical endpoint » est une caractéristique ou variable qui reflète l'état du patient, « comment le patient se sent, son fonctionnement physiologique ou combien de temps un patient survit». Un critère de substitution « Surrogate endpoint » est une catégorie de marqueurs destinés à se substituer à un critère d'évaluation clinique devant permettre de déterminer le bénéfice clinique ou le risque à partir de données épidémiologiques, thérapeutiques ou physiopathologiques (Atkins *et al.* 2001, De Gruttola *et al.* 2001).

Certains biomarqueurs peuvent être de « simples » biomarqueurs exploratoires, là ou d'autres peuvent être des « critères de substitution ». La principale différence entre un « simple » biomarqueur exploratoire et un biomarqueur « critère de substitution » étant son niveau de validation (Marrer et Dieterle 2007).

Un biomarqueur ne correspond pas nécessairement à une caractéristique unique mesurée sur un échantillon prélevé, mais peut inclure plusieurs caractéristiques physiologiques mesurées directement sur l'animal vivant. Ces caractéristiques peuvent être de nature chimique (ADN, protéines ...), mais aussi physique (fréquence respiratoire, pression artérielle, volume d'organes ...) et aussi correspondre à un ensemble de caractéristiques physiologiques de natures différentes mesurées simultanément. Lorsqu'une technique d'acquisition de biomarqueurs mesure un ensemble de caractéristiques en parallèle, cette technique est dite multiplexe et permet d'établir un motif de biomarqueurs ou « Biomarker pattern » (Gillete et al. 2005, figure 2 de Aleksandrova et al. 2014).

1.2. Développement d'un biomarqueur de santé

Il est important de comprendre que ce n'est pas le biomarqueur seul qui fait l'objet de ce processus, mais que ce sont le biomarqueur et sa technique d'acquisition associée qui sont concernés. Certains auteurs ont exposé les différentes approches déjà employées et ont proposé celles qui pourront être envisagées à l'avenir pour le développement de biomarqueurs (Scaros et Fisler 2005, Delpech 2011).

Selon les applications, le chemin qui conduit au développement d'un biomarqueur d'intérêt opérationnel [« biomarker workflow » ou « biomarker pipeline » en anglais] peut être différent.

Le développement d'un biomarqueur de santé comprend au moins trois étapes :

l'identification de biomarqueurs candidats, résultant d'une recherche bibliographique, d'étude d'échantillons stockés dans des biobanques et de premières expérimentations « exploratoires » s'appuyant sur les techniques d'identification précitées (tableau I). L'identification repose sur l'étude de corrélations statistiques entre la présence ou les variations d'expression du biomarqueur et le résultat clinique observé chez des sujets sains et des individus à différents stades d'une maladie,

- la **sélection** (ou **priorisation**) d'un faible nombre ou d'un seul biomarqueur d'intérêt, à l'aide d'expérimentations visant à vérifier l'association, soulevée lors de l'identification, entre les variations du biomarqueur et un état de santé donné. La technique d'acquisition employée peut être la même, une évolution ou une technique différente de celle qui a permis l'identification du biomarqueur,
- la validation qui concerne à la fois le biomarqueur et sa technique d'acquisition. Pour valider les performances de la méthode utilisée (validation technique), il est nécessaire de déterminer des qualités intrinsèques de cette technique (exactitude, précision, linéarité, sensibilité, spécificité, limite de détection...) dont l'importance est différente selon la nature quantitative, semi-quantitative ou qualitative du biomarqueur (Cummings et al. 2008). Pour valider ensuite le biomarqueur et sa méthode de dosage dans un contexte opérationnel, plusieurs phases peuvent être réalisées avec des expérimentations devant aboutir à la démonstration de la pertinence clinique du biomarqueur (première étude d'essai ou pilote « training ou pilot set » aboutissant à une preuve de concept, seconde étude plus large d'évaluation « test set », étude multicentrique et multi-ethnique si les résultats sont favorables « validation test », étude sur des groupes de sujets indépendants de ceux qui ont été utilisés dans les étapes précédentes (PIPAME 2009, Romanetto 2011).

Ces étapes peuvent être complétées par deux phases qui sont surtout décrites dans le domaine du développement de médicaments (figure 7) :

- la qualification est en quelque sorte une « validation réglementaire » de l'emploi d'un biomarqueur pour des études sur le développement de médicament. Elle s'effectue en deux phases : une première de consultation et d'accompagnement avec des avis scientifiques, durant laquelle l'instigateur de la demande et les autorités de santé s'accordent sur la nature des données et la taille de l'effet à obtenir pour permettre la qualification du biomarqueur ; la seconde phase correspond à la qualification proprement dite. Dans certains cas, la qualification peut concerner un biomarqueur compagnon qui est spécifique d'un médicament et dont l'utilisation dans des essais est mentionnée dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du médicament (Romanetto 2011, Lavezzari et Womack 2016).
- la substitution est une autre « validation réglementaire » pour le cas particulier de l'emploi d'un biomarqueur en remplacement d'un critère d'évaluation clinique (Romanetto 2011).
 - 1.3. Appliquer une stratégie pour le choix de biomarqueurs de santé et de méthodes d'acquisition chez *C. gigas*

La recherche exploratoire de biomarqueurs repose sur un grand nombre d'informations stockées dans les différentes banques de données scientifiques. « Le problème devient bioinformatique compte tenu de la masse gigantesque d'informations à traiter » (Delpech 2011). Ne pas adopter initialement de stratégie liant la recherche exploratoire de biomarqueurs à leurs applications envisagées, conduit à produire des données nombreuses qui nécessiteront des capacités de stockage et des outils de tri et de post-traitement importants. Dans le cadre de la présente thèse, la stratégie adoptée a été la suivante (tableau III) :

Tableau III. Stratégie et choix de couple biomarqueur / méthode d'acquisition

Cadre d'utilisation	Objectiver la santé biologique de <i>C. gigas</i> par le suivi de biomarqueurs d'intérêt	
Fonctions envisagées	Prioritairement : biomarqueurs physiopathologiques exploratoires	
Possiblement : biomarqueurs diagnostiques, biomarqueurs pronostiques		
Etapes visées de	e Prioritairement : identification et priorisation	
développement Possiblement : validation		

Nom du biomarqueur	Filtration (Clearance rate)	Consommation d'oxygène	Masse de chair sèche	Température	Echelle clinique
·		(Oxygen consumption rate)		corporelle	•
	Temps d'activité de filtration	Temps d'activité respiratoire			
	(Feeding Time Activity)	(Respiratory Time activity)			
Nature des variables	Quantitatives	Quantitatives	Quantitative	Quantitative	Semi-qualitative
biologiques					
Caractéristiques	Fonction alimentaire	Fonction respiratoire	Plusieurs fonctions,	Plusieurs fonctions,	Plusieurs fonctions,
physiologiques étudiées			état général de santé	état général de santé	motricité et sensibilité
					du manteau, motricité
					du muscle adducteur
Techniques	Dispositif expérimental	Dispositif expérimental	Imagerie par	Imagerie par	Examen physique
d'acquisition	spécifique	spécifique	Résonance	Résonance	
			Magnétique	Magnétique	
Débit d'acquisition	Moyen à haut	Moyen à haut	Moyen à haut	Moyen	Bas
Détermination des	Calculés à partir de mesures	Calculés à partir de mesures	Calculés à partir de	Calculés à partir de	Calculés à partir
valeurs biologiques	« <i>in vivo</i> » sur l'eau de mer	« <i>in vivo</i> » sur l'eau de mer	mesures in vivo sur	mesures <i>in vivo</i> sur	d'observations in vivo
	d'enceintes expérimentales	d'enceintes expérimentales	des huîtres <i>C. gigas</i>	des huîtres <i>C. gigas</i>	sur des huîtres <i>C. gigas</i>
	contenant chacune une huître	contenant chacune une huître	disposées dans des	disposées dans des	disposées dans des
	C. gigas et une enceinte sans	C. gigas et une enceinte sans	enceintes individuelles	enceintes individuelles	enceintes individuelles
	huître	huître			
Antécédents	Utilisés dans des études	Utilisés dans des études	Utilisé dans des	Non décrit	Non décrit
expérimentaux du	d'écophysiologie	d'écophysiologie	études en physiologie		
couple biomarqueur /			de la reproduction		
technique d'acquisition					
chez <i>C. gigas</i>					
Détermination	Oui	Oui	Non	Non	Non
d'intervalles de					
référence					

2. S'appuyer sur l'existant avec des biomarqueurs mesurables connus, qui seront employés pour la détermination d'intervalles de référence

Parmi les fonctions physiologiques les plus étudiées chez *C. gigas*, l'alimentation et la respiration ont été explorées à l'aide de différents dispositifs expérimentaux permettant de suivre des biomarqueurs, révélateurs du fonctionnement de ces deux fonctions chez des huîtres creuses vivantes en conditions de laboratoire (par exemple : Bougrier *et al.* 1998, Haure *et al.* 2003,) ou directement sur le terrain (Hansel *et al.* 2011). S'appuyant sur les résultats de ces recherches, des modèles "Dynamic energetic budget" (DEB) ont également été proposés pour décrire la croissance de *C. gigas* en réponse à des conditions environnementales variables (Ren *et al.* 2000, Barillé *et al.* 2011). Parmi les biomarqueurs identifiés comme d'intérêt dans les études en écophysiologie, certains peuvent être soumis à la stratégie exposée en partie III § 1.3.

2.1. Biomarqueurs de la prise alimentaire

Les mollusques bivalves marins sont des animaux suspensivores capables de s'alimenter à partir de cellules phytoplanctoniques, de ciliés et flagellés (Le Gall *et al.* 1997, Dupuy *et al.* 1999) et de débris de macroalgues (Levinton *et al.* 2002). Le processus de prise alimentaire se décompose en différentes phases : interception de particules, transport, sélection, et ingestion. Les particules sont triées avant ingestion selon leur taille et leur nature au niveau des branchies (Ward *et al.* 1994, 1998, Silverman *et al.* 1999, Cognie *et al.* 2003) et au niveau des palpes labiaux (Newell et Jordan 1983, Beninger *et al.* 1995, Newell et Langdon 1996, Cognie 2001), des pseudo-fèces non ingérés sont évacués à la surface du manteau (Beninger et Veniot 1999, Beninger *et al.* 1999). Pour un aperçu d'ensemble du processus de prise alimentaire, outre les travaux des auteurs déjà cités dans le présent paragraphe, les thèses universitaires de Cannuel (2005), Guéguen (2009) et Semba Prasetiya (2015) sont aussi des sources d'informations.

L'efficacité de ce processus peut être estimée par un taux reflétant l'activité de filtration, le clearance rate (CR) qui a fait l'objet de nombreuses définitions (Coughlan 1969, Bayne et al. 1977, 1987, Widdows et al. 1981, Macdonald et Ward 1994, Bougrier et al. 1995, Bacon et al. 1998, Riisgård 2001, Bayne 2004, Petersen et al. 2004, Filgueira et al. 2006). L'un d'elle définit le CR comme le volume d'eau filtré à 100% débarrassé de toutes les particules retenues efficacement par unité de temps. Dans un banc expérimental tel que décrit en partie II § 2.3, la fluorescence des particules en suspension dans l'eau de mer peut être mesurée et le CR peut être calculé de la façon suivante (Haure et al. 2003).

Clearance rate

$CR(I.h^{-1}) = D \times [(I-O)/I]$

où D représente le débit entrant (l.h⁻¹) dans la chambre de mesure contenant l'huître ; I est la fluorescence mesurée au niveau de la chambre témoin ne contenant pas d'huître ; O est la fluorescence mesurée au niveau de la chambre de mesure contenant l'huître. Le CR peut également être exprimé par rapport à la masse de chair sèche (DW) de l'huître (l.h⁻¹.g⁻¹DW) ; à la fin de l'expérimentation, l'huître est décoquillée et sa chair est lyophilisée pendant 48 heures puis pesée.

Le CR est calculé chez une huître en activité de filtration. Bougrier *et al.* (1998) et Haure *et al.* (2003) ont proposé un paramètre associé au CR, la feeding time activity (FTA) pour estimer le temps durant lequel l'huître filtre effectivement (CR>0), par rapport à la durée totale de l'expérimentation.

Feeding Time activity FTA (%) = $\sum_{1}^{n} t/T$

où t1, t2 .. tn sont les durées des périodes d'activité de filtration de l'huître ; T la durée totale d'enregistrement de l'activité de filtration.

Les facteurs de variations biologiques du CR, d'origines endogène ou exogène, sont résumés dans le tableau IV. Les facteurs de variations pré-analytiques et analytiques du CR sont exposés dans la partie III § 2.3.

Tableau IV. Facteurs de variations biologiques du CR chez C. gigas

Origine	Facteurs	Effets sur le CR		
Endogène	Taille	Le CR augmente avec la taille (plutôt la surface des branchies)		
		jusqu'à une certaine taille.		
	Masse	Le CR et la masse sont liées par une relation de la forme CR=aDW ^b .		
	Patrimoine génétique	Le CR différerait chez des animaux sélectionnés ou non.		
	Maturité sexuelle	A maturité sexuelle atteinte, le CR est plus faible chez d		
		individus matures que chez des individus immatures.		
	Activité valvaire	Le degré et le rythme d'ouverture des valves expliqueraient en		
		partie les variations de CR chez certaines espèces de bivalves.		
		A confirmer chez <i>C. gigas.</i>		
Exogène	Particules en suspension	Le CR diffère selon la nature, la concentration et la taille des		
		particules en suspension.		
	Température	Le CR varie dans des conditions de température différentes sans		
		qu'il y ait de régulation biologique de la filtration en fonction de		
		la température certaines espèces de bivalves. Chez C. gigas la		
		température a un impact sur le CR maximal.		
	Salinité	Le CR varie dans des conditions de salinités différentes chez		
		certaines espèces de bivalves. A confirmer chez <i>C. gigas.</i>		
	Vitesse et régularité du	Une vitesse de courant modérée et des conditions de flux		
	courant	laminaires favorisent le CR, alors que des vitesses élevées et des		
		conditions turbulentes inhibent le CR.		
	Polluants chimiques	Métaux, hydrocarbures polycycliques aromatiques, biocides		
		chimiques, microplastiques altèrent le CR.		
	Toxines et exsudats de	Toxines et exsudats de microalgues altèrent le CR avec des effets		
	microalgues	qui peuvent évoluer selon les facultés de dépuration de l'espèce		
		de mollusque considérée. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .		
	Organismes pathogènes	L'activité d'alimentation est parfois réduite lors d'infestation par		
		certains parasites chez certaines espèces de bivalves mais		
		seulement chez les individus les plus fortement affectés. Chez C.		
		gigas, le CR est considéré comme un bon bioindicateur d'une		
		infection sévère à une bactérie <i>Chlamydia</i> -like.		

Taille et masse des bivalves

Chez les individus de grande taille, les branchies présentent une grande surface pour capter les particules en suspension et le volume d'eau traité peut être plus important. Certains auteurs ont mis en évidence que le CR augmente avec la surface des branchies chez Clinocardium nuttallii, Macoma nasuta, Mytilus californianus et Chlamys hastata (Meyhöfer 1985); toutefois d'autres auteurs ont révélé que le CR n'augmenterait pas de la même manière chez des grands individus chez Mytilus edulis (Winter 1973). Une hypothèse pour expliquer cette observation est que chez des animaux de grande taille et/ou plus lourds, la taille des branchies est plus faible relativement à celles des autres organes et l'activité des cils des branchies diminuerait avec l'âge chez M. edulis, Cerastoderma edule et Venerupis pullastra (Foster-Smith 1975). Pour tenir compte de ces facteurs de variation et pouvoir comparer l'activité de filtration entre mollusques de même espèce, une approche possible est d'exprimer le CR par une équation de la forme CR = a*DWb où DW est la masse de chair sèche (g), a une constante représentant la pente de la courbe, b un exposant traduisant l'allométrie pour le biomarqueur considéré de l'espèce considérée : chez C. gigas(Gerdes 1983, Bougrier et al. 1995, Ren et al. 2000), chez Ostrea edulis (Haure et al. 1998), chez Perna canaliculus (James et al. 2001), chez plusieurs espèces de mollusques marins (Cranford et al. 2011). Cette approche est envisagée dans la partie IV de la présente thèse.

Patrimoine génétique des bivalves

Plusieurs essais visant à étudier l'effet de croisements sur différents paramètres physiologiques, dont le CR, ont été réalisés chez *C. gigas* (Bayne *et al.* 1999), des larves de *C. gigas* (Pace *et al.* 2006) et des naissains de *C. gigas* (Tamayo *et al.* 2014). Des valeurs de CR différentes sont observées selon les familles produites, mais il est difficile de conclure sur l'effet de ces croisements sur les variations du CR.

Maturité sexuelle des bivalves

Chez des individus matures sexuellement, le CR calculé pourrait être plus faible comparativement à celui d'animaux n'ayant pas encore atteint ce niveau de développement, en raison de l'allocation plus importante d'énergie pour le développement des gonades et des gamètes, au détriment d'autres fonctions physiologiques chez *Mytilus galloprovincialis* (Denis *et al.* 1999) et chez *C. gigas* (Soletchnik *et al.* 1997, Bayne *et al.* 1999).

Activité valvaire des bivalves

Les mouvements des valves et pour certaines espèces de bivalves l'implication de siphons ont fait l'objet de nombreuses observations dans le cadre de l'étude du comportement alimentaire de ces animaux combinées avec une détermination de CR, aussi bien sur le terrain chez *M. edulis* (Newell *et al.* 1998, 2005, Dolmer 2000, Saurel *et al.* 2007) qu'en conditions de laboratoire chez *C. edule, M. edulis et Mya arenaria* (Newell *et al.* 1998, Riisgård *et al.* 2003), chez *Crassostrea virginica* (Frank *et al.* 2007) et chez *M. galloprovincialis* (Maire *et al.* 2007).

Frank *et al.* (2007) montrent en particulier que l'activité valvaire intervient en partie dans les variations de CR sans en expliquer l'ensemble des variations chez *C. virginica*. Newell *et al.* (2001) et Maire *et al.* (2007) ont montré que chez les moules, l'activité du siphon exhalant explique mieux les variations du CR que l'activité valvaire.

Particules en suspension dans l'eau

Plusieurs études de terrain et de laboratoire ont mis en évidence des variations du CR selon la nature, la taille et la concentration des particules organiques et inorganiques en suspension chez *M. edulis, C. edulis* et *V. pullastra* (Foster-Smith (1975), chez *M. edulis* (Bayne *et al.* 1993), chez *Pinctada margaritifera* (Pouvreau *et al.* 1999, 2000), chez *M. edulis*, *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus* (Defossez et Hawkins (1997), et sur plusieurs espèces de mollusques marins (Riisgård 2001, Ward et Shumway 2004, Cranford *et al.* 2011).

La nature des particules en suspension influe sur les variations observées du CR, en particulier selon que le régime est à base de microalgues produites en écloserie ou à base de seston du milieu naturel. Le comportement alimentaire est stimulé par des composés spécifiques présents dans le régime alimentaire et met en jeu la chimioréception chez *Placopecten magellanicus* (Ward *et al.* 1992) et *Argopecten purpuratus* (Navarro *et al.* 2000). Cependant, le CR a tendance à être mieux expliqué par des changements quantitatifs plutôt que qualitatifs du régime alimentaire (Hewitt et Pilditch 2004 en particulier et les références déjà cités dans ce paragraphe).

Selon Cranford *et al.* (2011), les bivalves retiennent efficacement les particules supérieures à 2 - 8 µm selon les espèces. De par leur taille, les picoplanctons et certains nanoplanctons ne sont pas capturés et consommés efficacement. Ils peuvent toutefois devenir accessibles aux bivalves lorsqu'ils sont agrégés en particules (Cranford *et al.* 2005, Kach et Ward 2008, Ward et Kach 2009) ou liés au microzooplancton (Loret *et al.* 2000).

La concentration des particules en suspension a une forte influence sur le CR et explique une grande part de la variance dans les mesures du CR. Bien que la forme de sa relation varie au sein et entre espèce, le CR finit par décliner quand la concentration en seston augmente sur une gamme plus ou moins large chez Chlamys farreri (Hawkins et al. 2001), chez P. canaliculus (James et al. 2001), chez Perna viridis (Wong et Cheung 2001); chez Atrina zelandica (Hewitt et Pilditch 2004), chez Mulinia edulis Mytilus chilensis (Velasco et Navarro 2003) et chez Pecten maximus et Mytilus edulis (Strohmeier et al. 2009). De nombreuses études ont montré que le CR présente un pic initial à relativement faible concentration, suivie d'un lent déclin chez P. canaliculus (Hawkins et al. 1999, James et al. 2001) et chez A. zelandica (Hewitt et Pilditch 2004). Cette réponse à la concentration de nourriture maximiserait la consommation de nourriture pendant les périodes de faible disponibilité de nourriture chez Mytilus edulis (Bayne et al. 1987) et chez C. gigas (Dupuy et al. 2000). Selon Cranford et al. (2011), il semble exister un continuum de stratégies alimentaires allant des espèces qui régulent principalement le CR (V. pullastra, Mercenaria mercenaria, M. arenaria et P. margaritifera, Foster - Smith 1975, Bricelj et Malouf 1984, Bacon et al. 1998, Hawkins et al. 1998), à celles à qui régulent principalement la production de pseudofèces (Mytilus edulis et C. edule, Foster - Smith 1975, Navarro et al. 1994, Hawkins et al. 1996), aux autres qui utilisent les deux mécanismes à des degrés divers (A. zelandica , C. edule , C. gigas , Mulinia edulis, M. chilensis, P. magellanicus et P. viridis, Cranford et Gordon 1992, Navarro et al. 1992, Soletchnik et al. 1996, Urrutia et al. 1996, Barillé et al. 1997, Iglesias et al. 1996, Bacon et al. 1998, Hawkins et al. 1998, Velasco et Navarro 2002, Hewitt et Pilditch 2004). La stratégie semble également varier selon les zones géographiques pour la même espèce par exemple chez C. gigas (Ren et al. 2000). Dans les zones où la qualité nutritionnelle du seston est élevée, la régulation de la sélection des particules par production de pseudofèces présente peu d'avantages bioénergétiques. La stratégie la plus efficace consiste donc à réguler le CR en fonction de l'abondance de la nourriture.

Les bivalves résidant dans des zones plus turbides avec des conditions de seston variables bénéficient de la régulation de la production de pseudofèces, mais les espèces les mieux adaptées à une turbidité élevée régulent également le CR pour maximiser l'apport énergétique (Velasco et Navarro 2002).

Température de l'eau

La température de l'eau de mer est un facteur connu pour avoir un impact sur la filtration, qui a été apprécié en conditions de laboratoire chez M. arenaria (Riisgård et Seerup 2003), chez M. edulis (Kittner et Riisgård 2005), chez C. gigas (Bougrier et al. 1995) et chez O. edulis (Haure et al. 2003). Toutefois, le facteur température ne semble pas déterminer le comportement alimentaire chez plusieurs espèces de bivalves en conditions naturelles : chez M. edulis (Widdows et Bayne 1971, Widdows 1976, 1978, Widdows et al. 1979, Thompson 1984, Prins et al. 1994, Smaal et al. 1997, Cranford et Hill 1999, Strohmeier et al. 2009), chez P. magellanicus (Cranford et Hill 1999) et chez P. maximus (Strohmeier et al. 2009). Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer les effets de la température en lien avec la filtration. L'augmentation de la filtration avec l'augmentation de la température est-elle causée par une «activité biologique» croissante ? Kittner et Riisgård (2005) indiquent que la fréquence de battement des cils impliqués dans la filtration ne peut pas être considérée comme une réponse biologique régulatrice aux variations de température ; ils soulèvent également l'importance d'une période d'acclimatation à la température préalable à toute détermination de CR. Jørgenson (1990), Larsen et Riisgård (2009) émettent l'hypothèse que l'effet de la température sur la filtration tient plus de la relation entre la température et la viscosité de l'eau de mer. La viscosité du milieu a un effet sur les mouvements ciliaires et le pompage de l'eau. Il a ainsi été démontré qu'à une température basse la viscosité plus élevée explique une grande partie de l'effet de la température sur le pompage de l'eau chez M. edulis (Jørgenson et al. 1990). Selon Cranford et al. (2011) « plusieurs études ont [...] utilisé des conditions de laboratoire optimales pour conclure que les preuves de la régulation biologique de la performance alimentaire font défaut chez les coquillages : chez plusieurs espèces de mollusques marins (Jørgensen (1996) et chez M. edulis (Riisgård 2001b, Kittner et Riisgård 2005) ».

Salinité de l'eau

Plusieurs études ont montré que la salinité peut influencer le CR chez *C. virginica* (Mcfarland *et al.* 2013, Casas *et al.* 2018), chez *M. edulis* (Gardner et Thompson 2001, Riisgård *et al.* 2013, Riisgård *et al.* 2014), chez *M. trossulus* (Gardner et Thompson 2001, Riisgård *et al.* 2014), chez *A. purpuratus* (Navarro et González 1998) et chez *Perna veridis* (Mcfarland *et al.* 1999). Chez des pétoncles *A. purpuratus* issues du milieu naturel, acclimatés pendant une semaine à 12°C aux salinités expérimentales (18, 21, 24, 27 et 30 ‰), le CR présente des valeurs similaires à 27 et 30 ‰, plus élevées que celles observées aux salinités les plus basses 18, 21 et 24 ‰ (Navarro et González 1998). Les effets de salinité différentes (10, 15, 25 et 35 ‰) sur le CR ont également été étudiés en conditions de laboratoire chez *P. viridis et C. virginica*. À 25 et 35 ‰, les CR des moules vertes étaient environ le double de celui des huîtres. Contrairement aux huîtres indigènes, les moules vertes présentent une diminution de leur CR et ont tendance à fermer leurs valves pour des salinités de 10 et 15 ‰. Dans un test spécifique de ce comportement, toutes les moules sont restées ouvertes à des salinités de 25 et 35‰ (Mcfarland *et al.* 1999). Chez *M. edulis*, l'effet de la salinité sur le CR a été étudié chez des moules issues du milieu naturel à 17 ‰, acclimatées pendant deux semaines

aux salinités expérimentales (5, 10, 20, 25, 30 ‰) et suivies pendant trois semaines. À des salinités comprises entre 10 et 30 ‰, les CR varient peu, mais à 5 ‰ ils sont nettement inférieurs. D'autres moules issues d'un autre milieu naturel à 6,5 ‰, placées aux salinités expérimentales s'adaptent mieux à la condition 5 ‰ (Riisgård *et al.* 2013). Des différences de CR comparables sont observées, chez deux espèces de moules différentes : *M. edulis* et *M. trossulus* acclimatés à 20 ‰ réagissent à un changement de salinité rapide à 6,5 ‰ en fermant immédiatement leurs valves, après quoi le CR augmente progressivement au cours des jours suivants, toutefois seule l'espèce *M. trossulus* s'acclimate complètement à 6,5 ‰ (Riisgård *et al.* 2014).

Vitesse et régularité du courant d'eau

La filtration efficace des particules alimentaires est dépendante de forces dynamiques mises en jeu dans le milieu marin. Les conditions turbulentes ont tendance à créer une relation négative entre prise alimentaire et vitesse du courant, alors que l'inverse est généralement observé dans des conditions d'écoulement laminaire. Il semble qu'une vitesse de courant modérée et des conditions de flux laminaire favorisent le CR, alors que des vitesses élevées et des conditions turbulentes inhibent le CR chez Dreissena polymorpha et Dreissena bugensis (Ackerman 1999). La plage de vitesses permettant une prise alimentaire maximale des coquillages dépend de l'espèce. Le CR maximal est obtenu chez M. edulis pour une vitesse du courant d'eau de 25 cm.s⁻¹ (Wildish et Miyares 1990), de 80 cm.s⁻¹ dans d'autres conditions expérimentales (Widdows et al. 2002), chez M. trossulus de 18 cm.s⁻¹ et chez M. californianus de 12 cm.s⁻¹ (Ackerman et Nishizaki 2004), de 8 cm.s⁻¹ chez R. decussatus (Sobral et Widdows 2000). A partir d'une certaine vitesse, le CR peut être inhibé par exemple chez P. magellanicus à partir de 20-25 cm.s⁻¹ (Wildish et al. 1987, Pilditch et Grant 1999). Chez certaines espèces les variations de vitesse ont montré peu d'influence sur le CR, par exemple chez C. edule entre 5 et 35 cm.s⁻¹ (Widdows et Navarro 2007). Chez C. gigas, une étude en conditions de laboratoire visant à tester douze vitesses a montré un effet négatif significatif de la vitesse du courant sur la filtration de l'huître creuse. Pour une vitesse de courant nulle, le CR était de 5,57 \pm 0,12 l.h⁻¹.g⁻¹, diminuant jusqu'à 2,98 \pm 0,31 l.h⁻¹.g⁻¹ pour une vitesse de 7,9 cm.s⁻¹ (Buzin 2011). Chez certains bivalves, la réduction du CR avec l'augmentation de la vitesse du courant semble liée à la capacité réduite du bivalve à aspirer de l'eau dans sa cavité palléale lorsqu'il existe des flux d'eau avec des différences de pressions importantes (différence entre la pression dans la cavité du manteau créée par la pompe ciliaire et la pression externe créée par le courant d'eau de mer à une vitesse donnée) chez Potamocorbula amurensis (Cole et al. 1992) et chez P. magellanicus (Wildish et Saulnier 1993).

Polluants chimiques dans l'eau

Des études ont montré des effets négatifs sur le CR des bivalves de la présence de polluants chimiques chez *M. edulis* (Mubiana et Blust 2007), de différents métaux et nanoparticules d'oxydes métalliques chez *M. galloprovincialis* (Montes *et al.* 2012), de différents hydrocarbures polycycliques aromatiques chez *M. galloprovincialis* (Fernández *et al.* 2010) et chez *C. gigas* (Martin *et al.* 2003), de différents composés organochlorés et métaux chez *M. galloprovincialis* (Tsangaris *et al.* 2010) et de microplastiques chez *M. edulis*, (Browne *et al.* 2008, Wegener *et al.* 2012), chez *C. gigas* (Sussarellu *et al.* 2016) et chez *Atactodea striata* (Xu *et al.* 2017). Les effets de résidus de médicaments sur le CR ne semblent pas avoir été évalués.

Toxines et exsudats de microalgues dans l'eau

D'autres études ont montré que les biotoxines de microalgues altérent le CR avec des effets plus ou moins négatifs et pouvant évoluer selon les facultés de dépuration de l'espèce de mollusque considérée : chez Argopecten irradians, C. virginica, M. mercenaria, M. arenaria, M. edulis (Hégaret et al. 2007), chez M. chilensis exposée à Alexandrium catanella (Navarro et Contreras 2010) et chez M. mercenaria exposée à Karenia brevis (Echevarria et al. 2012). La plupart des études utilisait des toxines de type paralysantes et ont mis en évidence l'impact négatif de la biotoxine sur le CR. Les exsudats non toxiques de microalgues peuvent également influer sur le CR; par exemple les exsudats chimiques de Chaetoceros muelleri ont augmenté le CR de P. magellanicus (Ward 1992).

Organismes pathogènes

Le parasite *Haplosporidium nelsoni* affecte négativement le métabolisme de *C. virginica* en réduisant le CR (Newell 1985), l'indice de condition (Newell 1985, Barber *et al.* 1988a), la teneur en glycogène (Barber *et al.* 1988b) et la fécondité (Barber *et al.* 1988a). Une étude complémentaire de Barber *et al.* (1991) s'appuyant sur des familles sélectionnées à l'égard de la maladie MSX impliquant *H. nelsoni*, présente des résultats différents. Un examen de l'effet de *H. nelsoni* chez les huîtres sensibles, a révélé que le parasite n'avait pas d'effet constant sur le CR et le taux de consommation d'oxygène. Ils ont constaté qu'après 80% de disparition du stock sensible, les survivants, qui étaient encore fortement infestés, affichaient un CR et un taux de consommation d'oxygène similaires à ceux des huîtres résistantes, qui étaient en grande partie non infectées. Les 20% de survivants étant les individus les plus résistants du groupe sensible, Barber *et al.* (1991) ont suggéré que l'ajustement métabolique au parasitisme pourrait constituer un aspect physiologique important de la résistance à la maladie MSX.

Newell et al. (1994) ont mesuré différents paramètres physiologiques dont le CR sur une période d'un an chez des huîtres *C. virginica* naturellement infestées par le parasite *Perkinsus marinus*. Des niveaux d'infestation élevés entraînent un arrêt de la croissance et une mortalité éventuelle. Néanmoins, ni le métabolisme ni l'efficacité de l'assimilation n'étaient corrélés à l'intensité de l'infection. L'activité d'alimentation a parfois été réduite mais seulement chez les individus les plus fortement parasités. Ces auteurs ont conclu que l'effet observé de *P. marinus* sur la croissance de *C. virginica* était dû au fait que le parasite avait surpassé l'hôte sur l'utilisation des nutriments stockés en réserves et non parce qu'il affectait l'acquisition d'énergie ou le métabolisme. Dans une autre étude, Ward et Langdon (1986) ont constaté que lors d'une infestation récente (deux semaines), l'ectoparasite *Boonea impressa* interfère dans l'alimentation de *C. virginica* en particulier en altérant son activité valvaire, mais ont noté également avec quelle rapidité les CR sont rétablis après le retrait de *B. impressa*. Gale *et al.* (1991) confirment que *C. virginica* récupère rapidement des effets de *B. impressa* sur l'alimentation de son hôte.

Chez *C. gigas*, Soletchnik *et al.* (1998) ont étudié les impacts d'une bactérie *Chlamydia*-like sur la physiologie de l'huître creuse. Dans les populations de *C. gigas* reconnues infectées par cette bactérie, Soletchnik *et al.* (1998) ont estimé que le CR représentait un meilleur bioindicateur d'un niveau d'infection élevé par rapport à d'autres paramètres physiologiques (respiration, production de matières fécales, taux d'absorption, potentiel de croissance). Ils ont montré également une relation linéaire positive entre les anomalies des branchies et le taux de filtration de *C. gigas* nourrie à *Skeletonema costatum*.

Chez R. philippinarum, Flye-Sainte-Marie et~al. (2007) ont noté que lors d'une infection par la bactérie Vibrio~tapetis, son expression clinique, la maladie de l'anneau brun pouvait avoir un impact sur le CR de la palourde. Chez les individus avec un stade de maladie (Conchyoline Deposit stage, CDS) ≥ 4 le CR était significativement inférieur à celui des palourdes asymptomatique (CDS = 0). Le CR du premier est de 45% à 62% inférieur à celui du second. Le CR maximal diminue avec le développement des symptômes et est significativement plus bas chez les palourdes avec un CDS ≥ 4 par rapport aux asymptomatiques (CDS = 0).

Le CR maximal dans le premier cas diminue entre 41% et 56% par rapport au second, ce qui suggère que la capacité de filtration est affectée par le développement l'anneau brun.

Le temps d'activité de filtration (FTA) est également affecté négativement par le développement de la maladie. En moyenne, les individus atteints de CDS<4 consacrent entre 80 et 95% de leur temps à la filtration, alors que les individus gravement malades (CDS \geq 4) en consacrent entre 59 et 67%.

2.2. Biomarqueurs de l'activité respiratoire

Les mollusques bivalves marins disposent de branchies qui interviennent dans la réalisation de leurs échanges gazeux avec le milieu environnant. Dans ces cténidies, le courant respiratoire est créé par des rangées de cils latéraux sur des filaments disposés alternativement de part et d'autre de l'axe des branchies. Le courant d'eau ainsi créé est orienté dans le sens opposé à celui de l'hémolymphe dans les filaments, assurant une oxygénation efficace par le principe de contre-courant. Intervenant également dans la filtration alimentaire, les branchies sont très développées et le courant d'eau créé est bien supérieur aux besoins seuls de la ventilation respiratoire (Shumway 1982, Jørgensen *et al.* 1986). La cavité du manteau est fonctionnellement divisée par les branchies en chambres inhalante (ventrale) et exhalante (dorsale) (Ghiretti 1966).

C. gigas présente ce schéma général d'organisation anatomique et fonctionnelle. Des espèces fouisseuses présentent de surcroît des prolongements du manteau formant des siphons inhalants et exhalants leur permettant de s'enfouir tout en restant en contact avec de l'eau à des fins respiratoires et d'alimentation. L'échange de gaz a donc lieu principalement dans les branchies, mais le manteau pourrait également jouer un rôle de moindre importance dans la respiration des bivalves (Hopkins 1946).

L'efficacité de ce processus peut être estimée par un taux de consommation d'oxygène, (OCR). Dans un banc expérimental tel que décrit en partie II § 2.3, la concentration en oxygène dissous dans l'eau de mer peut être mesurée et l'OCR peut être calculé de la façon suivante (Haure *et al.* 2003).

Oxygen Consumption Rate

OCR (mg
$$O_2.h^{-1}$$
) = D x (I-O)

où D représente le débit entrant (l.h⁻¹) dans la chambre de mesure contenant l'huître ; l est la concentration en oxygène (mgO₂.l⁻¹) mesurée au niveau de la chambre témoin ne contenant pas d'huître ; O est la concentration en oxygène (mg O₂.l⁻¹) mesurée au niveau de la chambre de mesure contenant l'huître. L'OCR peut également être exprimé par rapport à la masse de chair sèche (DW) de l'huître (mg O₂.h⁻¹.g⁻¹DW); à la fin de l'expérimentation, l'huître est décoquillée et sa chair est lyophilisée pendant 48 heures puis pesée.

Tableau V. Facteurs de variations biologiques de l'OCR chez C. gigas

Origine	Facteurs	Effets sur l'OCR
Endogène	Taille	L'OCR augmente avec la taille (plutôt la surface du corps) jusqu'à
		une certaine taille.
	Masse	L'OCR et la masse sont liées par une relation de la forme
		OCR=aDW ^b .
	Âge	Chez certains bivalves, l'OCR serait moins élevé chez des
		individus âgés que chez des individus de même taille mais plus
		jeunes. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Origine géographique	Il existerait des différences d'OCR selon les origines
		géographiques de souches de <i>C. gigas</i>
	Patrimoine génétique	L'OCR différerait chez des animaux sélectionnés ou non chez
		certaines espèces de bivalves. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Maturité sexuelle	Une différence d'OCR a été observée en fonction du stade de
		maturation sexuelle chez les individus mâles et femelles.
		Chez certains bivalves, l'OCR serait moins élevé après la ponte. A
		confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Genre	Une différence d'OCR entre les individus de sexes différents de
		C. gigas a été observée dans une étude.
	Activité valvaire	Chez certains bivalves, l'OCR baisse lors de fermeture partielle
	A -41: -14 4 -111 - 1: -	ou totale des valves. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Activité ciliaire	L'activité des cils joue un rôle important dans la ventilation
	1-0	branchiale et sur l'OCR. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Jeûne	Certains bivalves, présentent une baisse de l'OCR lors d'un jeûne
Fyogòno	Darticules on suspension	provoqué. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
Exogène	Particules en suspension L'OCR augmente constamment avec la densité a	
		une valeur seuil de densité où l'OCR décroit par la suite. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Température	L'OCR et la température sont liées par une relation de la forme
	Temperature	OCR = $[a + be^{lncT}]$ DW ^d . Températures d'acclimatation et
		d'exposition sont à considérer dans les variations d'OCR.
	Salinité	L'OCR varie dans des conditions de salinités différentes chez
	Samme	certains bivalves. Salinités d'acclimatation et d'exposition sont à
		considérer dans les variations observées d'OCR. L'étude de
		combinaisons températures-salinités différentes montre
		toutefois que c'est la température qui a le plus d'influence sur
		l'OCR chez <i>C. gigas.</i>
	Pression partielle en	L'OCR et la pression partielle en oxygène du milieu sont liées par
	oxygène .	une relation de la forme OCR = $BO + B1PO_2 + B2 (PO_2)^2$. C. gigas
		serait un faible oxyrégulateur, dans le sens où elle ne peut
		réguler son OCR que sur une plage limitée d'oxygène disponible
		dans le milieu.
	рН	Chez certains bivalves, la baisse du pH du milieu induit une
		baisse de l'OCR. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Polluants chimiques	Chez certains bivalves, la présence de polluants métalliques dans
		le milieu induit une dépression respiratoire avec une variation
		d'OCR selon une relation dose-effet. A confirmer chez <i>C. gigas</i> .
	Organismes pathogènes	Chez certains bivalves, l'OCR est réduit ou non lors d'infestation
		ou d'infection; les variations différent selon les couples
		hôtes/organismes pathogènes étudiés. L'injection intra-
		musculaire du virus OsHV-1 à <i>C. gigas</i> induirait une diminution
		de la consommation d'oxygène chez ces animaux.

L'OCR est calculé chez une huître en activité de ventilation. Bougrier *et al.* (1998) et Haure *et al.* (2003) ont proposé un paramètre associé à l'OCR, la respiratory time activity (RTA) pour estimer le temps durant lequel l'huître consomme effectivement de l'oxygène (OCR>0), par rapport à la durée totale de l'expérimentation.

Respiratory Time activity

RTA (%) = $\sum_{1}^{n} t / T$

où t1, t2 .. tn sont les durées des périodes d'activité respiratoire de l'huître ; T la durée totale d'enregistrement de l'activité respiratoire.

Les facteurs de variations biologiques de l'OCR, d'origines endogène ou exogène, sont résumés dans le tableau V. Les facteurs de variations pré-analytiques et analytiques de l'OCR sont exposés dans la partie III § 2.3.

Taille et masse des bivalves

Plusieurs auteurs ont étudié les relations entre l'OCR et ces deux facteurs de variations. Cette relation peut être exprimée sous la forme d'une équation de la forme OCR= a*DW^b où DW est la masse de chair sèche (g), a une constante représentant la pente de la courbe, b un exposant traduisant l'allométrie pour le biomarqueur considéré de l'espèce considérée (Zeuthen 1953, Bertalanffy 1957). Selon Ghiretti (1966), dans certains cas la valeur de b est proche de 0,67 ce qui serait la valeur de b dans le cas où la respiration est proportionnelle à la taille ou plus précisément à la surface du corps. De grandes variations ont été décrites pour la valeur de b, de 0,45 à 1,00, de plutôt proportionnel à la surface à totalement proportionnel à la masse : chez *M. edulis* (Krüger 1960, Read 1962, Widdows 1978), chez *Geukensia demissa* (Read 1962), chez *Littorina littorea* (Newell et Roy 1973), chez *Arctica islandica* (Taylor *et al.* (1975), chez *M. galloprovincialis, R. decussatus et Polititapes aureus* (Riva et Massé 1983), chez *C. gigas* (Bougrier *et al.* 1995), chez *O. edulis* (Riva et Massé 1983, Haure *et al.* 1998) et chez *P. canaliculus* (James *et al.* 2001).

Âge des bivalves

Selon Bernard (1984), les taux de ventilation et de consommation d'oxygène chez des individus âgés de *M. edulis* et de *Leukema staminea* seraient moins élevés que ceux d'individus de même taille mais plus jeunes.

Notre recherche bibliographique n'a pas permis de soulever d'autres publications faisant mention de l'êfet de l'âge (et exclusivement de l'âge) sur l'OCR de mollusques marins.

Origine des bivalves

Les taux de respiration de différentes « souches » géographiques de *C. gigas* ont été comparés par Goulletquer *et al.* (1999). Les géniteurs échantillonnés en France (Marennes-Oléron), au Japon (Hiroshima), à Taiwan (Tunkang) et en Espagne (Cadix) ont été différenciés à la fois par leur origine géographique et par l'utilisation de marqueurs ADN mitochondriaux, permettant ainsi la distinction entre deux taxa très proches *C. gigas* et *C. angulata*. Après reproduction de ces géniteurs, les taux de respiration du naissain de chaque « souche », élevé dans des conditions contrôlées similaires, ont été mesurés individuellement à 20°C. Les résultats montrent qu'il existe une variabilité physiologique entre les différentes souches, due probablement à une adaptation physiologique locale et/ou à des adaptations

génétiques. Les huîtres de souche française ont montré les taux de respiration les plus élevés, suivis par les souches japonaise, taiwanaise et les hybrides entre la souche espagnole et française.

Patrimoine génétique des bivalves

Koehn et Shumway (1982) ont mis en évidence une composante génétique de la respiration chez *C. virginica*. Des huîtres hétérozygotes auraient un taux métabolique de base plus bas que les homozygotes pour 5 loci (Pgi, Pgm, Lap-5, Lap-8, Est). La différence observée entre les individus homozygotes et hétérozygotes serait amplifiée lorsque les animaux sont confrontés à une modification des conditions environnementales, les individus hétérozygotes étant plus aptes à contrôler leur consommation d'oxygène. Toro *et al.* (1996) ont trouvé une corrélation négative chez *Ostrea chilensis* entre l'OCR (p <0,05) et l'hétérozygotie sur 4 loci (Lap, Pgi, Pgm, Ca).

Maturité sexuelle et genre des bivalves

Galtsoff (1964) a signalé une diminution significative de la consommation d'oxygène de *C. virginica* un mois après la ponte. Plusieurs auteurs s'accordent sur un coefficient d'allométrie de 0,8 pour l'OCR chez *C. gigas* (Raillard 1991, Bougrier *et al.* 1995, Barillé *et al.* 1997). Toutefois, dans une étude relative à l'écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte chez l'huître creuse, Soletchnik *et al.* (1997) proposent un coefficient de 0,574 en fin de maturation des huîtres à une température proche de 21°C; ils précisent qu'aucune différence significative des valeurs d'OCR n'apparaît selon le sexe des huîtres. Dans une étude de Tran *et al.* (2008), une différence de consommation d'O₂ entre les individus de sexes différents a été mesurée pour la première fois chez *C. gigas*. Les huîtres mâles avaient une consommation d'O₂ deux fois supérieure à celle des huîtres femelles. Une différence d'OCR a également été montrée en fonction du stade de maturation sexuelle chez individus mâles et femelles.

Activité valvaire des bivalves

La prise d'oxygène est directement affectée par le mouvement et le niveau d'ouverture des valves, qui permet ou *a contrario* entrave le flux d'eau chargé en gaz dissous. Mitchell (1914) a trouvé que la principale cause de variabilité dans les études sur la respiration chez *C. virginica* venait du degré d'ouverture des valves. Collier (1959) relate trois niveaux d'entrebâillement chez *C. virginica* avec des taux de pompage différents conduisant à des taux de consommation d'oxygène différents.

Ces trois niveaux sont peut-être à rapprocher du type A parmi les cinq types de mouvements valvaires (A-E) décrits par Galtsoff (1964), où A est décrit comme le mouvement valvaire « normal » chez une huître *C. virginica* avec un courant laminaire d'eau, B à D comme les mouvements valvaires en réponse à une élévation de la température de l'eau, à l'exposition à des substances irritantes ou toxiques, E survenant chez les huîtres émettant des gamètes. Galtsoff (1964) décrit également une baisse de la consommation d'oxygène, lors de fermeture partielle des valves, qu'il attribue à une diminution du courant d'eau. Famme (1980) observe également chez *M. edulis* que l'OCR est réduit momentanément dans les deux minutes qui suivent la fermeture des valves, à un niveau six fois inférieur à l'OCR maximal, obtenu lorsque l'animal a ses valves ouvertes avec une haute pression partielle en oxygène.

Activité ciliaire des bivalves

L'activité des cils joue un rôle important dans les mouvements d'eau à la surface des branchies et par conséquent tout facteur affectant les mouvements ciliaires a un impact sur l'OCR. Selon Shumway (1982), toute étude sur la respiration des huîtres devrait prendre en compte l'activité valvaire, le taux de pompage et/ou les mouvements ciliaires comme facteurs de variations de la ventilation. Les facteurs influençant l'activité ciliaire pouvant elle-même affecter l'OCR ont été étudiés chez plusieurs espèces de mollusques chez des organes isolés ou des organismes entiers in vivo chez M. edulis (Gray 1924, Aiello 1957), chez M. mercenaria (Loveland et Chu 1969) et chez A. irradians, Modiolus demissus, C. virginica (Vernberg et al. 1963).

Jeûne

Hopkins (1946) dans une étude sur l'effet de plusieurs facteurs sur la consommation d'oxygène de tissus de *M. mercenaria*, a mis en évidence que les tissus branchiaux d'animaux âgés n'avaient pas la même consommation d'oxygène que ceux d'individus jeunes, mais également que cette différence n'était plus observée lorsque ces deux classes d'âge étaient placées pendant 3-5 jours à 23°C dans des conditions de jeûne.

Selon Stickle et Duerr (1970) et Stickle (1971) la consommation d'oxygène de *Nucella lamellosa* pendant et hors période de reproduction, reste constante ou augmente lors d'un jeûne provoqué. Par ailleurs, deux espèces de moules *M. edulis* et *M. californianus* présentent une baisse de leurs taux de consommation d'oxygène et de filtration lors d'un jeûne provoqué (Bayne 1973, Bayne *et al.* 1976).

Particules en suspension dans l'eau

Il existe peu d'études sur les relations entre la densité algale et le taux de consommation d'oxygène chez *M. edulis* (Thompson et Bayne 1974), chez *Aulacomya atra* (Griffiths et King 1979) et chez *O. edulis* (Beiras *et al.* 1994). Tomaru *et al.* (2012) ont étudié si l'espèce algale distribuée (*Pavlova lutheri* ou *Chaetoceros gracilis*) pouvait avoir un effet sur l'OCR de *Pinctada fucata martensii*: l'OCR augmente constamment avec la densité algale indépendamment de l'espèce algale, jusqu'à une valeur seuil de densité où il décroit ensuite.

Températures d'exposition et d'acclimatation

Les effets sur la consommation d'oxygène d'une exposition à une température directement ou après une phase d'acclimatation ont été étudiés sur des tissus isolés ou des organismes entiers. Les effets observés sur des tissus ne reflétant pas systématiquement ceux observés sur des animaux (Shumway 1982), les travaux cités ici concernent principalement des études réalisées au niveau de mollusques entiers.

Krogh (1914) a décrit la relation entre la température et la consommation d'oxygène en termes de courbe connue sous le nom de courbe normale de Krogh. Plusieurs études ont ensuite permis de préciser les courbes représentant les variations du taux de consommation d'oxygène en fonction de la température d'exposition (courbes R-T) chez plusieurs espèces de mollusques marins. Chez les invertébrés marins, les températures élevées augmentent la demande en oxygène, ce qui se traduit par une augmentation de la ventilation et de la fréquence cardiaque jusqu'à un seuil critique ou une température seuil lorsque la demande en oxygène est supérieure à la capacité de l'organisme d'absorber et de délivrer de l'oxygène aux tissus, ce qui entraîne un métabolisme anaérobie et une défaillance fonctionnelle et énergétique progressive (Casas *et al.* 2018 citant Pörtner 2001, Jansen *et al.* 2007).

Chez les huîtres, selon Shumway (1982), plusieurs études ont montré que la consommation d'oxygène chez les huîtres (*Ostrea circumpicta*, *O. edulis* et *C. virginica*) augmente régulièrement entre environ 1 à 25°C, la consommation maximale se produisant à environ 25°C et qu'en dessous de 5°C et au-dessus de 25°C, elle diminue rapidement (Mitchell 1914, Nozawa 1929). D'autres auteurs (Dame 1972, Newell *et al.* 1977, Shumway et Koehn 1982 et Haure *et al.* 1998) indiquent que la consommation d'oxygène augmente avec une augmentation de température de 5 à 30°C et ne mettent pas en évidence d'arrêt de la consommation à 30°C. Selon Shumway (1982), entre 5 et 25°C, les pentes des courbes R-T diffèrent peu entre les différentes *Ostrea* spp et sont tous significativement plus élevées que la pente des courbes de *Crassostrea* spp.

Cela est probablement dû au fait que le genre *Ostrea* a tendance à être un genre d'eaux plus froides, tandis que le genre *Crassostrea* est plus communément trouvé dans les climats plus chauds, les espèces d'eaux froides réagissant davantage aux températures plus chaudes que les espèces d'eaux chaudes. D'autres études complètent ces informations chez les huîtres dans des conditions expérimentales variées : chez *O. circumpicta* (Nozawa 1929), chez *O. edulis* (Rodhouse 1978, Buxton et Newell 1981, Riva et Massé 1983, Hutchison et Hawkins 1992, Haure *et al.* 1998), chez *C. gigas* (Bougrier *et al.* 1995, 1998, Haure *et al.* 2003, Akashige *et al.* 2005, Lee *et al.* 2018) et chez *C. virginica* (Van Winkle 1968, Casas *et al.* 2018a, b).

Dans les différentes études ayant trait aux facultés d'acclimatation des mollusques marins à des températures différentes, un descripteur en lien avec l'OCR est communément employé : le Q10 qui traduit l'effet d'une variation de la température de 10°C sur le taux de consommation d'oxygène et est calculé par la formule : Q10 = (OCR2/OCR1)^{10/(T2-T1)} où OCR2 et OCR 1 sont les taux de consommation d'oxygène déterminés aux températures élevée et basse, respectivement T2 et T1 (Jansen *et al.* 2007). Selon Shumway (1982), en règle générale, des *C. virginica* acclimatées au chaud ont un Q10 supérieur à celui des *C. virginica* acclimatées au froid, lorsqu'elles sont ensuite exposées à des températures plus basses. Il semble que les huîtres ne montrent pas d'acclimatation ou une acclimatation partielle du taux de consommation d'oxygène à différentes températures chez *O. edulis* même après 70 jours d'acclimatation (Newell *et al.* 1977) et chez *C. virginica* après trois semaines (Shumway et Koehn 1982).

Chez C. gigas, en particulier, Bougrier et al. (1995) ont proposé un modèle pour la consommation d'oxygène d'animaux soumis à une acclimatation de dix jours formulé par : $VO_2 = [a + be^{lncT}] DW^d$, où VO_2 (mg. h⁻¹) [ou OCR pour reprendre le biomarqueur employé dans la présente thèse] est la consommation d'oxygène, T (°C) est la température, DW (g) est la masse de chair sèche et a, b, c, d des constantes. Le logarithme de c est analogue au Q10 et indique un doublement du taux métabolique pour chaque augmentation de 10°C de la température. Dans un tel modèle, la consommation d'oxygène est divisée en deux termes : aDW^d + be^{lncT} DW^d. Seul le second terme est fonction de la température. Le paramètre d est le coefficient allométrique dont la valeur est estimée à 0,8 pour la consommation d'oxygène chez C. qigas. Les auteurs soulèvent toutefois que ce modèle semble incomplet chez des C. gigas en période de reproduction. Les différences du taux de consommation d'oxygène des huîtres dans cette étude, causées par des changements de température, indiquent que dix jours d'acclimatation n'étaient probablement pas suffisants pour réguler leur métabolisme. Selon Bougrier et al. (1995), ces différences peuvent être liées à l'effet de la température sur le taux d'activité enzymatique impliqué dans le métabolisme normal. En effet, à partir d'une situation initiale de faible activité enzymatique (métabolisme faible en février à 6°C), l'activité enzymatique accrue serait synchronisée avec l'augmentation de la température. En revanche, lorsque l'activité est élevée (en septembre), une baisse de température n'induit pas de dépression immédiate de l'activité enzymatique. Cependant, la consommation d'oxygène observée sur le terrain chez les huîtres acclimatées est en accord avec le modèle proposé, basé sur des animaux acclimatés expérimentalement.

Comme l'énonçaient déjà Buxton *et al.* (1981), il apparaît donc que « la consommation d'oxygène [est] principalement contrôlée par des interactions complexes entre l'exposition et l'acclimatation à une température plutôt que par une simple dépendance à l'une ou l'autre de ces variables ».

Chez d'autres espèces de mollusques marins, des études semblables ont été menées sur les effets de la température d'exposition et/ou d'acclimatation sur la consommation d'oxygène, qui ne seront pas détaillées dans la présente thèse consacrée à *C. gigas*: chez *M. edulis* (Read 1962, Van Winkle 1968, Widdows et Bayne 1971, Widdows 1973, Widdows 1978, Loo 1992, Artigaud *et al.* 2014), chez *M. demissus* (Van Winkle 1968) chez *Mytilus galloprovincialis* (Riva et Massé 1983), chez *Littoraria irrorata* (Newcombe *et al.* 1936), chez *L. littorea* (Newcombe *et al.* 1936, Spärck 1936, Newell et Northcroft 1967, Newell et Roy 1973), chez *M. mercenaria* (Hopkins 1946, Van Winkle 1968), chez *Actinia equina, Nephtys hombergii, C. edule* (Newell et Northcroft 1967), chez *Limecola balthica, Mulinia lateralis, M. arenaria* (Kennedy et Mihursky 1972), chez *R. decussatus* et *R. philippinarum* et *Ruditapes aureus* (Riva et Massé 1983, Bodoy *et al.* 1986) et chez *P. maximus* (Artigaud *et al.* 2014).

Salinité d'exposition et d'acclimatation

Les effets sur la consommation d'oxygène d'une variation de salinité du milieu ont été étudiés sur des tissus isolés ou des organismes entiers. Les effets observés sur des tissus ne reflétant pas systématiquement ceux observés sur des animaux (Shumway 1982), les travaux cités ici concernent principalement des études réalisées au niveau de mollusques entiers.

Le métabolisme des mollusques aquatiques, comme pour les autres invertébrés aquatiques, est généralement affecté par la pression osmotique de l'environnement. En ce qui concerne la réponse physiologique au niveau des tissus, il est attendu en théorie que lorsque la salinité diminue, les organismes marins consomment plus d'oxygène à cause du travail accru qu'exige le maintien de l'équilibre osmotique (Bernard 1984). De nombreux animaux osmorégulateurs réagissent à une diminution de la salinité du milieu par une augmentation de la fréquence respiratoire et *a contrario* de nombreux animaux osmoconformes réagissent à une modification de la salinité par une diminution de la fréquence respiratoire (Ghiretti 1966). Leur réponse aux changements de salinité n'est cependant pas uniforme. Chez les bivalves, la réaction est complexe quand il y a ventilation, activité sensible à la salinité. Comme la ventilation utilise une grande partie de l'oxygène absorbé, l'impact combiné de la température et de la salinité induit des processus métaboliques mais également des réponses ventilatoires adaptés (Bernard 1984).

Il existe peu d'informations sur les effets de la salinité ou les effets combinés de la salinité et de la température sur la respiration des huîtres entières. Shumway et Koehn (1982) ont mesuré les taux de consommation d'oxygène sous neuf régimes combinant des températures (10, 20 et 30°C) et des salinités (7, 14 et 28 ‰) chez *C. virginica* après une acclimatation de 2-3 semaines, sans apport alimentaire. Ils ont présenté une série d'équations de régression multiple reliant les salinités, les températures d'exposition et d'acclimatation à la consommation d'oxygène mesurée chez des huîtres mises à la diète. Ces équations illustrent que :

- (1) à mesure que la salinité d'acclimatation diminue, l'effet de la température d'exposition devient plus prononcé,
- (2) lorsque la salinité d'acclimatation diminue, l'effet de la salinité d'exposition diminue,
- (3) à mesure que la température d'acclimatation augmente, l'effet de la salinité d'exposition diminue,
- (4) à mesure que la température d'acclimatation augmente, l'effet de la température d'exposition augmente.

Le degré de régulation de la consommation d'oxygène de *C. virginica* dans cette étude diminuerait avec l'augmentation de la température ou la diminution de la salinité (Shumway et Koehn 1982).

Plus récemment, Casas et al. (2018) ont étudié les effets sur plusieurs biomarqueurs physiologiques de *C. virginica* de la salinité combinée à la saison et de la salinité combinée à la température et à l'origine géographique des animaux. Dans ces deux études, les animaux ont fait l'objet d'une acclimatation de trois semaines et n'étaient pas nourris la veille de l'exposition aux facteurs testés. Dans la première étude, l'OCR était significativement affecté par l'interaction de la salinité et de la saison. Pour toutes les salinités testées (3, 6, 9 15 25 ‰), l'OCR en été était significativement plus grande qu'en hiver.

Bien qu'aucune différence significative d'OCR aux différentes salinités n'ait été détectée en hiver, en été l'OCR d'huîtres à une salinité de 15 et 25 ‰ était significativement supérieure à l'OCR des autres salinités testées. Casas et al. (2018) émettent comme hypothèse que ces différences observées en été peuvent être liées aux différents stades de développement gonadique des huîtres maintenues aux différentes salinités. Dans la seconde étude, pour la plage de température (10, 20 et 30°C) et de salinité (15 et 25 ‰) testée dans cette étude, seule la température a des effets significatifs sur l'OCR, aucune différence significative de l'OCR étant observée en fonction des salinités testées (Casas et al. 2018).

Shumway (2009) estime que « c'est sans aucun doute la possession de cette physiologie plutôt élastique ou euryplasique [...] qui permet à *C. virginica* d'utiliser l'oxygène disponible dans une large gamme de combinaisons température-salinité et de maintenir ainsi un gain d'énergie provenant d'un environnement en perpétuelle fluctuation ».

Des études ont été menées sur les effets de la salinité d'exposition et/ou d'acclimatation sur la consommation d'oxygène chez d'autres espèces de mollusques marins, qui ne seront pas détaillées dans la présente thèse : chez *M. galloprovincialis* (Bouxin 1931), chez *M. edulis* (Lange 1968, Van Winkle 1968), chez *M. demissus* (Van Winkle 1968), chez *M. mercenaria* (Hopkins 1946, Van Winkle 1968) et chez *A. purpuratus* (Navarro et Gonzalez 1998).

Pression partielle en oxygène dans l'eau

Selon Ghiretti (1966), il existe chez les mollusques toutes sortes de réaction du métabolisme à la pression partielle en oxygène (PO_2) du milieu, de la dépendance totale ou partielle à la complète indépendance. Selon Shumway (1982), ces animaux peuvent être oxyconformes (l'OCR varie directement proportionnellement à la PO_2 , ils réduisent leur OCR avec la diminution d'oxygène disponible) ou oxyrégulateurs (l'OCR est plus ou moins indépendante de la PO_2 , ils cherchent à maintenir leur OCR constant sur une large gamme d'oxygène disponible). Le point à partir duquel la consommation d'oxygène cesse d'être indépendante et devient dépendante de l'oxygène disponible dans le milieu est connu sous le point critique de l'oxygène (PCO_2).

Mangum et Van Winkle (1973) ont proposé que la consommation d'oxygène soit liée à la diminution de la pression d'oxygène, par la relation : OCR = B0 + B1PO₂ + B2 (PO₂)², où OCR est la consommation d'oxygène, PO₂ correspond à la pression partielle d'oxygène, B0 à la consommation minimale d'oxygène constatée à très faible PO₂, B1 est l'effet linéaire de la PO₂ sur l'OCR, B2 est l'écart par rapport à la linéarité de l'effet de PO₂ sur R. Un oxyrégulateur présenterait un B0 = 1 et B1 et B2 seraient égaux à zéro alors qu'un oxyconformeur aurait à la fois B0 et B2 égaux à 0 et B1> 0. Mangum et Van Winkle (1973) ont en outre suggéré que le coefficient de second ordre B2 pourrait traduire la capacité d'une espèce à réguler son OCR en cas de diminution de la PO₂ : plus la valeur de B2 est négative, plus l'indépendance à l'oxygène est grande et meilleures sont les capacités de régulation de l'animal.

Certains bivalves sont indépendants de la PO₂ du milieu jusqu'à une certaine pression (PcO₂) en dessous de laquelle la consommation d'oxygène chute à des niveaux très bas. Cela a été observé en particulier chez *P. magellanicus*, *A. irradians* (Van Dam 1954), *O. edulis* (Galtsoff et Wipple 1930), *M. edulis* (Bruce 1926).

Plusieurs études indiquent que les huîtres présentent également des capacités à réguler leur consommation d'oxygène lorsque la PO₂ diminue (Nozawa 1929, Galtsoff et Whipple 1931, Shumway et Koehn 1982). Shumway (1982), comparant les valeurs de PcO₂ de différentes espèces d'huîtres, estime que *C. virginica* présente une meilleure capacité d'oxyrégulation qu'*O. circumpicta* et *O. edulis*. Widdows *et al.* (1989) ont constaté que la tolérance à l'hypoxie voire à l'anoxie des larves de *C. virginica* augmentait avec le stade de développement et la taille du corps et que les larves d'huîtres maintenaient des taux de consommation d'oxygène indépendants de la P_{O2} jusqu'à de basses PcO₂, comme chez les *C. virginica* juvéniles et adultes.

Les huîtres ne contiennent pas de pigment respiratoire et selon Shumway (1982) la principale voie d'entrée de l'oxygène se trouve probablement sur toute la surface du corps, principalement l'épithélium des branchies et le manteau. Dans des conditions normales, la quantité d'oxygène dans l'eau de mer est supérieure à celle nécessaire pour maintenir une consommation d'oxygène constante.

Au PcO₂ où l'oxygène disponible n'est plus suffisant pour approvisionner les cellules épithéliales, c'est-à-dire que la PO₂ du milieu est inférieure ou égale à la PO₂ interne et que la diffusion n'est plus possible, l'activité ciliaire diminue, entraînant une diminution de la ventilation et la dépendance à l'oxygène se produit. Une explication possible des différences observées entre espèces d'huîtres est la différence de surfaces disponibles pour l'absorption d'oxygène entre deux groupes ; cela expliquerait la capacité de *Crassostrea* de maintenir une consommation d'oxygène constante sur une plage plus large de valeurs de PO₂. L'activité ventilatoire permet donc dans une certaine mesure de maintenir l'oxygénation des tissus (Bayne 1971, Taylor et Brand 1975a, b). Mais ce système d'adaptation trouve sa limite au PcO₂ à partir duquel les organismes ne peuvent plus maintenir leur OCR, le PcO₂ constituerait donc la limite de la capacité de régulation (Grieshaber *et al.* 1988).

Le Moullac *et al.* (2007) ont examiné les réponses de *C. gigas* aux variations d'oxygène du milieu. La première expérience visait à mesurer à 15, 20 et 25°C pendant 20 heures le CR et l'OCR des *C. gigas* entières exposées à différentes concentrations en oxygène (1.27 à 8.34 mgO2.L⁻¹; 16 à 100% de saturation en O_2) et a permis d'estimer le seuil hypoxique pour les huîtres en dessous duquel leur métabolisme se déplace vers l'anaérobiose, en estimant le PcO_2 à 3,02±0.15, 3,43 0.20 et 3,28 0.24 mg O_2 .L⁻¹ à 15, 20 et 25°C respectivement. La deuxième expérience a été réalisée pour évaluer les adaptations métaboliques à l'hypoxie

pendant 20 jours à trois températures: 12, 15 C et 20°C. Selon Le Moullac *et al.* (2007), *C. gigas* avec des valeurs élevées de PcO2, est considérée comme un faible régulateur, dans le sens où elle ne peut réguler son OCR que sur une plage limitée d'oxygène disponible dans le milieu. Dans une autre étude, Yamamoto et Handa (2011) ont cherché à déterminer les effets de l'hypoxie sur l'absorption d'oxygène chez des *C. gigas* placées dans des enceintes individuelles de mesure. La quantité d'absorption d'oxygène (ml.min⁻¹.kg⁻¹) et l'utilisation d'oxygène ont été calculées à l'aide des valeurs mesurées du volume de ventilation (l.min⁻¹.kg⁻¹) et de la pression partielle d'oxygène (mm Hg). Ils ont observé qu'à 20°C la quantité d'absorption d'oxygène est restée pratiquement au même niveau jusqu'à ce que la pression partielle d'oxygène dans l'enceinte de mesure diminue à 24,9 mm Hg.

Les effets de l'hypercapnie (forte concentration de CO_2) qui peuvent accompagner ceux de l'hypoxie ont été peu étudiés chez les huîtres. Willson et Burnett (2000) indiquent qu'une hypercapnie modérée (p $CO_2 \le 1$ mmHg) peut déjà dans une faible mesure diminuer l'absorption d'oxygène de *C. virginica* entières dans des conditions bien aérées (p O_2 = 125–145 mmHg, température = 25 °C, salinité = 25 ‰), mais que la capacité des huîtres à réguler l'absorption d'oxygène sur une large plage de PO_2 n'est pas affectée par le CO_2 modérément élevé.

Chez d'autres espèces de mollusques marins, des études semblables ont été menées sur les effets de la disponibilité en oxygène dans le milieu sur la consommation d'oxygène, qui ne seront pas détaillées dans la présente thèse consacrée à *C. gigas :* chez *O. edulis* (Galtsoff et Wipple 1930), chez *M. arenaria* (Van Dam 1935), chez *M. mercenaria* (Hopkins 1946), chez *P. grandis* et *P. irradians* (Van Dam 1954), chez *P. perna* (Bayne 1967), chez *M. demissus* (Mangnum et Winkle 1973), chez *Arctica islandica* (Taylor et Brand 1975a, b), chez *M. edulis* (Bruce 1926, Bayne 1971, Taylor et Brand 1975b, Famme 1980, Tang 2018), chez *A. purpuratus* (Aguirre-Velarde *et al.* 2016) et chez *P. viridis*, *R. decussatus* (Thomas *et al.* 2019).

pH de l'eau

Un nombre limité d'expériences ont été menées pour déterminer l'effet du pH du milieu sur la consommation d'oxygène. Chez *M. mercenaria*, Hopkins (1946) a mis en évidence une consommation d'oxygène des tissus (branchies, manteau, muscle adducteur) inférieure de 8% entre celle d'animaux placés dans un milieu à pH=8 et celle d'animaux à pH=6.8. Galtsoff (1964) a noté que le pH avait un effet prononcé sur la consommation d'oxygène de *C. virginica* adultes : un pH du milieu de 6,5 entraînait une diminution 50% de la consommation d'oxygène et un pH de 5,5 entraînait une diminution de 90% par rapport à celle mesurée à un pH de 8. Willson et Burnett (2000) émettent des hypothèses sur l'effet du pH sur *C. virginica* et en particulier sur ses tissus branchiaux. Ces derniers ralentiraient leur métabolisme en réponse à un pH bas.

Reipschläger et Pörtner (1996) suggèrent qu'au niveau cellulaire, les canaux ioniques et les protéines de transport peuvent être sensibles aux changements de pH, il peut y avoir une diminution de la demande en énergie pour la régulation du pH intracellulaire et donc une diminution du taux métabolique global des tissus. Il est probable qu'un faible pH pendant l'immersion peut jouer un rôle dans la dépression du métabolisme aérobie et induire le passage au métabolisme anaérobie (Dwyer et Burnett 1996, Reipschläger et Pörtner 1996). D'après Willson et Burnett (2000) la flexibilité de *C. virginica* pour réagir aux conditions environnementales en régulant son métabolisme aérobie en cas d'hypoxie légère et son passage au métabolisme anaérobie a contribué à sa capacité à survivre dans des conditions difficiles.

Polluants chimiques dans l'eau

Peu d'études ont été consacrées à la recherche des effets sur l'OCR des bivalves de la présence de polluants chimiques. Scott et Major (1972) ont montré que le cuivre (II) libre est toxique pour *M. edulis* et provoque une dépression respiratoire suivant une relation doseeffet.

Organismes pathogènes

Chez *C. virginica* Newell (1985) a montré que l'infection par le parasite *H. nelsoni* réduisait le CR mais n'affectait pas l'OCR de son hôte. Willson et Burnett (2000) ont mis en évidence que la consommation d'oxygène de *C. virginica* ne semble pas être affectée par une infestation à *P. marinus*. Cependant, seules des infestations légères à modérées étaient constatées dans les huîtres utilisées. Dans une autre étude, les données présentées par Gale *et al.* (1991) suggèrent que l'ectoparasite *B. impressa* ne gêne pas la respiration chez *C. virginica* à court terme.

Chez *C. gigas*, Soletchnik et al. (1998) ont étudié les impacts d'une bactérie *Chlamydia*-like sur la physiologie de l'huître creuse. Ils ont montré une corrélation négative entre la consommation d'oxygène et les anomalies branchiales induites par *Chlamydia*-like chez *C. gigas* et l'ont relié à un dysfonctionnement des branchies. Richard et al. (2017) ont noté que l'injection intramusculaire du virus OsHV-1 chez des *C. gigas* juvéniles induit une diminution de la consommation d'oxygène chez ces animaux.

Chez *R. philippinarum,* Flye-Sainte-Marie *et al.* (2007) ont noté que lors d'une infection par la bactérie *V. tapetis,* son expression clinique, la maladie de l'anneau brun pouvait avoir un impact sur le CR et l'OCR de la palourde. L'OCR diminue avec le degré de développement de la maladie et est significativement plus faible chez les palourdes avec un stade de maladie (Conchyoline Deposit stage, CDS) ≥ 5 par rapport aux animaux asymptomatiques (CDS = 0). Aucun effet évident de la maladie n'a été mis en évidence sur le temps d'activité respiratoire (RTA). Flye-Sainte-Marie *et al.* (2007) estiment que le CR étant réduit aux mêmes niveaux de CDS, cette diminution de l'OCR pourrait être interprétée comme une réduction compensatoire du taux métabolique.

2.3. Dispositif d'acquisition et détermination de valeurs de CR, OCR, FTA, RTA

Comme mentionné en partie II § 3.3, il est important de considérer les facteurs susceptibles d'interférer avec les mesures des biomarqueurs et de les réduire, de sorte à tendre vers des mesures qui reflètent effectivement les variations dues à la variabilité inter ou intraindividuelle, caractéristiques du phénomène étudié (Solberg 1988, Plebani *et al.* 2015).

Friedrichs *et al.* (2012), soulignent en particulier l'importance d'identifier les facteurs de variations pré-analytiques et analytiques et de réaliser des procédures pour standardiser les différentes étapes de la détermination d'intervalles de référence (RI) et contrôler les effets de ces facteurs.

Facteurs pré-analytiques

La préparation des individus de référence, la collecte des échantillons, leur manipulation et leur traitement doivent être effectués de manière standardisée (Solberg 1988, Gunn-Christi et al. 2012). Le type d'échantillon doit être le même pour tous les échantillons de référence. Les détails concernant les facteurs pré-analytiques doivent être inclus dans le document d'étude RI.

Les estimations de la qualité analytique doivent être consignées pour toutes les méthodes. Celles-ci peuvent être déterminées lors de l'étude de RI ou lors d'une validation préalable de la méthode, avec l'étude des variations biologiques observées, l'interprétation clinique des résultats des tests, les documents de consensus ou une combinaison de ces approches (Kenny *et al.* 1999, Kjelgaard-Hansen et Jensen 2010).

Facteurs analytiques

Les échantillons doivent être analysés à l'aide de méthodes rigoureusement surveillées et de procédures de contrôle de la qualité appropriées (Flatland *et al.* 2010). Toutefois, les variations faisant partie des opérations quotidiennes (modifications dans les lots de réactifs, personnel technique impliqué), elles doivent être considérées et intégrées à l'étude de détermination des RI chaque fois que cela est possible. Le laboratoire doit établir une règle sur la prise en compte des échantillons pour l'étude RI et le rejet des échantillons de mauvaise qualité. Les résultats doivent être surveillés en temps réel afin que les erreurs puissent être détectées lorsque la mesure est réalisée, cela évite un rejet excessif des valeurs de référence (RV) en réduisant le nombre de valeurs aberrantes potentielles. Les détails des méthodes d'analyse, y compris la marque et le modèle de l'analyseur [ou du dispositif d'acquisition], ainsi que l'origine des réactifs et du matériel de contrôle qualité, doivent être consignés (Friedrichs *et al.* 2012).

Même si l'ensemble des recommandations concernant l'identification des facteurs de variations pré-analytiques et analytiques et les contrôles de qualité appliqués par les équipes de recherche et laboratoires d'analyses médicales ne sont pas en l'état applicables aux études menées dans la présente thèse, il demeure d'intérêt de s'en inspirer et de limiter le plus possible les variations autres que celles reflétant une différence d'activité inter- ou intra-individuelle chez les huîtres creuses étudiées (tableau VI).

Tableau VI. Facteurs de variations pré-analytiques et analytiques du CR et de l'OCR chez C. gigas

Origine	Facteurs	Contrôle
Pré- analytiques	Individus de référence	Même parcours zootechnique et procédure d'acclimatation systématique des individus faisant l'objet d'une détermination de RI.
	Collecte des échantillons	Vérification du circuit hydraulique et calcul des débits d'eau systématiques en début et fin de chaque série d'acquisitions de 129 minutes.
Analytiques	Personnel	L'ensemble des expérimentations a été mené par un binôme de chercheurs formés à l'utilisation du dispositif d'acquisition (surveillance pendant la série d'acquisitions et vérification conjointe des valeurs biologiques acquises).
	Qualités intrinsèques du dispositif d'acquisition	Les fluorimètre et oxymètre sont vérifiés à chaque série d'acquisitions. La sonde de l'oxymètre est étalonnée selon les recommandations du constructeur et celle du fluorimètre ne nécessite pas d'autre étalonnage que celui réalisé par le constructeur. Leurs qualités intrinsèques sont communiquées par le constructeur et ont été vérifiées lors de pré-tests. Le matériel informatique de conversions analogiques — numériques des signaux est contrôlé à chaque série d'acquisitions et ne nécessite pas de procédure d'étalonnage, ses qualités intrinsèques sont communiqués par le constructeur.

Les animaux sont placés pendant une période d'acclimatation de huit jours dans des réservoirs remplis d'eau de mer avec une salinité ajustée à 32 ‰ et une température amenée progressivement à 22°C. L'eau de mer d'origine naturelle (estuaire de la Seudre) est préalablement filtrée à 30 μ m à l'aide d'un filtre à sable et traitée par un appareil à ultraviolets (UVC à basse pression, 6 m³.h¹¹ à 33 mJ.cm²) pour prémunir les huîtres creuses d'une éventuelle infection par des organismes pathogènes. Le phytoplancton *Isochrysis affinis galbana* (clone T-Iso) est fourni en continu à une concentration comprise entre 30 et 40 cellules μ l¹¹. Vingt-quatre heures avant les essais de détermination de valeurs de biomarqueurs, les huîtres sont placées dans de l'eau de mer filtrée avec le même traitement complété par deux filtres à poche de 10 μ m pour éliminer les débris de cellules d'algues, enfin la salinité et la température sont ajustées aux valeurs cibles de 32‰ et 22°C respectivement et la distribution de phytoplancton est interrompue.

Le dispositif d'acquisition employé dans le cadre de la présente thèse est inspiré de celui employé par Haure *et al.* (2003) et est représenté schématiquement dans la figure 8. A titre d'illustration la figure 9 est une photographie du dispositif en cours de réalisation d'acquisitions.

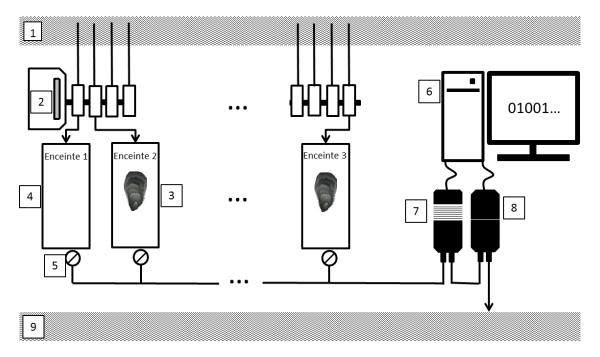


Figure 8. Schéma du dispositif d'acquisition pour la détermination de valeurs de référence de CR et d'OCR



Figure 9. Dispositif en cours de réalisation d'acquisitions pour la détermination de CR et d'OCR

Pendant les essais de suivi des biomarqueurs, le phytoplancton Isochrysis affinis. galbana (clone T-Iso) à une concentration comprise entre 30 et 40 cellules µl⁻¹ et l'eau de mer filtrée (filtres à sable et à poche et UVC) sont mélangés dans un réservoir (1), puis envoyés par quatre pompes péristaltiques (Masterflex L/S) (2) dans quinze enceintes individuelles de mesure (3) contenant chacune une seule huître, plus une enceinte de contrôle (4) sans huître. Un diffuseur d'air (sucre) est placé dans le réservoir (1) afin d'obtenir plus de 80% de saturation en air dans le circuit d'eau. Chaque enceinte de mesure d'un volume de deux litres est équipée à sa sortie d'une vanne électromagnétique (5) gérée par un ordinateur (6). Lorsque la vanne électromagnétique d'une enceinte de mesure est ouverte, l'eau libérée est analysée pendant une minute à l'aide d'un oxymètre (Hach Lange Orbisphere 410 avec sonde M1100 LDO), (7) puis d'un fluorimètre (Seapoint Chlorophyll-a Fluorometer SCF) (8). Pendant cette période, l'eau des autres enceintes est évacuée via un circuit de récupération des déchets (9). À la fin de la minute, le cycle s'achève et l'acquisition se poursuit à la suite dans une autre enceinte. Les calculs des valeurs de référence d'OCR et de CR sont effectués sur les données moyennées de concentration d'oxygène d'une part, de fluorescence de l'eau d'autre part, des cinq dernières secondes de la chambre en cours d'acquisition; les cinquante-cinq premières secondes correspondant à la vidange de l'eau de mer résiduelle de la chambre précédente encore présente dans le circuit. Ainsi, l'activité d'un individu est mesurée toutes les seize minutes avec huit acquisitions de cinq secondes pour une durée totale de cent vingt-neuf minutes. Les CR et OCR sont calculés simultanément à l'aide des formules précitées dans la partie III § 2.1 et 2.3 et stockés sur un ordinateur (6). Le débit de chaque chambre a été fixé à 13 l.h⁻¹ afin que les huîtres ne consomment pas plus de 30% des ressources en phytoplancton disponibles (Smaal et al. 1997).

3. Mettre en avant l'observation : examen physique de l'animal et proposition d'une échelle clinique

En pratique médicale, l'observation du sujet et de son environnement est essentielle dans la démarche diagnostique. Le praticien « aiguise ses sens » et réalise un examen physique du patient, à l'issu duquel un tableau clinique peut être prononcé où sont présentés les signes et les symptômes, reflets de l'état général et/ou de l'état de plusieurs fonctions physiologiques du patient. Cet examen physique est une étape, une des premières, de la démarche diagnostique en médecine humaine et vétérinaire. Il peut être complété par des examens de laboratoire, mais cela n'est pas nécessaire dans toutes les situations et dans certaines affections, l'examen de laboratoire n'est réalisé que pour asseoir, confirmer l'examen physique.

Il peut également être proposé d'établir un score clinique « Clinical Prediction Rule » (CPR) qui consiste en une combinaison de données cliniques et paracliniques dont la présence chez un individu permet d'évaluer la probabilité d'un diagnostic ou de formuler un pronostic pour une maladie donnée. Le regroupement de ces différentes données en un score peut contribuer à gagner en objectivité par rapport à la seule expérience clinique (Laporte 2014). L'utilisation des CPR est en particulier encouragée dans l'exercice de la médecine fondée sur les faits « Evidence Based Medecine » (EBM).

Ces scores sont dits prédictifs, ils améliorent la démarche diagnostique ou pronostique prédictive. Ils aident à la décision médicale, mais ne la détermine pas, il ne s'agit pas de scores décisionnels (Herzig *et al.* 2011).

Il est possible d'objecter que les atteintes de la santé chez les mollusques marins s'expriment par un tableau clinique généralement fruste avec des signes rarement pathognomoniques d'une affection donnée.

Peu d'informations sur le tableau clinique sont décrites dans le manuel des tests diagnostiques de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE 2018a), le précis des maladies infectieuses et des parasites des fruits de mer exploités dans le commerce (Bower 1994, Bower 2010) et les fiches pédagogiques sur les organismes pathogènes affectant les mollusques marins (Ifremer 2018). Le manque de signes identifiés peut également être expliqué par le fait que l'observation fine des animaux n'est réellement possible qu'en écloserie-nurserie ; sur le littoral et dans les étangs, cette observation des animaux ne peut pas être journalière du fait du mode d'élevage. Si les taux de mortalité instantané ou cumulé restent les descripteurs les plus fréquemment employés pour décrire l'impact d'une maladie chez les mollusques marins, il demeure que les éleveurs et les chercheurs en pathologie des mollusques ont déjà mentionné d'autres observations avant et pendant la survenue d'affections (« odeur », « animaux qui cloquent », « présence de vase entre les valves », « difficultés à fermer les valves » ...). De ces observations décrites, des travaux de recherche conduits à la suite ont souvent visé à « objectiver » ces observations par des protocoles expérimentaux mettant en œuvre des instruments de mesure. Mais finalement, l'expertise des praticiens médicaux développée en matière d'examen physique n'est pas très différente de celle des scientifiques qui ont su développer leurs sens que cela soit en éthologie par exemple ou dans des sciences « plus instrumentées ». Cela pose évidemment la question de la validité de données de l'observation « subjective » par rapport celles de la mesure [prétendue] « objective » (Van der Maren 2004 en pages 85 à 87 en particulier, Hunt et Lavoie 2011).

Plus proche des considérations de la présente thèse, avec des travaux de recherche mettant en œuvre des biomarqueurs, il convient de répéter un point déjà exposé en partie III § 1.1, la validation d'un biomarqueur passe par la démonstration de la pertinence clinique du biomarqueur. Aux mesures et calculs de biomarqueurs exposés en partie III § 2 et 4, il est alors possible d'ajouter un score ou une échelle clinique découlant de l'examen physique de *C. gigas* pendant les différentes expérimentations.

3.1. Elaboration et validations d'un score clinique

Elaboration d'un score clinique

A partir de données de bibliographie, d'examen physique d'un groupe échantillon de sujets, d'anamnèse, éventuellement de tests de laboratoire et d'examens para-cliniques, un certain nombre d'éléments susceptibles d'être impliqués dans la maladie considérée sont d'abord généralement testés par le biais d'une analyse univariée pour établir leur relation avec un diagnostic ou un pronostic. Une deuxième analyse multivariée est ensuite appliquée pour tester l'indépendance de leur relation avec l'issue en question. A la suite de ces deux

analyses, quelques items ou facteurs sont conservés pour le score. L'importance de chaque item est pondérée en fonction de sa relation avec l'issue considérée. Il s'agit ensuite d'attribuer une valeur, de coter les items décrivant les différentes composantes du processus étudié, puis à faire la somme des notes attribuées à chaque item afin d'obtenir un score global (Laporte 2014).

Validation d'un score clinique

La validation interne consiste à déterminer les qualités du score lorsqu'il est appliqué à un groupe échantillon. Elle comporte deux aspects :

- la **discrimination** d'un score est sa capacité à séparer les sujets qui présentent ou non la maladie pour un score diagnostique, les sujets à risque d'événement pour un score de risque ou pronostique. La discrimination s'évalue graphiquement par la courbe ROC et quantitativement par la statistique c,
- la **calibration** permet de chiffrer dans quelle mesure le risque prédit par le score correspond au risque réel. Pour cela le nombre d'événements prédits et le nombre d'événements réellement observés sont comparés. La calibration s'évalue graphiquement et par le test d'Hosmer–Lemeshow.

La validation externe du score est nécessaire pour déterminer les qualités du score lorsqu'il est appliqué à un autre groupe échantillon que celui ayant permis son élaboration, un score non généralisable étant inutile. Elle comporte également deux aspects :

- la **reproductibilité** d'un score est évaluée en testant le score sur un groupe échantillon issu de la même population,
- la **transportabilité** d'un score est évaluée lorsque le score est testé sur un groupe échantillon issu d'une autre population.

Plus la validation externe d'un score clinique est démontrée dans des populations différentes, plus l'utilisateur peut être confiant dans ses qualités (Guessous et Durieux-Paillard 2010, Laporte 2014).

3.2. Proposition d'une échelle clinique pour évaluer la santé chez *C. gigas*

Caractériser la santé chez l'huître creuse *C. gigas*, par l'examen physique soulève la question de l'expression clinique d'une atteinte de la santé chez cette espèce et de manière plus générale chez les mollusques bivalves.

Quelle qu'en soit l'étiologie, l'atteinte de la santé peut être décrite par plusieurs étapes (prodrome, état, acmé, défervescence, terminaison ou résolution ou convalescence) qui se succèdent selon un mode aigu ou chronique avec des impacts sur l'état général et/ou seulement sur certaines fonctions physiologiques et sont parfois inapparentes. L'issue de ce phénomène peut être la mort ou la survie de l'animal avec ou sans séquelles.

Savoir identifier les manifestations cliniques des différentes étapes est d'intérêt à la fois sur le plan de l'acquisition de connaissances en physiopathologie et sur le plan de leurs utilisations diagnostiques et pronostiques.

L'issue fatale pourrait sembler être relativement simple à caractériser. Quand un mollusque marin est mort depuis un certain temps, les tissus mous sont rapidement dégradés dans le milieu marin.

Il est toutefois plus difficile de déterminer plus précisément la survenue de la mort : quels sont les éléments qui peuvent permettre de statuer sur la mort « clinique » de l'animal ? Ces éléments permettraient-ils de caractériser également les différentes étapes d'atteinte de la santé ?

Des observations préalables réalisées au LGPMM (Ifremer, La Tremblade) dans le cadre de reproductions de l'infection à OsHV-1 en conditions expérimentales ont permis de mettre en évidence chez certaines huîtres *C. gigas* infectées, un manteau rétracté, non déployé dans la cavité palléale, et une difficulté de l'animal à fermer ses valves pouvant même aboutir à une non fermeture de ses valves lors de la mort. Pour estimer avec précision le moment de la mort, il a été envisagé de s'appuyer sur ces observations d'examen physique en émettant comme hypothèse que la « mort clinique » pouvait être caractérisée par la perte de la motricité <u>et</u> de la sensibilité de certains organes.

En s'inspirant du concept de score diagnostique, il est proposé de développer un outil clinique standardisé pour (1) diagnostiquer les animaux à l'état de « mort clinique », (2) diagnostiquer des états intermédiaires de santé, (3) le cas échéant de pouvoir pronostiquer l'issue d'une atteinte de la santé.

Plus qu'un score clinique, l'outil clinique standardisé est une échelle qui s'appuie sur l'observation de l'animal dans une enceinte expérimentale individuelle où sont réalisés à la suite les uns des autres plusieurs tests sur l'animal entier, son manteau et sa valve supérieure, directement ou par l'intermédiaire d'une lampe torche et d'une aiguille d'acupuncture (Marco Polo Tradition) comme rapportés à la figure 10.

L'animal en activité de filtration présente des valves entrouvertes et leur fermeture est un phénomène actif impliquant le muscle adducteur et la charnière. La note finale affectée reflète l'étape pour laquelle le test en cours provoque une réaction de fermeture des valves, sachant que les tests précédents n'en ont pas occasionné. Si à l'issue de l'ensemble de ces étapes, *C. gigas* ne présente pas de réaction fermeture des valves, l'animal est considéré comme étant en « mort clinique » (figure 10).

Cette échelle a été appliquée dans l'ensemble des expérimentations présentées en partie IV § 1.4 et 2 sur les impacts d'un organisme pathogène sur les différentes populations d'étude.

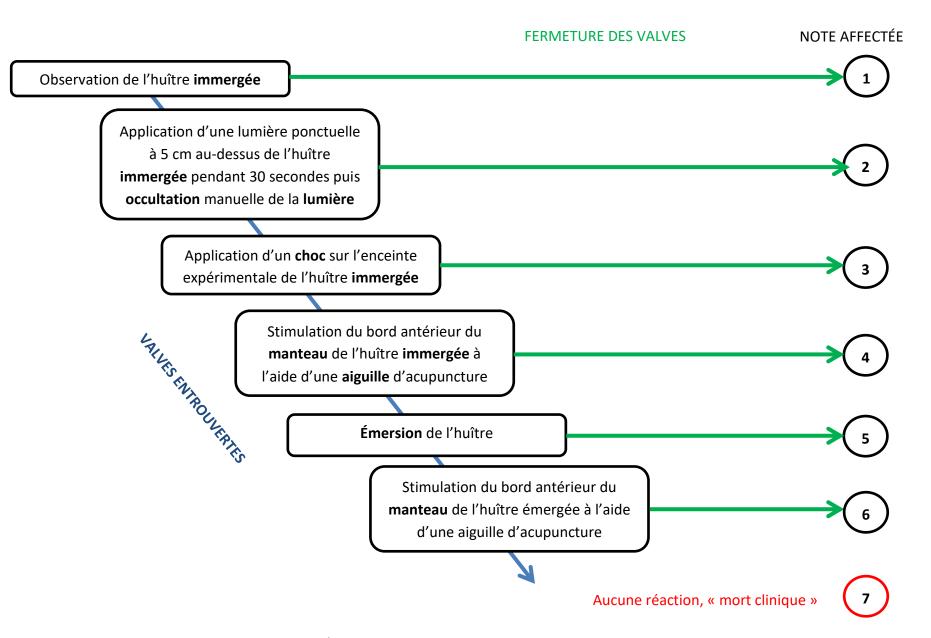


Figure 10. Échelle clinique proposée pour l'évaluation de la santé de C. gigas

4. D'autres approches en développement : estimation de la masse de chair et de la température corporelle par imagerie par résonance magnétique

En compléments des études sur le CR, l'OCR et le score clinique, un projet de recherche associant (1) le LGPMM à (2) l'équipe IRM-Food de la Plateforme rennaise d'imagerie et de spectroscopie structurale et métabolique (PRISM) de l'Irstea (3) au laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) de l'Université de La Rochelle et du CNRS a porté en 2016-2017 sur la mesure de deux autres biomarqueurs d'intérêt, la masse de chair et la température corporelle de *C. gigas*.

Le projet IMAGIGAS (IMAgerie chez *C. GIGAS*) a été déposé en réponse à l'appel à projets « incitation liée à la politique de site » de la Direction Scientifique de l'Ifremer. Il avait pour objectif général de développer la mesure *in vivo* à haut-débit, de manière non destructive et non invasive grâce à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) de caractères phénotypiques descripteurs précoces de santé chez des huîtres creuses, saines puis soumises à un stress afin d'en quantifier les effets.

4.1. Masse de chair en tant que biomarqueur de l'état général de santé

Le suivi de la masse corporelle est communément utilisé en médecine humaine et vétérinaire pour apprécier l'état général de santé de l'homme ou de l'animal considéré.

Chez les mollusques bivalves, un suivi similaire est envisageable. Toutefois, ces animaux présentant une coquille emprisonnant entre leurs deux valves une quantité d'eau variable, le suivi de la masse totale n'est pas le plus approprié et il a été décidé de s'intéresser à la masse des tissus mous. Ainsi, masse de chair fraîche et masse de chair sèche ont été suivies dans les expérimentations menées dans le projet IMAGIGAS.

De surcroît, la masse de chair sèche est un paramètre à déterminer dans le cadre de la standardisation de l'OCR et du CR pour des comparaisons de ces biomarqueurs chez des individus de masse différente (partie III § 2.1 et 2.2). L'approche la plus communément appliquée pour cette mesure est destructive. Elle requiert le sacrifice de l'animal en fin d'expérimentation, l'ouverture et le retrait des valves, puis les tissus mous sont lyophilisés et la masse de chair sèche mesurée à l'aide d'une balance de précision.

Dès lors développer une approche non destructive (ne requérant pas le sacrifice de l'animal) et la moins invasive possible (pour ne pas interférer avec la physiologie de l'animal) constitue un nouvel enjeu. La mesure de la masse de chair a déjà été investiguée dans des précédentes collaborations entre plusieurs laboratoires Ifremer (LGPMM, LPI) et l'équipe IRM-Food de l'Irstea. Le précédent protocole a été mis au point sur des lots de *C. gigas* et d'*O. edulis* relativement restreints n'excédant pas quinze individus par acquisition d'une durée de treize minutes (Hatt *et al.* 2009, Davenel *et al.* 2010, Flahauw 2013). Le faible nombre d'individus limitait cependant la puissance statistique de ce protocole et il était bénéfique de multiplier le nombre d'individus dans l'optique de réaliser à termes du phénotypage haut-débit.

Ce protocole comprend une première étape de calibration, réalisée une fois, qui fait intervenir des huîtres de calibration qui sont sacrifiées et pesées individuellement après les acquisitions d'images IRM de calibration ; cette étape permet d'établir un seuil de niveaux de gris au-delà duquel la somme des pixels d'un niveau de gris donné est corrélée linéairement avec la masse de chair. Elle est suivie par une étape proprement dite d'estimation des masses de chair (fraîche et sèche) par IRM sur les animaux d'étude (non sacrifiés) avec autant d'acquisitions que de conditions expérimentales envisagées.

Un premier objectif spécifique du projet IMAGIGAS concernait donc la mise en œuvre du haut débit sur un caractère phénotypique déjà étudié, la masse de chair. L'application du haut débit doit concerner l'ensemble des étapes de l'étude du biomarqueur masse de chair, avant, pendant et après l'acquisition des signaux IRM, ce qui requiert de (1) choisir une méthode d'identification des animaux, adaptée à de grands effectifs, assurant la traçabilité des données individuelles pendant toutes ces étapes, (2) développer un dispositif d'enceintes où sera placé un maximum d'huîtres creuses par séance d'acquisition, (3) choisir le couple temps/définition d'acquisition et autres paramètres IRM adaptés pour réaliser le plus de séances d'IRM exploitables par jour et l'intégrer dans un nouveau protocole d'acquisition, (4) développer des routines informatiques pour automatiser l'interprétation des mesures, et (5) prévoir le stockage informatique des données brutes générées et des données traitées exploitables (images hautes résolutions).

4.2. Température corporelle en tant que biomarqueur de l'état général et marqueur supposé d'inflammation locale

Chez de nombreuses espèces animales, il est possible de mettre en évidence une élévation de la température corporelle lors de réaction inflammatoire. Est-ce que ce processus existe chez les mollusques marins? Cette hyperthermie, si elle existe chez l'huître creuse, pourrait être mesurée par une cartographie thermique corporelle.

Des méthodes de thermographie via l'IRM sont fréquemment utilisées dans le domaine médical et ont pu être transposées à d'autres matrices agro-alimentaires telles que les matrices laitières ou végétales, plus inertes, avec un degré de précision proche du degré Celsius (Lucas et al. 2012, Mariette et al. 2012). Adapter un protocole de thermographie chez C. gigas et le coupler à termes à des techniques haut-débit permettraient l'exploration de nouvelles hypothèses en physiopathologie comme l'acquisition de connaissances sur certaines étapes de l'inflammation tissulaire chez C. gigas. L'approche choisie dans le projet IMAGIGAS, s'appuie sur des propriétés des protons, en particulier sur la phase du signal qui varie en fonction de la température (Gultekin et al. 2005) :

$$T - T_{ref} = \frac{(\varphi - \varphi_{ref})}{\gamma \alpha B_0 TE}$$
Constantes et grandeurs à valeurs choisies pour un rapport signal/bruit optimal

Grandeurs mesurées

un rapport signal/bruit optimal

T = température en °C Tref = température de référence en °C φ = phase du signal en rd à T $\varphi r e f$ = phase du signal en rd à T r e f

 γ = rapport gyromagnétique 267,5 10⁶ rd s⁻¹T⁻¹ B 0 = champ magn'etique (1.5 T)TE = temps d'écho en s $\alpha = -0.01 \text{ ppm/°C}$

Un second objectif spécifique du projet IMAGIGAS concernait donc la mesure de variations de la température corporelle de *C. gigas* par IRM. Cet objectif est plus « exploratoire » : quelle est la variation de température d'une huître creuse malade versus celle d'une huître saine ? Est-il possible de localiser anatomiquement ces élévations de température ? Est-ce un biomarqueur précoce d'une maladie chez l'huître creuse ?

4.3. Dispositif d'acquisition utilisé et calculs des valeurs de biomarqueurs

Il peut être utile de faire quelques rappels sur l'IRM. L'imagerie par résonance magnétique repose sur les propriétés magnétiques des molécules d'eau qui composent à plus de 80% le corps. Les molécules d'eau, plus précisément ses atomes d'hydrogène, possèdent un "moment magnétique", ou spin, qui agit comme un aimant. L'appareil IRM consiste à créer un champ magnétique puissant (B0) grâce à une bobine. Le patient est placé au centre de ce champ magnétique. Une partie des protons d'hydrogène présents dans le corpss'aligne de façon opposée au champ BO, une autre en léger excès, dans le même sens que BO, ce qui résulte en une aimentation totale non nulle. Cette aimantation a un mouvement de rotation autour de son axe dont la fréquence f0 est proportionnelle à B0. Une antenne placée sur la partie du corps étudiée (ici la tête) va permettre d'émettre et de réceptionner certaines fréquences. À l'émission, l'antenne émet un champ magnétique B1 tournant à la fréquence f0, qui par un phénomène de résonance, va faire basculer les molécules dans le plan perpendiculaire à BO. Lorsque l'antenne arrête d'émettre, les molécules « relaxent », c'est-àdire qu'elles reviennent à leur position d'origine en émettant à leur tour un signal à la fréquence f0 capté par l'antenne. Celui-ci est ensuite analysé par des logiciels afin de construire l'image. Le codage spatial du signal se fait par le biais de gradients de champs magnétique qui se superposent au champ BO, qui font ainsi varier spatialement et de façon contrôlée la fréquence f0 et permettent de localiser le signal grâce à sa fréquence. L'amplitude du signal mesuré diffère selon que les tissus observés contiennent plus ou moins d'eau. Elle dépend également de la vitesse de la relaxation régie par deux temps notés T1 et T2. Ces temps dépendent de l'environnement des molécules d'eau, ce qui permet de distinguer différents tissus. Le signal dépend également du schéma d'application du champ B1 appelé « séquence » qui permet de varier les contrastes selon l'objectif recherché. Il est à noter que la température influe sur la fréquence f0, il est alors possible avec des séquences adaptées de mesurer la température par IRM. Enfin, les protons d'hydrogènes des molécules lipidiques participent également au signal (figure 11).

L'ensemble des expérimentations a été réalisé à l'aide de l'IRM corps entier Siemens AVANTO à 1,5 Tesla de la plateforme PRISM mis à disposition par l'Irstea Rennes (figure 12). Le matériel biologique employé en 2016 est une population d'huîtres creuses produite au LPI (Ifremer, Argenton) de manière standardisée (référence NSI 01-16). Le matériel biologique employé en 2017 est une famille d'huîtres creuses (référence U1) sensibles au virus OsHV-1, produite à la PMMLT (Ifremer La Tremblade).

Les analyses et interprétations biologiques ont été réalisées en commun par les trois équipes partenaires avec la contribution d'un stagiaire de l'INSA de Rennes. Les analyses ont requis en particulier l'utilisation de différents logiciels (Image-J, Excel, Scilab 6.0) et de librairies informatiques spécifiques à ce type d'étude (librairies imlab et imlab3d développées par l'Irstea).

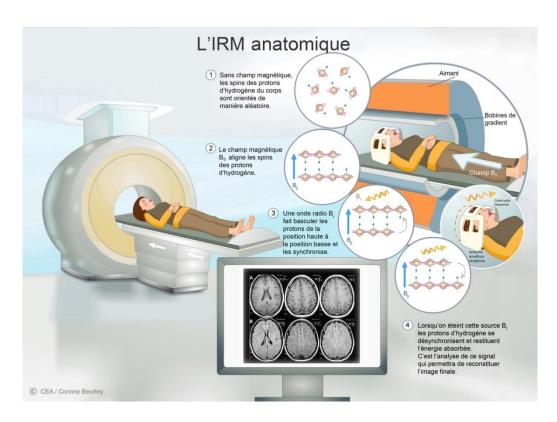


Figure 11. Principe de l'imagerie par résonance magnétique anatomique (CEA 2017)



Figure 12. Acquisition d'images IRM pour l'estimation de la masse de chair de C. gigas

5. Second enjeu : constituer des populations de *C. gigas* présumées saines

5.1. Population de référence

Le choix d'une population de référence est difficile et la démarche qui conduit à ce choix doit intégrer les contraintes liées à la disponibilité d'animaux, aux facteurs de variations biologiques, pré-analytiques et analytiques des biomarqueurs et doit s'inscrire dans l'utilisation attendue des RI.

Dans le cas de *C. gigas*, était-il envisageable de proposer une population de référence « représentative de la population d'huîtres creuses » ? Fallait-il considérer la diversité des origines et pratiques culturales (France seulement ou plusieurs pays producteurs, huîtres sauvages *versus* huîtres d'élevage issues de captage naturel ou d'écloserie) ?

Un critère de choix déterminant est toutefois identifié dans la définition même de la population de référence citée en partie II § 3.2 de la présente thèse (CLSI 2008): « la population de référence est l'ensemble des individus de référence. Les individus de référence sont les individus **« en bonne santé »** pouvant être sélectionnés pour une étude de détermination d'intervalle de référence ».

Au regard des épizooties ayant affecté les élevages et les gisements sauvages de *C. gigas* en France, en particulier celle de 2008 (REPAMO 2009, Barbosa-Solomieu *et al.* 2015) et considérant les détections récurrentes d'organismes pathogènes tels que le virus OsHV-1 et la bactérie *Vibrio aestuarianus* dans les échantillons de *C. gigas* prélevés par le réseau Repamo de surveillance de la santé des mollusques marins lors d'épisodes de mortalités de *C. gigas*, il pouvait être difficile de disposer directement d'individus « en bonne santé », au moins à l'égard du risque infectieux.

L'Ifremer dispose d'infrastructures expérimentales où la conduite d'élevages peut être réalisée à l'abri de ce risque infectieux identifié, avec la possibilité de produire des animaux présentant un patrimoine et une diversité génétique caractérisés et ayant suivi un parcours zootechnique similaire pour l'ensemble des animaux. Des informations générales sur la zootechnie en écloserie-nurserie de mollusques bivalves marins sont consultables dans Helm et al. (2004). La population employée en tant que référence est une population de deux mille naissains standardisés Ifremer (NSI) produite dans les installations expérimentales de l'Ifremer. En août 2015, quatre-vingt-quatorze reproducteurs (soixante-dix femelles et vingt-quatre mâles), originaires de gisements sauvages de *C. gigas* près de l'île d'Aix (Charente-Maritime) ont été utilisés pour produire une génération F1 de NSI nommée NSI 01-16. La fertilisation en pools, l'élevage larvaire, la fixation et les premières étapes de nurserie ont été opérés dans les installations expérimentales du LPI. Les NSI 01-16 ont ensuite été transférés en octobre 2015 à la PMMB (Ifremer, Bouin) puis en janvier juin 2016 à la PMMLT pour la détermination des RI par le LGPMM qui a été opérée à partir de janvier 2017.

Ces animaux sont maintenus dans des conditions sécurisées visant à les préserver de certains organismes pathogènes connus ; aucune mortalité ou signe de maladie n'a été observé chez les NSI 01-16 stabulés à la PMMLT de juin 2016 à janvier 2017.

5.1.1. Groupe échantillon de référence pour la détermination de RI

Pour la détermination de RI de CR et d'OCR (partie III § 2), un groupe échantillon de référence a été sélectionné au sein de la population de référence NSI 01-16.

Deux types de sélection peuvent être appliqués :

- « Dans l'échantillonnage *a priori*, les individus sont sélectionnés selon des critères prédéfinis suivis d'une collecte d'échantillons ; cette méthode est utilisée quand il y a suffisamment d'informations à propos des [variations biologiques du biomarqueur],
- Dans l'échantillonnage *a posteriori*, des échantillons sont prélevés sur des individus et des critères de sélection appliqués seulement après que les résultats sont connus ; cette méthode est généralement utilisée lorsqu'il y a peu d'informations préalables sur les [variations biologiques du biomarqueur] (Petitclerc *et al.* 1987, Friedrichs *et al.* 2011) ».

Echantillonnage a priori et critère d'inclusion / d'exclusion

Les critères de sélection des individus pour l'échantillon de référence ont été établis *a priori* (de manière prospective) afin de s'assurer que seuls les individus en bonne santé ont été sélectionnés pour l'étude (tableau VII). Le registre d'élevage et l'inspection physique des individus ont été systématiquement pris en compte pour s'assurer que les individus du groupe échantillon de référence ne présentent aucune mortalité ou signe de maladie.

Tableau VII. Critères d'inclusion et d'exclusion d'individus du groupe échantillon de référence

Critères		Inclusion	Exclusion		
Biologiques	Espèce	Crassostrea gigas.	Autres mollusques		
	Classe d'âge	Naissain à adulte.	Larves		
	Génétique	Diploïde, diversité du patrimoine génétique.	Polyploïde, consanguinité.		
	Physiologie		Stress.		
Zootechniques	Origine	Écloserie avec le même parcours zootechnique pour tous les individus de référence.	Parcours zootechnique inconnu.		
	Environnement	Eau de mer filtrée pour se prémunir contre certains organismes pathogènes connus. Température et salinité contrôlées au moins une semaine avant et pendant l'étude.	Paramètres environnementaux non contrôlés.		
	Alimentation	Alimenté uniquement avec <i>Isochrysis</i> affinis galbana (clone T-Iso) au moins une semaine avant et pendant l'étude, à l'exception d'un jour de jeûne avant l'acquisition des données.	Apports alimentaires non contrôlés.		
Médicaux	Antécédents médicaux	Pas de maladie rapportée dans les deux semaines précédentes et pendant l'étude.	Absence de registre d'élevage.		
	Diagnostic	Examen physique : aucune mortalité ou signe de maladie le jour de l'étude.	Suspicion de maladie ou maladie avérée.		
	Traitements médicamenteux	Aucun.	Traitement préventif ou curatif appliqué(s).		

Taille du groupe

Les références limites étant déterminées sur un échantillon de la population, il ne s'agit pas de vraies limites, mais de limites estimées. L'intervalle de confiance d'une limite de référence indique l'imprécision de cette estimation sur la limite considérée. Cette estimation dépend de la taille de l'échantillon. Le nombre d'individus de référence collectés dans cette étude est de deux cent quatorze, supérieur aux cent vingt individus minimum recommandés pour estimer l'intervalle de confiance de 90% pour les limites de référence à l'aide d'une analyse statistique non paramétrique (CLSI 2008).

5.1.2. Groupe échantillon pour la validation interne des RI

Un second groupe d'échantillon de NSI 01-16 (trente-huit individus, masse sèche m = 0,46 g, $\sigma = 0,32$ g, âge 520-850 j) a été testé et comparé au groupe d'échantillons de référence de janvier à décembre 2017 pour la validation des intervalles de référence.

5.2. Populations d'études

Outre la population de référence, plusieurs populations de *C. gigas* ont été produites en mars et mai 2016 à la PMMLT pour étudier les variations biologiques des biomarqueurs (CR, FTA, OCR, RTA masse de chair, température corporelle) et l'échelle clinique dans différentes conditions expérimentales détaillées dans la partie IV de la thèse.

Le plan de croisements a été établi avec l'équipe de génétique du LGPMM, en s'appuyant sur leurs travaux de recherche menés sur l'amélioration par la sélection et/ou par les modifications de la ploïdie chez *C. gigas* (en particulier Azema *et al.* 2015, 2016, 2017, Benabdelmouna et Ledu 2015, Dégremont 2011, Dégremont *et al.* 2015 a, b, c).

Les populations d'étude différent par (1) le niveau de sélection à l'égard de leur résistance accrue aux maladies infectieuses affectant *C. gigas*, l'infection à OsHV-1 et l'infection à *Vibrio aestuarianus* et (2) le niveau de ploïdie de leur génome.

La figure 13 représente le schéma type de croisements appliqués, qui ont abouti à :

- des populations d'études non sélectionnées (**U1** diploïdes, **EC** triploïdes, **I** tétraploïdes) à partir de reproducteurs non sélectionnés,
- des populations d'études sélectionnées à l'égard de leur résistance accrue à l'infection à OsHV-1 (U5 diploïdes, DA triploïdes, III tétraploïdes), à partir de reproducteurs sélectionnés également,
- une population d'étude sélectionnée à l'égard de leur résistance accrue aux infections à OsHV-1 et Vibrio aestuarianus (U6 diploïdes), à partir de reproducteurs sélectionnés également

Il est intéressant de noter que certaines populations, malgré des ploïdies différentes, ont des parents communs.

Les modalités de maturation des géniteurs, de fécondation, de conduites d'élevage larvaire et de nurserie sont celles classiquement utilisées dans les installations expérimentales de l'Ifremer de mollusques bivalves (Dégremont *et al.* 2005). Chaque reproducteur a été sacrifié, puis sexé et ses gamètes ont été collectés par scarification de la gonade pour le contrôle de la fécondation. Les fécondations ont été réalisées en égalisant la contribution des mâles pour éviter la compétition spermatique. Pour l'obtention d'huîtres tétraploïdes, le protocole appliqué s'inspire de Benabdelmouna et Ledu (2015).

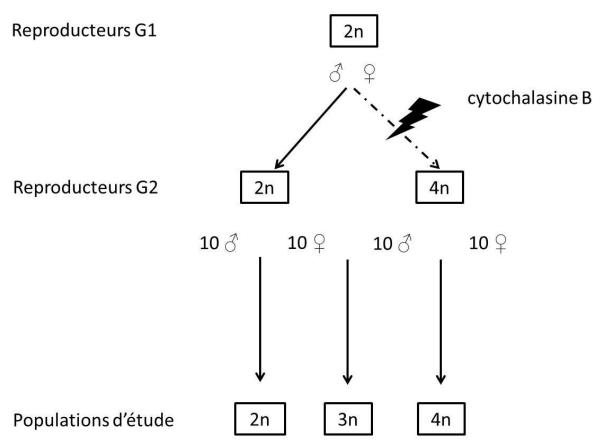


Figure 13. Schéma type de croisements pour l'obtention des populations d'étude

1. Troisième enjeu : proposition de RI du CR et de l'OCR

La détermination d'intervalles de référence des biomarqueurs de la prise alimentaire et de la consommation d'oxygène chez l'huître creuse a été réalisée pour la première fois chez cette espèce en s'appuyant sur les recommandations du CLSI (2008) et de l'AVSCP (2011).

1.1. Détermination de RI du CR et de l'OCR chez une population de référence

Cette approche de novo a reposé sur :

- une population de référence, décrite en partie III § 5.1 de la présente thèse,
- un groupe échantillon de référence où des individus de référence sont sélectionnés a priori à partir de critères d'inclusion / d'exclusion, avec un effectif de deux cent quatorze individus, supérieur aux cent vingt préconisés pour estimer l'intervalle de confiance à 90% pour les limites de référence à l'aide d'une analyse statistique non paramétrique, décrit en partie III § 5.1,
- des conditions expérimentales permettant de limiter au mieux les variations autres que celles reflétant une différence d'activité inter- ou intra-individuelle chez les huîtres creuses étudiées. Les facteurs biologiques, analytiques et pré-analytiques de variation décrits en partie III § 2.1 tableau IV, § 2.2 tableau V et § 2.3 tableau VI, ont ainsi été pris en compte dans le développement et l'utilisation du dispositif d'acquisition et la préparation des animaux, décrits en partie III § 2.3,
- l'utilisation de macro-instructions intitulé Reference Value Advisor (Geffré *et al.* 2011) pour proposer les limites des intervalles de référence avec un intervalle de confiance correspondant à 90% et générer des histogrammes de distribution.

Les intervalles de référence pour le CR et l'OCR, déterminés en conditions de laboratoire chez un échantillon de référence de *C. gigas* diploïdes issues d'écloserie expérimentale, sont résumés dans le tableau VIII et détaillés dans l'**article n°1**:

Article n°1 - François C, Haure J, Billy J-C, Renault T (2019). Towards reference intervals for shellfish: an illustration case with feeding and respiration activities in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Veterinary Clinical Pathology*, *in press*.

Tableau VIII. RI de CR et OCR d'un échantillon de référence de *C. gigas* diploïdes (masse totale humide 6,23-83,64 g, masse de chair sèche 0,06-1,87 g) nourries avec 30 à 40 cellules µl⁻¹ d'*Isochrysis affinis qalbana* (clone T-iso) et placées dans une eau de mer à la température de 22°C et à la salinité de 32 ‰

Variables	Unités	N	Médiane	Moyenne	Écart- type	Min	Max	Centile 2.5 (90% CI)	Centile 97.5 (90%CI)
CR	l h ⁻¹ g ⁻¹	214	1,9	2,1	0,8	0,5	5,5	0,7 (0,6-1,0)	4,1 (3,6-5,2)*
OCR	mg h ⁻¹ g ⁻¹	214	0,8	0,9	0,2	0,3	1,7	0,4 (0,3-0,4)	1,3 (1,3-1,5)*

CR: clearance rate standardisé avec un coefficient d'allométrie de 0,26 obtenu à partir de cette expérience; OCR: oxygen consumption rate standardisé avec un coefficient d'allométrie de 0,48 déterminé à partir de cette expérience; N: nombre d'individus de référence dans le groupe échantillon; Min: minimum; Max: maximum; CI: intervalle de confiance; * les CI de 90% des limites supérieures des RI sont plus large que celui recommandé (CLSI 2008).

- 1 Towards reference intervals for shellfish: an illustration case with
- 2 feeding and respiration activities in the Pacific cupped oyster
- 3 Crassostrea gigas

6

10

13

- 5 Cyrille François ^{1*}, Joël Haure ^{1*}, Jean-Christophe. Billy ², Tristan Renault ³
- ¹ IFREMER, RBE-SG2M-LGPMM, Station La Tremblade, Avenue Mus Loup, F-17390 La Tremblade, France
- 8 ² IFREMER, RBE-SG2M-PMMLT, Station La Tremblade, Avenue Mus Loup, F-17390 La Tremblade, France
- 9 ³ IFREMER, Département RBE, Centre Atlantique, rue de l'Ile d'Yeu, F-44000 Nantes, France
- *Corresponding authors: cyrille.francois@ifremer.fr, joel.haure@ifremer.fr (+33)246762610
- Cyrille François and Joël Haure participated equally to this work and should be considered as primary co-authors

Abstract

15

16	
17	Background
18	The Quality Assurance and Laboratory Standards Committee of the American Society for Veterinary Clinical
19	Pathology and the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute provide a framework for
20	establishing reference intervals of physiological parameters in reputedly healthy individuals, humans and
21	terrestrial animals, respectively. This framework was applied for the first time to the Pacific cupped oyster,
22	Crassostrea gigas. Reference intervals will first be of interest for research including physiopathology; their
23	determination is the first step before considering their application in the field by farmers and marine shellfish
24	health services.
25	Objectives
26	The purpose of this study was to propose reference intervals of feeding and respiration parameters, clearance and
27	oxygen consumption rates in a sample group of a reference population of hatchery-reared diploid Pacific oysters.
28	Methods
29	A de novo, a priori and direct approach was applied. The reference values acquired from 214 healthy diploid C.
30	gigas (total wet weight 6.23-83.64 g, dry flesh weight 0.06-1.87 g) were analyzed using a non-parametric
31	statistical method.
32	Results
33	Reference intervals were proposed for the clearance rate 0.7-4.1 l/h/gDW and for the oxygen consumption rate
34	0.4-1.3 mgO2/h/gDW in C. gigas in seawater at 22°C and 32% salinity, fed with 30-40 cells/µl of Isochrysis
35	affinis galbana. The confidence intervals at 90% of the upper limits of the two parameters were found to be
36	higher than CLSI recommendations.
37	Conclusions
38	Obtaining reference intervals is an important step and must be completed by the proposal of decision limits to

Key words

39

40

41

42

Bivalvia; clearance rate; health; Ostreidae; oxygen consumption rate; reference values

facilitate the early detection of health disorders in C. gigas.

1 Introduction

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

44

Mass mortality events affecting bivalves including the Pacific cupped oyster Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) have been related to infectious diseases in France and world-wide ¹. It appears of interest to develop physiopathology research activities to better understand the effects of diseases on the physiological functions of C. gigas. Among the parameters already used in ecophysiology, clearance and oxygen consumption rates are potential candidates for the first step of characterizing the physiologic behavior of healthy Pacific oysters. In healthy conditions, clearance and oxygen consumption were shown to vary according to body size and environmental conditions. Small oysters have a relatively higher physiological activity than large oysters ². Clearance rate and oxygen consumption follow a non-linear function relative to the dry flesh weight (DW) and allometry should be taken into account in order to standardize the results of physiological functions studied ³⁻⁴. Temperature 5-7, salinity 7 and the quantity or quality of suspended matter 2, 6, 8 have shown to be the main environmental factors of influence on C. gigas metabolism. Some authors showed that clearance and oxygen consumption rates also fluctuate during infections with pathogens in oysters 9-12. They could be measured simultaneously, at high flow rate with a non-invasive approach allowing the preservation of the animal's integrity 13. Thus, Barber et al. 10 showed a negative energy balance in oysters infested with parasite Haplosporidium nelsoni resulting from a decrease in the clearance rate without modification of the oxygen consumption rate. Soletchnik et al. 11 showed a positive linear relationship between gill abnormalities and filtration rate for starved and Skeletonema fed C. gigas. In populations known to be infected with Chlamydia-like organism, clearance rate estimates represent a better bioindicator for high infection level than compared to either physiological measurements (respiration, feces production) or estimates (absorption rate, scope for growth). They also showed a negative correlation between respiration and gill abnormalities induced by Chlamydia-like in C. gigas and related it to gill malfunction. Richard et al. 12 noted that injection of OsHV-1 (Oyster Herpesvirus type 1) induces a decrease in oxygen consumption in juvenile C. gigas. Another study also showed a disruption of both rates in *C. gigas* following heat stress ¹⁴. The Quality Assurance and Laboratory Standards Committee of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP-QALS) and the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were initially devoted to proposing recommendations for establishing reliable reference intervals for use in clinical laboratory medicine 15-17. This methodology will also benefit research studies in the field of physiology, by giving a rigorous framework and introducing the concept of reference intervals.

The present study proposes to apply this framework in a *de novo*, *a priori* and direct approach to establish reference intervals of clearance and oxygen consumption rates in a reference sample group of *C. gigas* (n=214, total wet weight 6.23-83.64 g, dry flesh weight 0.06-1.87 g) under reproducible laboratory conditions (seawater at 22 °C and 32‰ salinity, phytoplankton resources 30-40 cells/µl *Isochrysis affinis galbana* (clone T-Iso)).

2 Material and methods

2.1 Clearance feeding and respiration functions as variables of interest

Like most bivalves, *C. gigas* has gills that contribute to its nutritional and breathing needs. Nutritional function is approximated by clearance rate, which represents the volume of water filtered at 100% per hour and per gram of dry flesh weight (l/h/gDW). Respiration function is defined by oxygen consumption rate in 1 hour and per gram of dry flesh weight (mgO2/h/gDW).

In order to take into account the physiological variability induced by various environmental factors and also to obtain an optimal response of filtration and oxygen consumption, the reference intervals were determined:

- i) at 22 °C, which seems to be a good compromise of temperature to measure the two physiological functions. According to the models of Bougrier et al. ⁵, between 18 and 24 °C, the clearance rate of *C. gigas* would be maximal, respectively 4.8 and 4.5 l/h/gDW and the expected oxygen consumption rate would be 0.9 to 1.2 mgO2/h/gDW;
- *ii)* outside the gametogenesis period to avoid difficulties in explaining the oxygen consumption rate variations during gametogenesis as described by Soletchnik et al. ¹⁸ in *C. gigas*;
 - iii) with food of constant quality and quantity, to avoid an increase in clearance rate at low suspended particulate matter ¹⁹ or a decrease in retention efficiency at high suspended particulate matter ²⁰ in *C. gigas*;
 - iv) with constant salinity (32%). Indeed, several studies have shown variations of clearance rate ²¹⁻²² and oxygen consumption rate ^{3, 22} depending on salinity in *Crassostrea virginica*.

2.2 Reference population

The reference population used in this study consisted of supposedly healthy diploid *C. gigas* produced in IFREMER's experimental facilities. Young oysters (F1) were produced in August 2015 by cross-breeding 94 spawners (70 females and 24 males) and maintained in a secure and controlled environment until January 2017 for the study of reference intervals determination.

2.3 Selection of a reference sample group based on inclusion / exclusion criteria

The selection criteria of the reference sample group are established *a priori* in view to ensuring that only healthy individuals are selected for the study (Table 1). A questionnaire was used to evaluate the conformity of individuals to the selection criteria. Documents such as animal registry and the physical inspection of individuals were considered systematically, to ensure that no disease occurred. After the acquisition of the reference values, the lyophilized flesh of each animal was stored for diagnostic tests in the case of mortality event and/or suspicion of infectious disease.

The number of reference individuals collected (> 120) was chosen to estimate the confidence interval of 90% for the reference limits using non-parametric statistical analysis. 214 individuals were selected directly from the reference population by applying the criteria (Table 1).

2.4 Acclimation of reference individuals

Reference individuals of the reference sample group were placed for an acclimation period of 8 days to reach a salinity of 32‰ and a temperature of 22 °C in tanks filled with seawater from natural source previously filtered at 30 μ m (sand filter), then 10 μ m (bag filter) and treated by ultraviolet sterilizer (low-pressure UV, 6 m³/h, 33 mJ/cm²) to prevent infectious pathogens. The phytoplankton *Isochrysis affinis galbana* (clone T-Iso) was supplied continuously to maintain the concentration of food at between 30 and 40 cells/ μ l.

2.5. Reference values acquisition

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

128

Reference values of clearance and oxygen consumption rates were obtained using the apparatus for physiology trials presented in Figure 1. Treated seawater (sand filter and UV sterilizer) and phytoplankton Isochrysis affinis galbana (clone T-Iso) were mixed in a tank (1), then distributed by a pump (2) into fifteen chambers (3), each containing a single oyster, plus a control chamber (4) without oyster. The phytoplankton Isochrysis affinis galbana (clone T-Iso) was supplied continuously to maintain the concentration of food at between 30 and 40 cells/µl. The flow rate for each chamber was set at 13 l/h so that the oysters would not use up more than 30% of phytoplankton resources ²³. An air diffuser was placed in the tank (1) in order to have more than 80% of air saturation. Each measurement chamber (volume 2 l) was equipped with an electromagnetic valve (two-way) (5) controlled by a computer (6). When the electromagnetic valve of one measuring chamber was opened, the water released was analyzed each second for 1 minute using an oximeter (Hach Lange Orbisphere 410 with M1100 LDO probe) (7) to determine oxygen consumption, then a fluorometer (Seapoint Chlorophyll-a Fluorometer SCF) (8) to estimate the clearance rate. The fluorometer and oximeter are checked before each trial. During this period the water in the other chambers was removed via a waste circuit (9). At the end of 1 minute, the cycle was complete and was then initiated in another chamber. The reference values calculations are performed on the averaged data of the last 5 seconds of the chamber being acquired, the first 55 seconds corresponding to the flushing of the residual seawater from the previous chamber in the pipe. Thus, the activity of an animal was measured every 16 minutes over a total time of 129 minutes (8 acquisitions of 5 seconds in 129 minutes). At the end of each trial, the oyster flesh is separated from the shell. The flesh is examined for any abnormality, placed in a sampling bag and frozen at -20°C for 24 hours, then lyophilized for 48 hours and weighed to the nearest 0.01 g.

- 150 The clearance rate was calculated as follows:
- 151 Clearance rate (CR) $(l/h) = F \times [(I-O)/I]$
- where F is the flow rate (1/h) of each unit of measurement; I the fluorescence measured at the outlet of the
- control unit; O the fluorescence measured at the outlet at the experimental unit ¹³.
- 154 The oxygen consumption was calculated as follows:
- oxygen consumption rate (OCR) $(mg/h) = F \times (I-O)$
- where F is the flow rate (l/h) of each unit of measurement; I=concentration of oxygen (mg/l) at the outlet of the
- control unit; O the concentration of oxygen (mg/l) at the outlet at the experimental unit ¹³.

Clearance and oxygen consumption rates were standardized using dry flesh weight (g). Small *C. gigas* filter and consume relatively more than larger oysters ⁵. This observation may be explained by a smaller gill surface than other organs in larger animals ²⁴. In order to compare oysters of different size and weight, it is necessary to take into account the allometry according to the formula of Bayne et al. ²⁵:

 $Ys = (Ws / We)^b x Ye$

where Ys is the physiological rate of activity of a standard animal, Ws is the dry flesh weight (1g as standard), We is the dry flesh weight of the experimental animal, Ye is the biological response of an experimental animal and b is the dry weight exponent or allometric coefficient of the physiological function calculated with the dataset of our study.

2.6 Statistical tests and expression of Reference Intervals

Clearance and oxygen consumption rates data were stored in a Microsoft Excel®2010 file for further statistical tests in freeware set of macroinstructions from Reference Value Advisor ²⁶ and Systat SigmaPlot® 3.2. Reference Value Advisor was first used to propose the limits of the reference intervals with a corresponding 90% confidence interval and generate distribution histograms. The 90% CI were obtained using a non-parametric bootstrap method after verifying the symmetric distribution of transformed data by the Box-Cox technique ²⁶. The sample size was large enough to allow the use of a non-parametric statistical method. In addition to reference intervals, means, median, standard deviations were calculated for each variable and regression analyses were performed with Systat SigmaPlot® 3.2.

3 Results

3.1 Characteristics of the reference sample group

Within the reference population, 214 individuals were selected according to the previously defined inclusion and exclusion criteria (Table 1). The total wet weight ranged from 6.23 to 83.64 g. The dry flesh weight ranged from 0.06 to 1.87 g and the median value was 0.27 g dry flesh weight (Figure 2). These results demonstrate a non-

Gaussian distribution of dry flesh weight in the reference sample group with high representativeness of low weight animals since the mean value was 0.45 g dry flesh weight.

3.2 Reference values and reference Intervals

The allometric functions of clearance and oxygen consumption rates were established for a temperature of 22 °C, based on their non-linear relationship (p <0.05) with the dry weight of animals (Figure 3). The individual values were standardized using the allometric coefficients of 0.26 for clearance rate and 0.48 for oxygen consumption rate in order to calculate the reference values. Thus, the standardized mean values were 2.08 l/h/gDW for the clearance rate and 0.86 mgO2/h/gDW for the oxygen consumption rate under these experimental conditions.

The results concerning reference intervals are summarized in Table 2 and the corresponding histograms are shown in Figure 4. Both distributions were significantly different from the Gaussian (Anderson-Darling test, p < 0.05). No heterogeneity was detected by visual inspection of the histograms. Reference intervals were proposed in *C. gigas* for the first time: 0.7-4.1 l/h/gDW for the clearance rate and 0.4-1.3 mgO2/h/gDW for the oxygen consumption rate. The widths of the 90% CI of the upper limits of clearance and oxygen consumption rates in Figure 4 were wider than recommended by CLSI ¹⁵. For the clearance rate, the width of the confidence intervals for the high limit was larger than 0.2 times the width of the reference interval [(5.2-3.6) > (4.1-0.7)*0.2]. For the oxygen consumption rate, the width of the confidence interval for the high limit was larger than 0.2 times the width of the reference interval [(1.5-1.3) > (1.3-0.4)*0.2)]. The widths of the 90% CI of the lower limits of clearance and oxygen consumption rates in Figure 4 were conform to CLSI ¹⁵ document.

4 Discussion

According to Siest et al. ²⁷, the acquisition of reference values based on a robust and reproducible approach began some forty years ago, but is still evolving today. The concept first focused on human physiology and then expanded to veterinary biology without yet addressing the world of invertebrates.

This study is the first to focus on the acquisition of reference values in marine bivalves, following the recommendations of CLSI ¹⁵. The first step was to obtain an available population of healthy oysters with a

known rearing story. This is why we choose to raise a population in hatchery, which is a secure structure

compared to the natural environment.

The reference values were expressed according to the dry flesh weight and not according to the age of the animal to allow comparison with published physiological data, but also because the weight of the animal's flesh has such a pronounced effect on its metabolism that it is more consistent to present the results according to dry flesh weight ²⁸. Many authors have studied allometry to standardize physiological functions with the dry flesh weight of bivalves. In particular Shumway ³ and Gosling ⁴ summarized works on oxygen consumption and clearance rates and the allometry relations in several bivalves. In this work, it appears that the oyster C. gigas was not taken into account and we made the choice to compare our results with those of Bougrier et al. ⁵ and Akashige et al. ²⁹ obtained at the temperatures closest to this study (Table 3): i) The clearance and oxygen consumption rates calculated with the Bougrier et al. ⁵ models at 22 °C (respectively 4.7 l/h/gDW and 1.1 mgO2/h/gDW) are included in the range of reference values obtained in this study. This is also the case for the oxygen consumption rate (0.9 mgO2/h/gDW) but not for the clearance rate (8.8 l/h/gDW) calculated with the Akashige et al. ²⁹ models at 22°C. The standardized mean values for the oxygen consumption rate obtained in this study are consistent with the literature. The standardized mean values for the clearance rate are on the other hand 2 times lower than those described by Bougrier et al. 5 and 4 times lower than those described by Akashige et al. ²⁹. Several hypotheses are proposed to explain these differences. Algal cell concentrations were 7 times lower in Bougrier et al. ⁵ and 50-60 times lower in Akashige et al. ²⁹ than in our study. When the algal particles concentration is low, bivalves would increase their filtration effort to meet their energy requirement ^{19, 30} and lower the retention threshold to capture cells of smaller sizes ²⁰. In addition, Bougrier et al. 5 use a mixture of microalgae (Chaetoceros calcitrans, Isochrysis galbana) and Akashige et al. ²⁹ use only *C. calcitrans*. The cells of *C. calcitrans* are 2 to 2.5 times larger than those of *I.* galbana (3 to 5 µm) 31 and could be better captured, which could explain the differences in standardized mean values for clearance rate across studies. ii) Table 2 shows that the allometric coefficients in this study are lower than those obtained by Bougrier et al. 5 and Akashige et al. ²⁹. The choice of the reference sample can probably explain this result because this sample includes a high percentage of small animals (<0.45gDW) which shows low allometric coefficients relative for oxygen consumption and clearance rates. Given the results obtained and at this stage of the discussion, it seems important to make some recommendations for the future determination of reference values in marine bivalves: i) be sure to work with a reference sample which has an identical number of individuals per dry flesh weight class, ii) to choose a microalgae similar in size

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

246 to I. galbana and at a concentration between 30 and 40 cells /µl, iii) to use reproducible laboratory conditions 247 (seawater at 22 °C and 32% salinity, similar experimental chamber and flow rate). 248 The clearance rate looks like a covariate of the oxygen consumption rate (Figure 5). At 22 °C there is a linear 249 relation which reflects a relation in the activity of the two physiological functions in a reputedly healthy 250 population. Above 22 °C, it is likely that this relationship is no longer observed because the models of Bougrier 251 et al. ⁵ show a rapid decrease of clearance rate from 19 °C while oxygen consumption rate continues to increase 252 with temperature up to 32 °C. 253 The 90% confidence intervals at the upper limits of the two physiological functions were found to be high and 254 not in accordance with CLSI recommendations. Conventional (non-parametric) statistical methods require a 255 minimum of 120 values per analysis. In this study, 214 values were collected and, despite careful selection of the 256 study population, the confidence intervals at the upper limits were larger than 0.2 times the width of the reference interval concerned ¹⁵. As mentioned by Henny et al. ³², the reference intervals may vary according to 257 258 the sample of the population and the method of analysis. In addition, the change of species may justify non-259 compliance with the recommendations initially proposed for studies concerning human physiology. According to 260 Ghiretti ³³, mollusks are probably the invertebrates with the greatest physiological variability within the same species due to intrinsic and extrinsic factors. Geffré ³⁴ also emphasized the difficulty of defining reference 261 262 intervals in animal biology because of lack of knowledge of the breeding route, the fact that the animals are too 263 easily stressed and because of insufficient numbers of animals. Here, the animals were chosen disease-free, 264 maintained in a breeding environment kept the same from birth and studied under the same experimental 265 conditions. This is why we suppose that the confidence intervals at the limit values are inherent to the 266 physiological behavior of C. gigas and represent a result specific to the species studied. 267 Today, oyster farmers obtain young oysters, called spat, from wild seed capture or from hatcheries. Their genetic 268 characteristics can differ: spat from the wild are diploid while spat from hatcheries are either diploid or triploid, 269 resulting from the crossing of breeders than can be selected for specific phenotypic traits. Triploids are assumed 270 to be sterile and are produced in different ways, in particular by the cross-breeding of tetraploid males and diploid females in France 35-37. Triploid oysters allocate little or no energy to reproduction, have a higher growth 271 rate than diploid oysters and are marketed all year round without any gonad development, which can put 272 273 consumers off. Given the interest of oyster farmers in the breeding of these animals, the outlook for further 274 investigation points towards comparing the physiological activities of polyploid oysters to the RI determined in 275 this study.

The concept of reference values is widely used today in the medical field, provided that the reference group is rigorously sampled ³⁸. Reference intervals are helpful to describe the biological characteristics of healthy animals; however they must not be confused with decision limits ³⁹ which are related to a clinical condition ⁴⁰ and allow assessing health status ³⁸.

This study is the first and essential step in approaching the health of marine bivalves, by taking the oyster as a biological model and determining the reference intervals of its physiological functions; a further step would be to

determine decision limits in view to carrying out an accurate diagnosis of the health status of *C. gigas*. Related developments are underway and others are being considered for future application, in particular during

quarantine before introduction of oysters in a hatchery.

285

282

283

284

5 References

287

286

- 1. Barbosa-Solomieu V, Renault T, Travers M-A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific
- oyster, Crassostrea gigas. J. Invertebr. Pathol. 2015; 131: 2-10. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011.

290

- 291 2. Powell EN, Bochenek EA, Klinck JM, Hofmann EE. Influence of food quality and quantity on the growth and
- development of Crassostrea gigas larvae: a modeling approach. Aquaculture. 2002; 210(1): 89-117.
- 293 https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00891-2.

294

3. Shumway SE. Oxygen consumption in oysters: an overview. *Mar. Biol. Lett.* 1982; 3: 1-23.

296

4. Gosling E. *Bivalve Molluscs*. Gosling E: Blackwell Publishing Ltd; 2003; 4: 1-443.

298

- 5. Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquières G. Allometric relationships and effects of
- temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 1995;
- 301 134(1): 143-154. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00036-2.

- 6. Dutertre M, Beninger PG, Barillé L, Papin M, Rosa P, Barillé A-L, Haure J. Temperature and seston quantity
- and quality effects on field reproduction of farmed oysters, Crassostrea gigas, in Bourgneuf Bay, France. Aquat.
- 305 *Living Resour.* 2009; 22(3): 319-329. https://doi.org/10.1051/alr/2009042.

- 307 7. His E, Robert R, Dinet A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the
- 308 mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis and the Japanese oyster Crassostrea gigas. Mar. Biol. 1989;
- 309 100(4): 455-463. http://dx.doi.org/10.1007/BF00394822.

- 8. Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection,
- and absorption of the oyster Crassostrea gigas (Thunberg). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1997; 212(2): 149-172.
- 313 https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02756-6.

314

- 9. Newell RIE. Physiological effects of the MSX parasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber & Mackin)
- on the American oyster Crassostrea virginica (Gmelin). J. Shellfish Res. 1985; 5: 91-95.
- 317 https://www.biodiversitylibrary.org/item/18794#page/103/mode/1up.

318

- 319 10. Barber BJ, Ford SE, Littlewood DTJ. A physiological comparison of resistant and susceptible oysters
- 320 Crassostrea virginica (Gmelin) exposed to the endoparasite Haplosporidium nelsoni (Haskin, Stauber &
- 321 Mackin). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1991; 146(1): 101-112. https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90256-V.

322

- 323 11. Soletchnik P, Goulletquer P, Cochennec N, Renault T, Geairon P. Ecophysiological study on the Pacific
- 324 oyster Crassostrea gigas naturally infected by a Chlamydia-like microorganism: effect of infection level and diet
- on oyster physiological responses. *Haliotis*. 1998; 27: 1–19.

326

- 327 12. Richard M, Bourreau J, Montagnani C, Ouisse V, Gall P Le, Fortune M, Munaron D, Messiaen G, Callier
- 328 MD, Roque E. Influence of OsHV-1 oyster mortality episode on dissolved inorganic fluxes: An ex situ
- 329 experiment at the individual scale. Aquaculture. 2017; 475: 40–51.
- 330 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.026.

331

- 332 13. Haure J, Huvet A, Palvadeau H, Nourry M, Penisson C, Martin JLY, Boudry P. Feeding and respiratory time
- activities in the cupped oysters Crassostrea gigas, Crassostrea angulata and their hybrids. Aquaculture. 2003;
- 334 218(1): 539-551. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00493-3.

- 336 14. Buzin F. Optimisation des conditions hydrobiologiques pour la conservation de l'huître creuse Crassostrea
- 337 gigas en système re-circulé (Optimization of hydrobiological parameters for the storage of the oyster
- 338 Crassostrea gigas in recirculating systems). PhD Thesis, University of Nantes, France, 2011. Available at:
- 339 http://archimer.ifremer.fr/doc/00092/20350/.

- 341 15. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved
- Guidelines; document C28-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.

343

- 344 16. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP
- reference interval guidelines: determination of *de novo* reference intervals in veterinary species and other related
- 346 topics. Vet. Clin. Pathol. 2012; 41(4): 441-453. https://doi.org/10.1111/vcp.12006.

347

- 17. ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS). Guidelines for the determination
- 349 of reference intervals (RI) in veterinary species. Available at:
- 350 https://www.asvcp.org/resource/resmgr/QALS/Other_Publications/RI_Guidelines_For_ASVCP_webs.pdf.
- 351 Accessed April16, 2018.

352

- 353 18. Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Goulletquer P. Ecophysiology of maturation and spawning in
- 354 oyster (Crassostrea gigas): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at
- different maturation stages. *Aquat. Living Ressour*. 1997; 10: 177-185. https://doi.org/10.1051/alr:1997019.

356

- 357 19. Dupuy C, Vaquer A, Lam Höai T, Rougier C, Mazouni N, Lautier J, Collos Y, Le Gall S. Feeding rate of
- 358 the oyster Crassostrea gigas in a natural phytoplankton community of the Mediterranean Thau Lagoon. Mar.
- 359 *Ecol. Prog. Ser*, 2000; 205: 171-184. http://dx.doi.org/10.3354/meps205171.

360

- 361 20. Barillé L, Prou J, Héral M, Bougrier S. No influence of food quality, but ration-dependent retention
- efficiencies in the Japanese oyster Crassostrea gigas. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1993; 171: 91-106.
- 363 https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90142-B.

- 365 21. Mcfarland K, Donaghy L, Volety AK. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and
- 366 clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest
- 367 Florida. Aquat. Invasions, 2013; 8: 299-310. http://dx.doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06.

- 369 22. Casas SM, Lavaud R, La Peyre MK, Comeau LA, Filgueira R, La Peyre JF. Quantifying salinity and season
- effects on eastern oyster clearance and oxygen consumption rates. Mar. Biol, 2018; 165(90): 1-13.
- 371 https://doi.org/10.1007/s00227-018-3351-x.

372

- 373 23. Smaal AC, Widdows J. The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological
- 374 monitoring. In: Kramer KJM, ed. Biomonitoring of coastal waters and estuaries. Boca Raton, FL: CRC Press;
- **375** 1994: 247-267.

376

- 377 24. Foster-Smith RL. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal
- production for Mytilus edulis (L.), Cerastoderma edule (L.) and Venerupis pullastra (Montagu). J. Exp. Mar.
- 379 *Biol. Ecol.* 1975; 17: 1-22. https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90075-1.

380

- 381 25. Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E. Feeding and digestion by the mussel Mytilus edulis L. (Bivalvia:
- Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 1987; 111: 1-22.
- 383 http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(87)90017-7.

384

- 385 26. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of
- macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. Vet. Clin. Pathol. 2011; 40(1): 107-112.
- 387 https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00287.x.

388

- 389 27. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queralto JM, Petersen PH. The theory of reference
- 390 values: an unfinished symphony. Clin. Chem. Lab. Med. 2013; 51(1): 47-64. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-
- **391** 0682.

- 393 28. Bernard FR. Physiology and Mariculture of some Northeastern Pacific Bivalve Molluscs. Can Spec Publ
- 394 Fish. Aquat. Sci. 1984; 63: 1-24. http://publications.gc.ca/collections/collection_2016/mpo-dfo/Fs41-31-63-
- 395 eng.pdf.

- 397 29. Akashige S, Hirata Y, Takayama K, Soramoto K. Seasonal changes in oxygen consumption rates and
- 398 filtration rates of the cultured Pacific oyster Crassostrea gigas. Nippon Suisan Gakk. 2005; 71(5): 762-767.
- 399 http://dx.doi.org/10.2331/suisan.71.762.

400

- 401 30. Deslous-Paoli JM, Héral M, Goulletquer P, Boromthanarat W, Razet D, Garnier J, Prou J, Barillé L.
- 402 Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles. Oceanis. 1987; 13(3-
- 403 5): 575-579.

404

- 405 31. Robert R, His E. Growth and size frequency distribution of six marine unicellular algae in batch cultures
- used as food for larvae of bivalve molluscs. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 1985; 49(3-4): 165-173.

407

- 408 32. Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Brguljan PM, Lohmander M, Ghita I, Bernabeu Andreu FA,
- 409 Kroupis C, Sprongl L, Thelen MHM, Vanstapel FJLA, Vodnik T, Huisman W, Vaubourdolle M.
- 410 Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. Clin. Chem. Lab. Med.
- 411 2016; 54(12): 1893-1900. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0793.

412

- 413 33. Ghiretti F. Respiration. In: Wilbur KM, Yonge CM, eds. Physiology of Mollusca. New York, NY: Academic
- 414 Press; 1966; 2: 175-208.

415

- 416 34. Geffré A. Nouvelles approches de la production d'intervalles de référence de populations (New Approaches
- 417 to producing population reference intervals). PhD Thesis, University of Toulouse, France, 2011. Available at:
- 418 http://thesesups.ups-tlse.fr/1433/1/2011TOU30091.pdf.

- 420 35. Guo X, DeBrosse GA, Allen SK. All-triploid Pacific oysters (Crassostrea gigas Thunberg) produced by
- 421 mating tetraploids and diploids. Aquaculture. 1996; 142(3): 149-161. https://doi.org/10.1016/0044-
- **422** 8486(95)01243-5.

1	1

- 424 36. Piferrer F, Beaumont A, Falguiere J-C, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. Polyploid fish and shellfish:
- 425 Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment.
- 426 Aquaculture. 2009; 293(3-4): 125-156. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036.

- 428 37. Benabdelmouna A, Ledu C. Autotetraploid Pacific oysters (Crassostrea gigas) obtained using normal diploid
- 429 eggs: induction and impact on cytogenetic stability. Genome. 2015; 58(7): 333-348. https://doi.org/10.1139/gen-
- 430 2015-0014.

431

- 432 38. Petitclerc C. Normality the unreachable star? Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42(7): 698-701.
- 433 https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.119.

434

- 39. Petersen PH, Jensen EA, Brandslund I. Analytical performance, reference values and decision limits. A need
- 436 to differentiate between reference intervals and decision limits and to define analytical quality specifications.
- 437 Clin. Chem. Lab. Med. 2012; 50(5): 819–831. https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0844.

438

- 439 40. Ceriotti F. Quality specifications for the extra-analytical phase of laboratory testing: reference intervals and
- decision limits. Clin. Biochem. 2017; 50(10-11): 595-598. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.03.024.

441

6 Acknowledgements

443

442

- This research action was funded in the framework of the EU project VIVALDI (H2020 program no.678589).
- The authors wish to thank the hatchery team of the IFREMER station at La Tremblade, France. The authors
- declare that there is no conflict of interest and the consent was obtained from all participants of the study. All
- procedures performed in the study with animals met the ethical standards of the institution in accordance with
- and international guidelines.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria for the selection of reference individuals of Crassostrea gigas

Criteria		Inclusion	Exclusion
	Species	Crassostrea gigas	Others shellfish
D'.1'1	Age	Spat to adult	Larvae
Biological	Genetic	Diploid, various gene pool	Polyploid, consanguinity
	Physiology		Stress
	Origin	Hatchery with the same zootechnic history for all reference individuals	Unknown zootechnic history
Husbandry	Environment	Seawater filtered to prevent known pathogen contamination, with temperature and salinity controlled	Environmental parameters not controlled
	Feeding	Controlled food intake with one phytoplankton species identified	Food intake not controlled (seston or various phytoplankton species not identified)
	Medical history	No illness in the two weeks preceding and during the study	Lack of animal registry
Medical	Diagnostic	Physical inspection: no signs of illness during the study	Suspicion of disease
	Medication	None	Preventive or curative care

Table 2. Clearance and oxygen consumption rates reference intervals for healthy hatchery-reared Crassostrea gigas

Variables	Units	n	Median	Mean	SD	Min	Max	Centile 2.5 (90% CI)	Centile 97.5 (90% CI)	Distribution	Method
Clearance rate	l/h/gDW	214	1.9	2.1	0.8	0.5	5.5	0.7 (0.6-1.0)	4.1 (3.6-5.2)*	NG	NP
O2 consumption rate	mgO2/h/gDW	214	0.8	0.9	0.2	0.3	1.7	0.4 (0.3-0.4)	1.3 (1.3-1.5)*	NG	NP

N indicates the number of reference individuals in the sample group; SD, standard deviation; Min, minimum; Max, maximum; CI, confidence interval; *, the 90% CI of one (or more) limit is wider than recommended ¹⁵; NG, non-Gaussian distribution; NP, non-parametric.

Variables	Temperatures (°C)	n	a	b	R ²	References
Clearance rate	20	28	4.28	0.33	0.26*	Bougrier et al. 5
	20	32	4.86	0.70	0.54*	Bougrier et al. 5
	20	12	3.37	0.71	0.35*	Bougrier et al. 5
	23	13	4.51	0.42	0.35*	Bougrier et al. 5
	19.3	14	4.78	1.04	0.87**	Akashige et al. 29
	20.4	21	6.20	0.56	0.56**	Akashige et al. 29
	21.5	16	5.01	0.91	0.64**	Akashige et al. 29
	21.5	30	11.20	0.61	0.52**	Akashige et al. 29
	23.9	21	10.24	0.72	0.86**	Akashige et al. 29
	22	214	2.08	0.26	0.21*	This study
Oxygen consumption rate	20	27	0.86	0.95	0.81*	Bougrier et al. 5
	20	35	0.85	0.61	0.66*	Bougrier et al. 5
	20	22	1.08	0.81	0.76*	Bougrier et al. 5
	23	23	1.12	0.58	0.68*	Bougrier et al. 5
	18.6	25	0.62	0.73	0.90**	Akashige et al. 29
	21.5	27	0.89	0.84	0.73**	Akashige et al. 29
	22	30	1.02	0.62	0.48**	Akashige et al. ²⁹
	22	214	0.86	0.48	0.57*	This study

N indicates the number of individuals in the sample group; a, slope; b, allometric coefficient; R^2 , determination coefficient; * significant (p<0.05) ANOVA, ** significant (p<0.01) ANOVA.

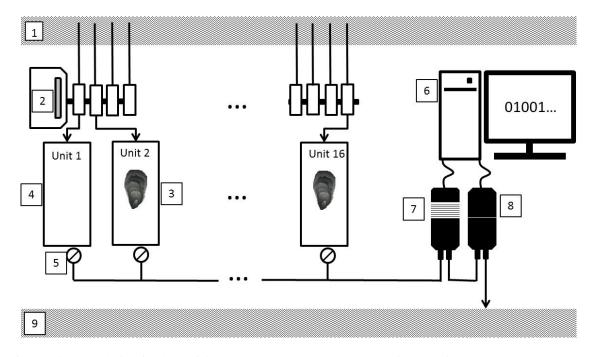
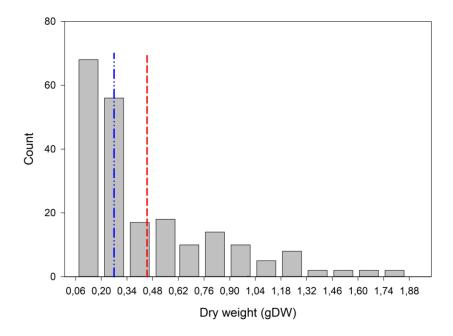


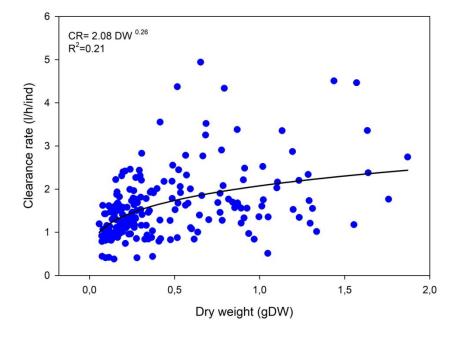
Figure 1. Experimental design for determining clearance and oxygen consumption rates in *Crassostrea gigas*1: intake of treated seawater and phytoplankton; 2: pump for inlet adjustment; 3: measurement chamber; 4: control unit; 5: outlet valve control; 6: computer; 7: oxygen probe; 8: fluorometer; 9: waste circuit.



reference sample group

The blue vertical line (dash-dot- dot) represents the median and the red vertical line (short dash) the mean of dry flesh weights.

Figure 2. Frequency distribution of dry flesh weight of the 214 healthy hatchery-reared Crassostrea gigas of the



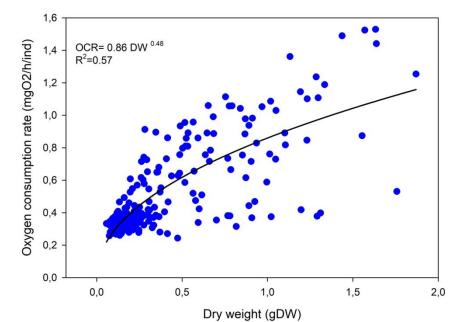
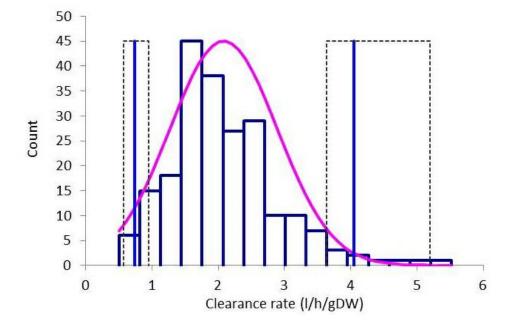


Figure 3. Distribution of individual clearance (a) and oxygen consumption (b) rates for 214 healthy hatchery-reared *Crassostrea gigas*



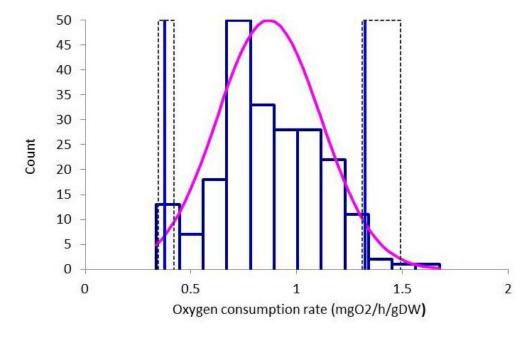


Figure 4. Observed (blue boxes) and fitted (pink line) distributions of clearance (a) and oxygen consumption (b) rates for 214 healthy hatchery-reared *Crassostrea gigas*

The blue vertical lines are the limits of the reference interval with the corresponding 90% confidence intervals as dotted lines.

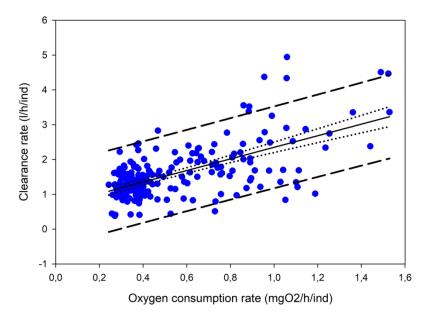


Figure 5. Clearance and oxygen consumption rates covariates in Crassostrea gigas

The solid line represents the linear regression line with the corresponding 95% confidence intervals as dotted lines; the short dashed lines represent the prediction limits. n=214; p<0.001, $R^2=040$.

1.2. Validation des RI du CR et de l'OCR

A partir d'un nouvel échantillon de trente-huit individus de la population de référence mentionné en partie III § 5.1.2, vingt-quatre individus NSI (masse de chair sèche 0,06-1,22 g), actifs aussi bien en termes de filtration et de consommation d'oxygène, ont été retenus pour initier une démarche de validation **interne** des RI. Les premiers résultats sont exposés dans le tableau IX. Dans cet échantillon, un individu a présenté une valeur de CR (5,9 l. h⁻¹. g⁻1) en dehors des RI de CR et un autre individu a présenté une valeur d'OCR (0,1 mg h⁻¹. g⁻1) en dehors des RI d'OCR.

<u>Tableau IX. Comparaison des valeurs moyennes sur deux heures de CR et d'OCR chez les échantillons de référence et de validation interne à la température de 22°C et à la salinité de 32 %</u>

	N	Médiane	Moyenne	Écart- type	Min	Max	Centile 2.5 (90% CI)	Centile 97.5 (90%CI)
CR (I h⁻¹ g⁻¹) (allométrie : 0,26)		1	1		.	l	,	, ,
Echantillon de référence NSI 2n	214	1,9	2,1	0,8	0,5	5,5	0,7 (0,6-1,0)	4,1 (3,6-5,2)
Validation interne NSI 2n	24	2,6	2,8	1,3	1,0	5,9		
OCR (mg h ⁻¹ g ⁻¹) (allométrie : 0,48)								
Echantillon de référence NSI 2n	214	0,8	0,9	0,2	0,3	1,7	0,4 (0,3-0,4)	1,3 (1,3-1,5)
Validation interne NSI 2n	24	1,0	0,9	0,3	0,1	1,3		

La validation **externe** des RI pour la transportabilité (transference en anglais) entre un laboratoire donneur de RI et un laboratoire receveur qui souhaite employer ces RI est expliquée dans le document EP28-A3c du CLSI (2008). La procédure de validation [**externe**] de RI peut être fondée sur un jugement subjectif du laboratoire receveur ou, de préférence, sur une procédure utilisant un petit nombre d'individus de référence. Cette dernière approche consiste à mesurer la variable dans les échantillons provenant de vingt individus de référence du laboratoire receveur. Une fois les valeurs aberrantes éliminées, si toutes les valeurs sauf deux se trouvent dans les limites de référence, l'intervalle de référence peut être validé. Si trois à quatre valeurs se situent en dehors de l'intervalle de référence, un autre ensemble d'échantillons de validation de vingt individus de référence doit être testé. Si toutes les valeurs sauf deux de ce nouvel ensemble d'échantillons de validation se situent dans les limites de référence, l'intervalle de référence peut être validé. Lorsque plus de quatre valeurs sont en dehors des limites de référence, l'intervalle de référence doit être déterminé de novo conformément aux recommandations (CLSI 2008, Geffré *et al.* 2009, Geffré *et al.* 2011b).

La validation externe des RI du CR et de l'OCR n'a pas été réalisée lors de la présente thèse ; des expérimentations pour une validation externe des RI et des compléments d'analyses de résultats de validation interne sont envisagés en perspectives dans la partie V § 2.

1.3. Valeurs observées de CR, OCR, FTA, RTA, NNP chez des populations d'étude d'huîtres creuses de niveaux de sélection et de ploïdies différents

Les RI sont établis par définition chez un échantillon d'une population de référence et ne sont pas transposables tels quels dans une autre population. Néanmoins, les animaux des populations d'étude décrites en partie III § 5.2 ayant eu un parcours zootechnique identique et la technique d'acquisition des valeurs de biomarqueurs étant la même, une comparaison des valeurs observées de CR et d'OCR entre populations d'étude peut être opérée.

Des échantillons de populations d'étude ont été employés dans des essais durant lesquels des valeurs de biomarqueurs ont été acquises avant et pendant une maladie infectieuse induite expérimentalement. En particulier, chez les populations d'étude non sélectionnées (U1 diploïdes, EC triploïdes et I tétraploïdes) et sélectionnées à l'égard de leur résistance accrue vis-à-vis de l'infection à OsHV-1 (U5 diploïdes, DA triploïdes et III tétraploïdes), les valeurs observées de biomarqueurs pendant deux heures d'acquisition chez les animaux présumés sains avant transmission expérimentale de l'infection à OsHV-1, ont été considérés pour deux analyses complémentaires de résultats.

Une première analyse a consisté à comparer ces valeurs observées de CR et d'OCR dans les échantillons des six populations d'étude (tableau X) Les animaux échantillonnés étaient actifs aussi bien en termes de filtration et de consommation d'oxygène.

<u>Tableau X. Comparaison de valeurs moyennes sur deux heures de CR et d'OCR chez les échantillons de populations d'étude à la température de 22°C et à la salinité de 32 %</u>

	N	Médiane	Moyenne	Écart-	Min	Max
				type		
CR (I h ⁻¹ g ⁻¹)						
(allométrie : 0,44						
Bougrier et al. 1995)						
U1 2n non sélectionnés	20	4,3	4,8	2,5	1,4	8,7
U5 2n sélectionnés	20	6,3	5,6	2,2	1,5	8,3
EC 3n non sélectionnés	20	4,9	4,4	2,3	0,7	8,6
DA 3n sélectionnés	20	4,0	4,5	2,3	0,8	9,0
I 4n non sélectionnés	20	2,9	3,2	1,5	0,9	6,6
III 4n sélectionnés	20	2,6	3,1	1,7	1,5	7,8
,1 -1,						

OCR (mg h⁻¹ g⁻¹) (allométrie: 0,8 Bougrier *et al.* 1995)

U1 2n non sélectionnés	20	1,6	1,5	0,6	0,2	3,1
U5 2n sélectionnés	20	1,7	1,9	0,6	1,2	2,9
EC 3n non sélectionnés	20	1,4	1,5	0,7	0,0	2,8
DA 3n sélectionnés	20	1,3	1,5	0,9	0,1	3,2
I 4n non sélectionnés	20	1,3	1,3	0,4	0,6	2,1
III 4n sélectionnés	20	1,5	1,5	0,6	0,8	2,9

Masses de chair sèche :

U1(0.05-1.04 g); U5(0.14-0.43 g); EC(0.10-1.54 g); DA(0.05-1.83 g); U(0.13-2.27 g); U(0.14-1.29 g).

Une deuxième analyse des résultats a consisté en une étude statistique des effets de deux facteurs (niveau de sélection à l'égard d'une résistance accrue à l'infection à OsHV-1, ploïdie) sur les valeurs de biomarqueurs à l'aide d'analyses des variances (ANOVA).

Cette étude statistique a d'abord porté sur les valeurs de biomarqueurs CR, OCR, FTA et RTA. Au cours de cette analyse, il est apparu intéressant d'introduire un nouveau biomarqueur pour interpréter les premiers résultats de cette analyse et lui appliquer également une ANOVA. L'énergie de maintien d'une huître creuse (No Net Production NNP) évoquée par Bougrier et al. (1995) peut être définie comme « l'énergie qu'il faut apporter à l'animal pour qu'il maintienne son état physiologique (anabolisme = catabolisme) en l'absence de production de pseudofèces, à une température donnée».

Dans l'hypothèse où l'huître ne produit pas de pseudofèces, l'énergie ingérée (I) est obtenue en multipliant le CR de l'huître par l'énergie (E) portée par la particule alimentaire :

(1)
$$I(j.h^{-1}) = CR(l.h^{-1}) * E(j.l^{-1})$$

Selon Bougrier *et al.* (1995), citant Thompson et Bayne (1974) et Winter (1978), l'énergie assimilée (A) représente 80% de l'énergie ingérée chez *C. gigas* :

(2)
$$\mathbf{A}(j.h^{-1}) = 0.8* \mathbf{I}(j.h^{-1})$$

Par ailleurs, la perte d'énergie par les tissus correspondant à la respiration peut être exprimée par l'OCR de l'huître (mg/h), exprimé en énergie (l'énergie de 1 mg d'oxygène est de 14,1 j).

(3) OCR
$$(j.h^{-1}) = OCR (mg.h^{-1}) * 14.1 (j.mg^{-1})$$

Pour que l'anabolisme et le catabolisme soient égaux :

(4)
$$0.8*I (j.h^{-1}) = OCR (j.h^{-1})$$

En développant la formule et en considérant les taux d'activités FTA et RTA : $0.8*CR (l.h^{-1}) * E (j.l^{-1}) * FTA (\%) = 14.1 (j.mg^{-1}) * OCR (mg.h^{-1}) * RTA (\%)$

L'énergie nécessaire qu'il faut apporter à l'animal pour qu'il maintienne son état physiologique (anabolisme=catabolisme) en l'absence de production de pseudofèces, à une température donnée est obtenue par :

La NNP est obtenue en se plaçant dans les conditions décrites dans la figure 14.

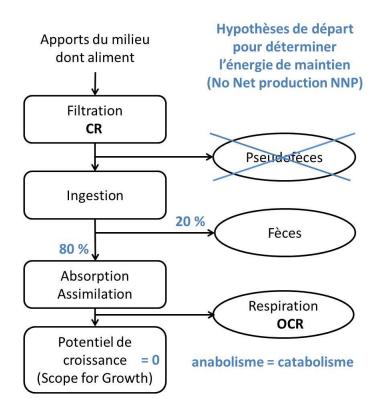


Figure 14. Hypothèses pour la détermination de l'énergie de maintien (No Net Production NNP) (adapté de Haure et al. 2003b)

L'ANOVA à deux facteurs (tableau XI) a été réalisée à partir d'échantillons de vingt individus de chacune des six familles. Au seuil de 5%, il existe une différence **très hautement significative** de la variable **CR** selon la **ploïdie** des huîtres creuses échantillonnées ; il existe également une différence **hautement significative** de la variable **NNP** en fonction de la **ploïdie** des huîtres creuses échantillonnées. Pour l'ensemble des autres couples « variable*source de variation », la différence n'est pas significative au seuil de 5%.

<u>Tableau XI. Analyse de variances à deux facteurs (niveau de sélection, ploïdie) pour les biomarqueurs étudiés</u>
<u>sur des échantillons (n=20) de six populations d'étude</u>

		-	standard h ⁻¹ g ⁻¹)		standard ng h ⁻¹ g ⁻¹)		FTA (%)		RTA (%)		INP j l ⁻¹)
Source de variation	DF	F test	p-value	F test	p-value	F test	p-value	F test	p-value	F test	p-value
Sélection	1	0,46	0,499	2,794	0,097	0,046	0,831	3,059	0,083	0,046	0,83
Ploïdie Sélection x	2	9,598	<0,001	2,016	0,138	0,375	0,688	1,612	0,204	3,913	0,023
Ploïdie	2	0,429	0,652	0,857	0,427	0,024	0,976	2,278	0,107	0,717	0,49

CR standard : clearance rate avec un coefficient d'allométrie de 0,44 ; OCR : oxygen consumption rate avec un coefficient d'allométrie de 0,8 ; FTA : feeding time activity ; RTA : respiration time activity ; NNP no net production.

En particulier, pour chaque couple « variable*niveau de sélection » la différence n'est pas significative au seuil de 5% chez les huîtres échantillonnées. Par conséquent, les échantillons ont été regroupés par niveaux de ploïdie, constituant trois nouveaux échantillons de quarante individus par ploïdie et une seconde ANOVA à un facteur (ploïdie) a été réalisée (tableau XII).

<u>Tableau XII. Analyse de variances à un facteur (ploïdie) pour les biomarqueurs étudiés sur des échantillons</u> (n=40) d'huîtres creuses diploïdes (2n), triploïdes (3n), tétraploïdes (4n)

Biomarqueurs	Ploïdie	Nombre	Moyenne (écart-type)	<i>F</i> -test	<i>p</i> -value	SNK
·			, , ,	7 (65)	p value	Sitio
CR standard	2n	40	5,18 (2,35)			Α
(I h ⁻¹ g ⁻¹)	3n	40	4,44 (2,30)	9,74	<0,001	Α
	4n	40	3,13 (1,56)			В
OCR standard	2n	40	1,71 (0,61)			
(mg h ⁻¹ g ⁻¹)	3n	40	1,54 (0,79)	1,99	0,141	NS
	4n	40	1,42 (0,49)			
FTA	2n	40	89,0 (17,4)			
(%)	3n	40	85,2 (23,7)	0,39	0,682	NS
	4n	40	85,7 (22,4)			
RTA	2n	40	70,3 (27,3)			
(%)	3n	40	78,6 (28,1)	1,55	0,216	NS
	4n	40	79,8 (23,6)			
NNP	2n	40	6,07 (5,9)			В
(j l ⁻¹)	3n	40	6,56 (4,59)	3,97	0,022	В
	4n	40	9,2 (5,48)			Α

SNK: Student-Newman-Keuls, NS: non significatif.

Au seuil de 5%, il existe une différence **très hautement significative** de la variable **CR** selon la **ploïdie** des huîtres creuses échantillonnées; les huîtres diploïdes et triploïdes échantillonnées considérées dans cette ANOVA constituent un groupe A de valeurs observées de CR supérieures à celles de CR d'un groupe B constitué des huîtres creuses tétraploïdes échantillonnées.

Au seuil de 5%, il existe également une différence **hautement significative** de la variable **NNP** en fonction de la **ploïdie** des huîtres creuses échantillonnées ; les huîtres diploïdes et triploïdes échantillonnées considérées dans cette ANOVA constituent un groupe B de valeurs observées de NNP inférieures à celles de NNP d'un groupe A constitué des huîtres creuses tétraploïdes échantillonnées.

Pour l'ensemble des autres couples « variable*ploïdie », la différence n'est pas significative au seuil de 5%.

Les essais expérimentaux permettant l'obtention des valeurs observées de CR, OCR, FTA, RTA, NNP ainsi que les analyses statistiques portant sur ces variables et leurs facteurs de variations seront exposés dans l'article n°2 qui est en cours de rédaction :

Article n°2 - Physiological comparison of Pacific cupped oyster to different levels of ploidy and selection to OsHV-1 resistance. *En cours de rédaction*.

1.4. Pertinence du choix du CR et de l'OCR en tant que biomarqueurs de santé

Les valeurs de biomarqueurs ont été acquises sur l'ensemble des populations d'étude dans deux conditions :

- « Exposées » où les animaux présumés sains font d'abord l'objet d'acquisitions pendant deux heures, puis l'eau des enceintes est changée et remplacée par de l'eau de mer contaminée à OsHV-1, ensuite les acquisitions sont reprises pour une durée totale de six jours,
- « Témoins » pendant six jours où les animaux présumés sains ne sont pas soumis à une infection.

Dans la première condition « Exposées », des huîtres creuses des populations d'étude ont été soumises à des essais de transmission expérimentale par immersion en eau de mer contaminée (EMC) à OsHV-1 selon le protocole développé au LGPMM par Morga et al. (2019 in press). Les huîtres creuses diagnostiquées en mort clinique lors de l'examen physique quotidien ont été retirées pour les jours suivants de l'expérience mais leurs valeurs de biomarqueurs ont été considérées jusqu'à la date de diagnostic de leur mort. Les valeurs moyennées de CR et d'OCR des deux premières heures avant et des deux heures après infection, ainsi que les valeurs moyennées à J1, J2, J3, J4, J5 et J6 chez les huîtres creuses survivantes et celles à l'issue fatale ont été comparées. Les résultats obtenus pour les populations non sélectionnées (U1 diploïdes, EC triploïdes, I tétraploïdes) et sélectionnées à l'égard de leur résistance accrue à l'infection à OsHV-1 (U5 diploïdes, DA triploïdes, III tétraploïdes) sont représentées dans les figures 15 à 20 et le tableau XIII. Une analyse statistique (test de Kruskal-Wallis) a été réalisée sur les valeurs de biomarqueurs observées pour tester s'il existait des différences significatives au seuil de 5% entre celles des deux premières heures avant et celles des différents temps après immersion en EMC chez les huîtres mortes au cours de l'expérience et chez les survivantes ; le cas échéant la valeur p des tests significatifs est précisée sur les figures aux temps concernés. Elle montre :

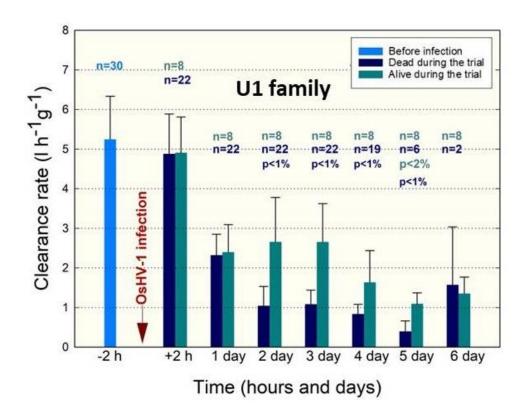
- qu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs moyennées de CR et d'OCR deux heures avant et deux heures après immersion en EMC chez les populations d'étude considérées,
- qu'il existe des différences significatives de valeurs de CR entre les deux premières heures avant et celles après infection à J2, J3, J4 chez les animaux à l'issue fatale des populations d'étude considérées. Dans certaines populations ces différences sont observables à d'autres temps: U1, EC, DA à J5; U5 à J5 et J6, I à J1, J5 et J6,
- qu'il existe des différences significatives de valeurs d'OCR entre les deux premières heures avant et celles après infection à J2, J3 chez les animaux à l'issue fatale des populations d'étude considérées. Dans certaines populations ces différences sont observables à d'autres temps : U1 et III à J4 ; U5 à J1, J4 et J5 ; EC à J4, J5 et J6 ; I à J1, J4, J5 et J6,
- qu'il n'existe pas de différences significatives de valeurs CR chez les animaux survivants entre les deux premières heures avant et celles après infection, sauf à J5 pour la population U1, J5 et J6 pour la population DA, de J1 à J6 chez les populations I et III qui semblent se comporter différemment,

qu'il n'existe pas de différences significatives de valeurs d'OCR chez les animaux survivants entre les deux premières heures avant et celles après infection sauf de J2 à J6 pour la population I et de J1 à J6 chez la population III qui semblent se comporter différemment.

<u>Tableau XIII. Synthèse des différences significatives au seuil de 5% entre les valeurs moyennées de CR et d'OCR des deux premières heures avant et celles deux heures après immersion en EMC ainsi que les valeurs moyennées à J1, J2, J3, J4, J5 et J6 chez les huîtres creuses à l'issue fatale et celles survivantes</u>

		CR		valeur <i>p</i>	OCR	
Population	Temps après immersion en EMC	Issue fatale	Survie		Issue fatale	Survie
U1	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	NS	NS		NS	NS
	J2	< 1%	NS		1%	NS
	J3	< 1%	NS		< 1%	NS
	J4	< 1%	NS		< 1%	NS
	J5	< 1%	< 2%		NS	NS
	J6	NS	NS		NS	NS
U5	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	NS	NS		5%	NS
	J2	< 1%	NS		< 1%	NS
	J3	< 1%	NS		< 1%	NS
	J4	< 1%	NS		< 1%	NS
	J5	< 1%	NS		< 3%	NS
	J6	< 2%	NS		NS	NS
EC	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	NS	NS		NS	NS
	J2	< 1%	NS		< 2%	NS
	J3	< 1%	NS		< 1%	NS
	J4	< 1%	NS		< 1%	NS
	J5	< 2%	NS		< 1%	NS
	J6	NS	NS		< 1%	NS
DA	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	NS	NS		NS	NS
	J2	< 1%	NS		< 2%	NS
	13	< 1%	NS		< 2%	NS
	J4	< 1%	NS		NS	NS
	J5	< 2%	< 2%		NS	NS
	J6	NS	< 4%		NS	NS
I	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	1%	< 2%		1%	NS
	J2	< 1%	< 1%		< 1%	< 1%
	13	< 1%	< 1%		< 1%	< 1%
	J4	< 1%	< 1%		< 1%	< 1%
	J5	< 1%	< 1%		< 1%	< 1%
	J6	1%	< 1%		1%	< 1%
III	+ deux heures	NS	NS		NS	NS
	J1	NS	< 1%		NS	< 2%
	J2	< 5%	< 1%		< 5%	< 1%
	J3	< 3%	< 1%		2%	< 1%
	J4	< 5%	< 1%		< 1%	< 1%
	J5	NS	< 1%		NS	< 1%
	J6	NS	< 1%		NS	< 1%

NS : différence non significative



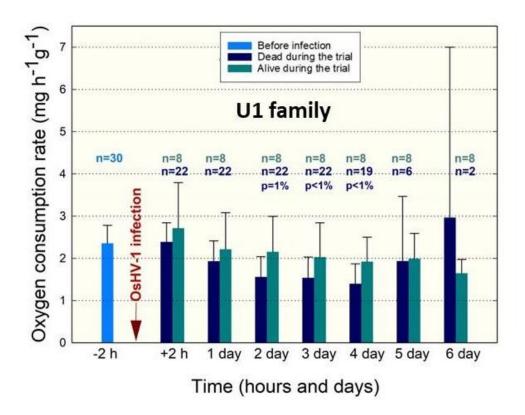
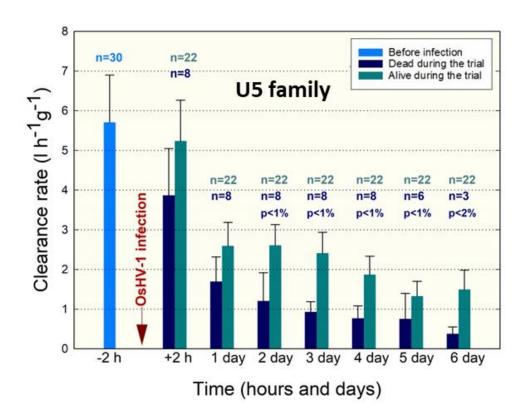


Figure 15. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. giqas* survivantes et celles à issue fatale de la population U1 diploïde non sélectionnée



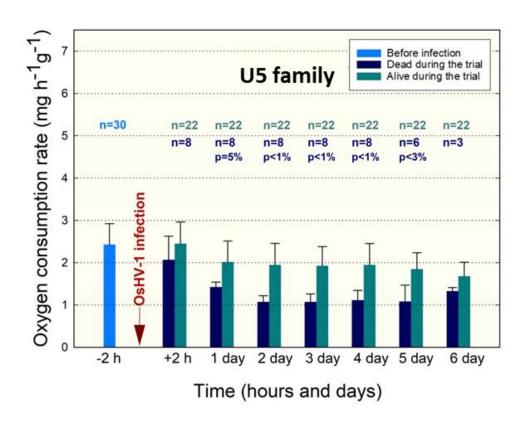
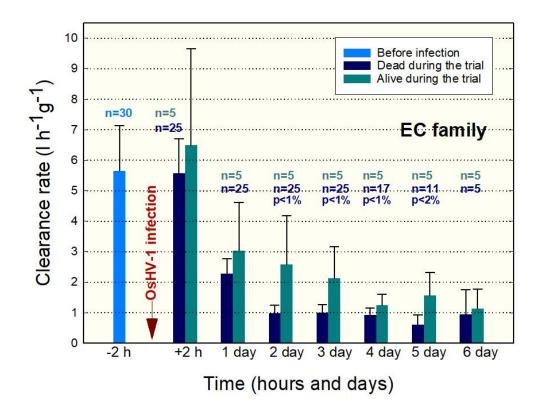


Figure 16. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. giqas* survivantes et celles à issue fatale de la population U5 diploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1



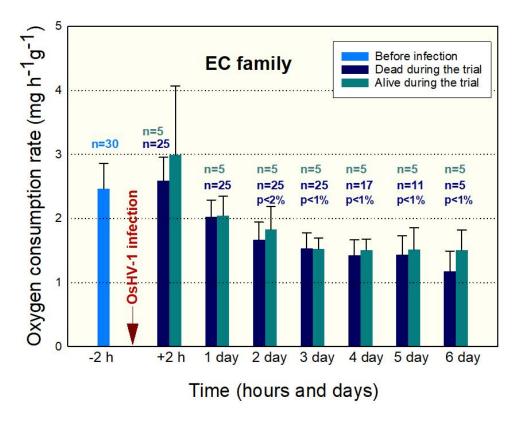
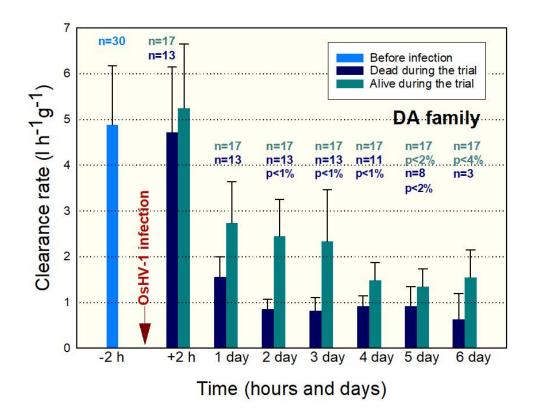


Figure 17. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population EC triploïde non sélectionnée



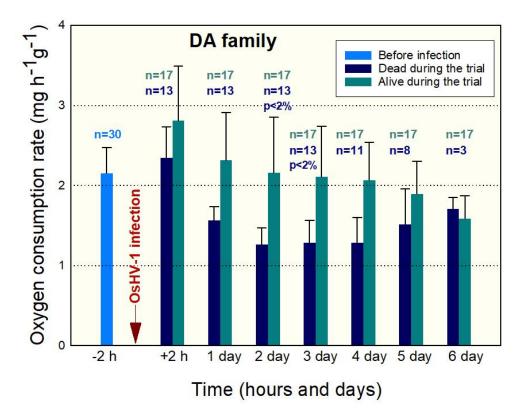
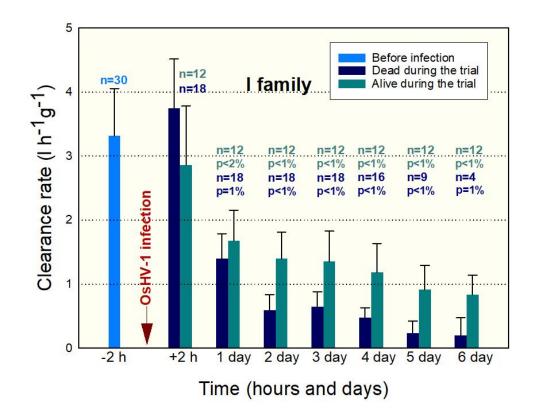


Figure 18. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. giqas* survivantes et celles à issue fatale de la population DA triploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1



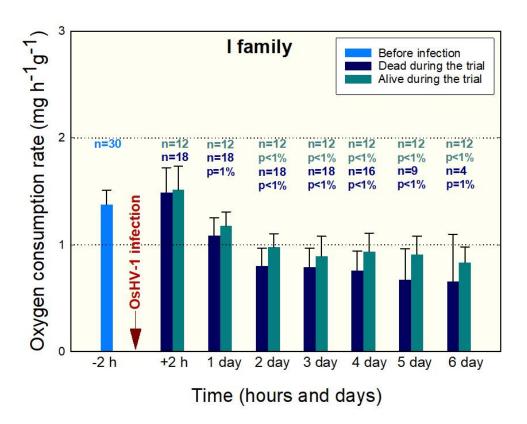
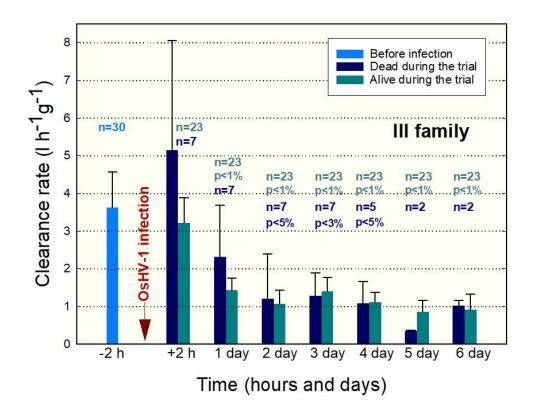


Figure 19. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population I tétraploïde non sélectionnée



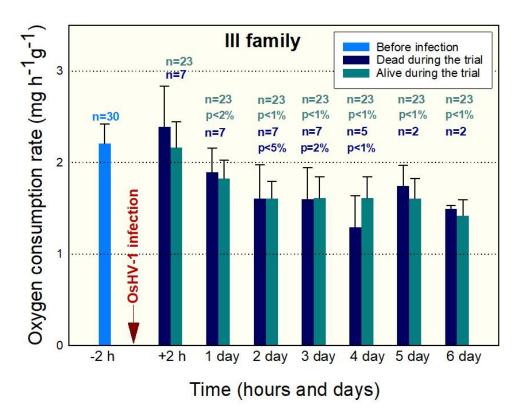


Figure 20. Valeurs moyennées de CR et d'OCR sur deux heures avant et après immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1, puis journalière de J1 à J6 chez les *C. gigas* survivantes et celles à issue fatale de la population III tétraploïde sélectionnée pour une résistance accrue à l'infection à OsHV-1

Des analyses diagnostiques ont été réalisés par le laboratoire Labofarm sur l'ensemble des animaux prélevés lors de survenue de mortalité ou/et à l'issue des six jours de suivi. L'ADN du virus OsHV-1 a été détecté chez :

- vingt-deux individus U1 à l'issue fatale et sur sept (sur huit) survivants,
- huit individus U5 à l'issue fatale et dix-huit (sur vingt-deux) survivants,
- vingt-quatre (sur vingt-cinq) individus EC à l'issue fatale, quatre (sur cinq) survivants,
- douze (sur treize) individus DA à l'issue fatale et quinze (sur dix-sept) survivants,
- dix-huit individus I à l'issue fatale et neuf (sur douze) survivants,
- sept individus III à l'issue fatale et vingt (sur vingt-trois) survivants.

Dans la seconde condition« Témoins », des animaux présumés sains des mêmes populations ont été placés dans de l'eau de mer non contaminée et ont fait l'objet d'acquisitions de valeurs de CR et d'OCR pendant six jours. Aucune mortalité n'a été observée sur ces animaux pendant les six jours d'expérimentation. Une analyse statistique (test de Kruskal-Wallis) a été réalisée sur les valeurs de biomarqueurs observées pour tester s'il existait des différences significatives entre les valeurs moyennées de CR et d'OCR des deux premières heures et celles moyennées à J1, J2, J3, J4, J5 et J6. Elle montre :

- qu'il n'existe pas de **différences significatives** entre les valeurs moyennées de **CR** sur les deux premières heures d'acquisition et celles moyennées à **J1, J2** et **J3** chez cinq échantillons de populations sur six (figure 21) mais également qu'il existe des différences significatives entre les valeurs moyennées de CR sur les deux premières heures et celles moyennées à d'autres temps de mesure pour trois échantillons de populations sur six
- qu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs moyennées d'OCR sur les deux premières heures d'acquisition et celles moyennées à J1, J2, J3, J4, J5 et J6 (figure 22),

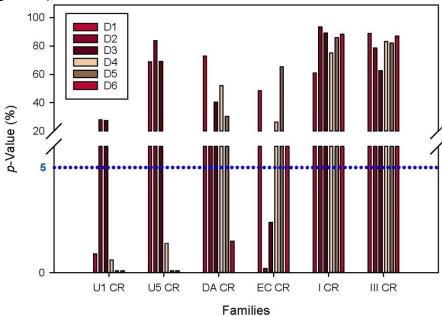


Figure 21. Absence de différence significative au seuil de 5% entre les valeurs moyennées de CR sur les deux premières heures et celles journalières de J1 à J3 chez les *C. gigas* « témoins » de 5/6 populations d'étude

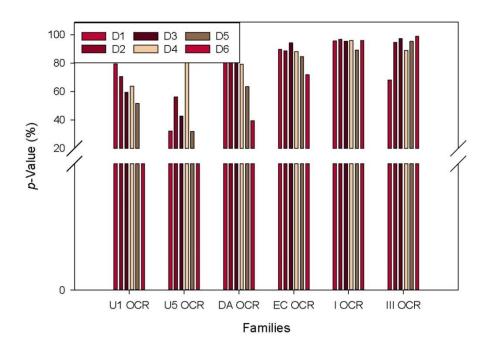


Figure 22. Absence de différence significative au seuil de 5% entre les valeurs moyennées d'OCR sur les deux premières heures et celles journalières de J1 à J6 chez les *C. gigas* « témoins » des populations d'étude

Le fait de mettre en évidence l'absence de différences significatives entre les valeurs moyennées de CR entre les deux premières heures et celles moyennées à J1, J2 et J3 chez la majorité des échantillons de populations mais également d'avoir des différences significatives avec d'autres temps de mesure pour certains échantillons de populations dans la condition « Témoins » est à tenir en compte dans l'interprétation des résultats de CR de la condition « Exposées ». Il est possible d'émettre comme hypothèse que le **CR en tant que biomarqueur de santé est pertinent** dans le dispositif expérimental employé jusqu'à J3 compris. Lors d'exposition à OsHV-1, dès **J2 et jusqu'à J3**, des différences significatives au seuil de 5% de **CR** peuvent être mises en évidence chez les individus qui vont mourir d'infection à OsHV-1 par rapport à ceux qui survivront.

Au regard des résultats des analyses statistiques sur l'OCR en conditions « Témoins » et « Exposées », le choix de l'OCR en tant que biomarqueur de santé apparaît pertinent dans le dispositif expérimental employé. Lors d'exposition à OsHV-1, dès J2 et jusqu'à J3, des différences significatives au seuil de 5% d'OCR peuvent être mises en évidence chez les individus qui vont mourir d'infection à OsHV-1 par rapport à ceux qui survivront.

2. Proposition d'une échelle clinique

L'échelle proposée en partie III § 3.2 et figure 10 a été appliquée dans l'ensemble des expérimentations présentées en partie IV § 1.4 sur les impacts d'une infection à OsHV-1 d'une part, d'une infection à *Vibrio aestuarianus* d'autre part, sur les différentes populations d'étude.

Les premiers résultats concernant l'application de l'échelle clinique lors d'infection par OsHV-1 sont exposés dans la thèse et font l'objet de l'**article n°3** en cours de rédaction.

Article 3 - Prognostic clinical scale in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1). *En cours de rédaction*.

L'étude est prospective (avec une exposition mesurée avant la survenue de l'événement étudié), s'appuyant sur un suivi longitudinal à l'échelle individuelle chez une cohorte de patients (Golberg et Zins 2012), des huîtres creuses infectées expérimentalement, chez qui les impacts cliniques de l'évolution de la maladie à OsHV-1 sont étudiés.

Le dispositif expérimental employé est celui décrit en partie III § 2.3 et figures 8 et 9, où les animaux sont placés dans des enceintes individuelles facilitant le suivi sur six jours de chaque animal à l'aide de l'échelle clinique. Le dispositif fonctionnant en circuit fermé, l'eau de mer maintenue à 22°C est véhiculée à l'ensemble des enceintes individuelles. La salinité est contrôlée quotidiennement et ajustée à 32 ‰ à l'aide d'eau distillée pour compenser les effets de l'évaporation liée au fonctionnement en circuit fermé.

Deux cent vingt-cinq huîtres creuses ont été exposées à OsHV-1 par immersion dans une eau de mer contaminée conformément au protocole de Morga et al. (2019 in press). A la suite des premiers essais de développement de l'échelle clinique, cent quatre-vingt-quinze individus exposés à OsHV-1 ont été retenus pour l'étude (treize NSI et vingt-six de chaque population U1, U5, U6, DA, EC, I et III). Au cours des six jours de suivi, quatre-vingt-sept huîtres sont mortes (tableau XIV). Des analyses diagnostiques ont été réalisés par le laboratoire Labofarm sur l'ensemble des animaux prélevés lors de survenue de mortalité ou/et à l'issue des six jours de suivi. L'ADN du virus OsHV-1 a été détecté chez cent soixante-dix-sept animaux sur cent quatre-vingt-quinze exposés (3,84E+06 copies d'ADN par mg de tissu lyophilisé en moyenne).

En complément du suivi réalisé sur les animaux exposés à OsHV-1 dans cette étude, cent cinquante animaux « Témoins » issus des mêmes familles et ayant suivi le même parcours zootechnique et disposés dans le même dispositif expérimental, mais non exposés à OsHV-1 ont également fait l'objet d'examens physiques quotidiens avec application de l'échelle clinique. Au cours des six jours de suivi aucune huître témoin n'est morte (tableau XV).

Tableau XIV. Note d'échelle affectée aux animaux exposés à OsHV-1 en fonction du temps

Note de l'échelle	10	J1	J2	13	J4	J5	16
1	110	83	50	35	30	41	42
2	85	48	37	26	21	25	19
3		50	52	47	35	29	32
4		14	49	43	30	13	8
5			5	15	9	1	1
6			2	16	20	14	6
7				13	50	72	87
	Σ= 195	195	195	195	195	195	195

Tableau XV. Note d'échelle affectée aux animaux témoins en fonction du temps

Note de l'échelle	10	J1	J2	J3	J4	J5	J6
1	72	59	66	77	81	89	87
2	71	55	41	43	44	32	21
3	7	36	42	30	25	29	42
4			1				
5							
6							
7							
	Σ= 150	150	150	150	150	150	150

L'étude des données recueillies a permis de mettre en évidence qu'il pouvait être envisagé de prédire l'issue à J6 d'un essai de transmission expérimentale, en considérant les notes affectés aux animaux lors de l'examen physique à J2 ou J3 post-infection. Afin de vérifier cette hypothèse, l'usage de l'échelle clinique pour prédire un pronostic a été évalué par une approche similaire à celle employée dans le cadre de la validation des scores cliniques (Herzig *et al.* 2011 ; Guessous et Durieux-Paillard 2010).

La discrimination d'un test est sa capacité à séparer les sujets qui présentent ou non la maladie dans le cas d'un score diagnostique, ou les sujets à risque d'évènement dans le cas d'un score de risque [pronostique] (Laporte 2014). L'expression graphique de la discrimination d'un score se fait par la courbe ROC (Receiver operating characteristic) (Tripeppi et al. 2009; Grunkemeier et Jin 2001) qui est le tracé des valeurs de la sensibilité en fonction du complément de la spécificité (= 1- spécificité). Plus le score est sensible et spécifique pour différentes valeurs seuils, plus la courbe qui relie ces points est verticale à partir de l'origine. L'expression statistique de la discrimination est la statistique c (Tripepi et al. 2010). Elle représente la probabilité que lorsqu'une paire d'individus avec et sans maladie est tirée au hasard, les individus réellement malades présentent une probabilité de maladie plus élevée que les individus non malades. La statistique c correspond globalement à l'aire sous la courbe ROC. Elle est au minimum de 0,5 (dans le cas d'une droite à 45°) et au maximum de 1 (droite verticale). Il est admis que lorsque l'aire sous la courbe est supérieure à 0,7, le score présente une bonne capacité discriminante (Couchoud et Labeeuw 2009).

Au sein des cent quatre-vingt-quinze individus exposés, un échantillon de cent soixante-dixsept animaux correspondant aux animaux avérés infectés par OsHV-1 a été employé pour réaliser la vérification de la discrimination de l'échelle clinique à J2 et à J3 (tableaux XVI et XVII, figure 23).

Tableau XVI. Spécificités et sensibilités pour les différentes notes attribuées de l'échelle à clinique à J2 et J3

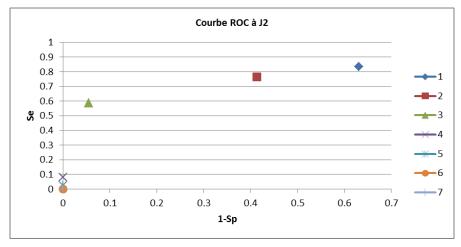
Note de	Issue fatale	Issue non
l'échelle à J2	à J6	fatale à J6
> 1	71	58
= 1 peu		
probable	14	34
> 2	65	38
≤ 2	20	54
> 3	50	5
≤ 3	35	87
> 4	7	0
≤ 4	78	92
> 5	2	0
≤ 5	83	92
> 6	0	0
≤ 6	85	92
> 7	0	0
≤ 7	85	92

Sensibilité	Spécificité
Se = $a/(a+c)$	Sp = d/(b+d)
0,84	0,37
0.76	0.50
0,76	0,59
0,59	0,95
0,08	1
0,02	1
0	1
0	1

> x	a	b
≤ x	С	d

Note de	Issue fatale	Issue non
l'échelle à J3	à J6	fatale à J6
> 1	80	64
= 1 peu		
probable	5	28
> 2	78	45
≤ 2	7	47
> 3	71	14
≤ 3	14	78
> 4	41	1
≤ 4	44	91
> 5	29	0
≤ 5	56	92
> 6	13	0
≤ 6	72	92
> 7	0	0
≤ 7	85	92

Sensibilité Se = a/(a+c)	Spécificité Sp = d/(b+d)
3c - u/(u·c/	3p = u/(b+u/
0,94	0,30
0,92	0,51
0,84	0,85
0,48	0,99
0,34	1
0,15	1
0	1



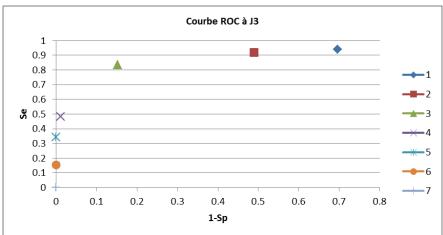


Figure 23. Courbes ROC à J2 et J3 de l'échelle clinique

Tableau XVII. Statistique c à J2 et J3 de l'échelle clinique

Statistique c = (nb de paires concordantes + [0.5*nb de paires égales])/(nb total de paires)

Note	de	Paires égales	Paires
l'échelle à .	J2		concordantes
1		476	0
2		120	204
3		495	810
4		215	3741
5		0	460
6		0	184
7		0	0

Note de	Paires égales	Paires
l'échelle à J3		concordantes
1	140	0
2	38	56
3	217	329
4	390	2340
5	12	1092
6	0	1472
7	0	1196

Statistique $C_{J2} = 0,77$

Statistique C_{J3} = **0,88**

Paire concordante : paire où l'individu à issue fatale à J6 présente un score plus élevé à J2 que celui de l'individu survivant à J6.

Paire égale : paire où l'individu à issue fatale à J6 présente un score égal à J2 celui de l'individu survivant à J6.

Chez les individus exposés avérés infectés par OsHV-1, en utilisant l'index de Youden : J= maximum {sensibilité (c)+ spécificité (c) -1} (Youden 1950, Shisterman et al. 2005), il est possible de déterminer la note seuil de l'échelle clinique au-dessus de laquelle l'issue fatale de l'infection à OsHV-1 est probable. A **J2** et **J3**, cette note seuil est **trois**; en d'autres termes, des animaux pour lesquels un examen physique à J2 ou J3 a permis d'affecter une note supérieure à trois, ont une forte probabilité de mourir à J6.

De plus, chez les individus témoins, les notes d'échelle attribuées à ces animaux non exposés expérimentalement au virus sont inférieures ou égales à trois, hormis pour un individu à J2, ce qui conforte l'hypothèse d'un seuil à trois (tableau XI).

En figure 15, l'aire sous la courbe ROC à J2 et J3 et son expression la statistique c dans le tableau IV sont supérieures à 0,7, l'échelle clinique à J2 et J3 présente une bonne capacité discriminante.

Des analyses complémentaires sur l'étude de la calibration de l'échelle clinique lors d'infection par OsHV-1 et des expérimentations complémentaires pour l'application de l'échelle clinique lors d'infection par *Vibrio aestuarianus* sont envisagées en perspectives dans la partie V § 2.

3. Estimation de la masse de chair et la température corporelle par IRM

Pour chaque objectif du projet IMAGIGAS décrit en partie III § 4, des développements méthodologiques ont été réalisés de juin à octobre 2016 et des applications pratiques de ces développements ont été ensuite conduites en avril 2017, en réalisant des acquisitions IRM sur des animaux sains, puis infectés par le virus OsHV-1.

3.1. Estimation de la masse de chair à haut débit par IRM

Le biomarqueur étudié dans l'objectif 1 est la masse de chair qui est estimée à partir de l'analyse d'images IRM constituées de pixels à un niveau de gris donné (NG).

3.1.1. Développements méthodologiques

L'application du haut débit doit concerner l'ensemble des étapes de l'étude du biomarqueur masse de chair, avant, pendant et après l'acquisition des signaux IRM, ce qui requiert de :

- (1) choisir une méthode d'identification des animaux, adaptée à de grands effectifs, assurant la traçabilité des données individuelles pendant toutes ces étapes,
- (2) développer un dispositif d'enceintes où sera placé un maximum d'huîtres creuses par séance d'acquisition,
- (3) choisir le couple temps/définition d'acquisition et autres paramètres IRM adaptés pour réaliser le plus de séances d'IRM exploitables par jour et l'intégrer dans un nouveau protocole d'acquisition,
- (4) développer des routines informatiques pour automatiser l'interprétation des mesures, et
- (5) prévoir le stockage informatique des données brutes générées et des données traitées exploitables (images hautes résolutions).

<u>Identification des animaux</u>

Des précédentes expériences réalisées dans le cadre de la thèse d'Émilie Flahauw (2013) avaient permis de tester la faisabilité d'acquisition IRM chez des huîtres *C. gigas* identifiées à l'aide d'une étiquette plastique numérotée collée avec de la résine sur la valve supérieure de leur coquille. Dans le cadre d'IMAGIGAS, une autre approche a été employée en disposant chaque huître dans un sachet minigrip 6x8 cm portant un numéro d'identification. Cette deuxième approche présente comme avantage d'empêcher l'ouverture des valves pendant la phase d'acquisition IRM et est appropriée lorsque ces acquisitions sont réalisés sur des animaux positionnés dans des un dispositif d'enceintes sans eau de mer.

Dispositif d'enceintes

Pour mesurer un grand effectif d'huîtres au sein de l'IRM, l'approche choisie a été de retirer l'antenne tête dans laquelle est généralement positionné un individu et de placer les huîtres directement dans l'antenne corps qui fait alors office d'antenne émettrice et réceptrice à la fois. Cette façon de procéder est contraire aux habitudes en IRM qui consistent à se rapprocher au maximum de l'objet d'étude pour capter le signal, mais cela a permis de disposer de plus d'espace pour placer les huîtres (figure 24).

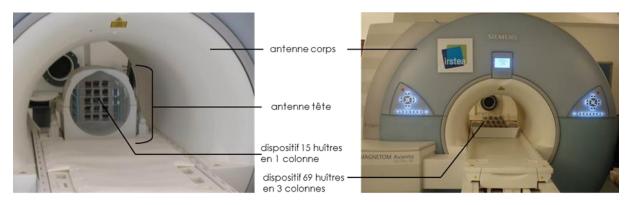


Figure 24. Estimation de la masse de chair de C. gigas avec et sans antenne tête dans l'IRM Siemens AVANTO

Le fait d'utiliser une antenne plus volumineuse peut induire deux types de perturbation des images : (1) une distorsion géométrique (figure 25), dont il est possible de se prémunir en se limitant à une zone d'acquisition correspondant au volume utile sans distorsion et (2) une variation spatiale de l'intensité du signal IRM engendrant une modification des NG des images (figure 26), corrigeable dans une certaine mesure en utilisant un « fantôme ». Un fantôme en IRM est une enceinte de mesure remplie d'un mélange d'eau distillée et de chlorure de manganèse caractérisé par un niveau de gris connu, permettant de normaliser les images.



Figure 25. Exemple de distorsion géométrique selon la position du corps mesuré dans l'IRM

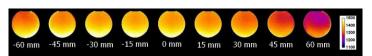


Figure 26. Exemple de variation spatiale d'intensité selon la position du corps mesuré dans l'IRM

En mai 2016, une première séance d'IRM a été consacrée à la mise au point du **dispositif d'enceintes** permettant de positionner un maximum d'animaux dans l'antenne corps de l'IRM. Cette expérience a été réalisée avec des petites boîtes remplies d'eau pour **déterminer le volume utile** de l'antenne corps, correspondant à la zone de non distorsion géométrique du signal IRM. L'équipe IRM-Food a ensuite proposé un prototype qui a été réalisé par l'entreprise PLAST'IT. Il est constitué de cinq plateaux à cases étanches en polyméthacrylate de méthyle transparent (figure 27).

En numérotant de un à cinq les plateaux de bas en haut, les plateaux de numéro impair comportent quinze cases tandis que les plateaux pairs comportent douze cases, ce qui correspond au final à : 3x15 + 2x12 soit soixante-neuf cases utilisables hors d'eau ou remplies d'eau de mer selon les conditions expérimentales.



Figure 27. Dispositif d'enceintes pour l'acquisition IRM en un passage de soixante-neuf huîtres creuses

En juin 2016, après une acquisition d'un « fantôme » dans le but de normaliser les images, trois acquisitions IRM ont été réalisées en employant le nouveau dispositif pour évaluer la faisabilité du passage à haut débit et appréhender les variations du signal d'une même huître acquise dans différentes positions du dispositif. Les animaux employés ont été sacrifiés après acquisition IRM afin d'en mesurer la masse de chair égouttée ainsi que la masse de chair sèche lyophilisée à l'aide d'une balance de précision. A partir de ces données, des seuils de corrélation entre les NG des images et ces pesées ont été établis.

Les résultats de cette expérience ont fait l'objet d'un compte-rendu d'analyses (IRSTEA 2016) où sont abordés l'effet de la position des huîtres creuses (trois positions testées), les seuils de corrélation (seuil de niveaux de gris au-delà duquel la somme, des pixels d'un niveau de gris donné était corrélé linéairement avec le poids de chair), l'effet de la normalisation, l'estimation de la masse de chair et les calculs d'erreurs.

Nouveau protocole d'acquisition

En octobre 2016, quatre acquisitions IRM employant le nouveau dispositif ont été réalisées afin d'optimiser la séquence IRM.

Les résultats de cette expérience ont fait l'objet d'un compte-rendu d'analyses (IRSTEA 2017) où sont abordés l'effet de la position des huîtres creuses (quatre positions testées) et l'effet du temps d'acquisition (une accumulation de vingt-deux minutes au lieu de deux soit quarante-cinq minutes).

Les principaux paramètres de la séquence IRM optimisée sont les suivants. Il s'agit d'une séquence Flash 3D de type écho de gradient pondérée en temps de relaxation longitudinal (T1) avec un temps de répétition (TR) = 11 ms, un temps d'écho (TE) = 2,98 ms, un champ de vue (FOV) = 480 mm, une matrice = 640, un nombre d'accumulations (Acc) = 2, une épaisseur = 1,5, un nombre de coupes = 192, une bande passante (BP)= 240 Hz / pixel (décalage eau/graisse = 0,9 pixel) et un angle de bascule (Flip) = 20°. Dans ces conditions de mesure, le pixel a une résolution de 0,75 mm² dans le plan pour une épaisseur de 1,5 mm et le temps d'acquisition est de quarante-cinq minutes pour deux accumulations.

Routines informatiques d'automatisation

De juin à septembre 2017, Paul Peyramaure, étudiant en quatrième année de l'Insa de Rennes a réalisé un stage, financé par le projet IMAGIGAS, sur le sujet « traitement d'images IRM pour la quantification de la matière sèche à haut débit chez l'huître ».

L'estimation de la masse de chair repose sur le fait qu'il est possible d'établir un seuil de niveaux de gris dans les images au-delà duquel la somme des pixels est corrélée linéairement avec la masse de chair de l'huître creuse. Jusqu'à présent, le traitement d'images au format DICOM était réalisé manuellement sous les logiciels Image-J et Excel pour un nombre réduit d'huîtres. Ce processus étant fastidieux et potentiellement source d'erreurs, il était nécessaire de l'automatiser pour pouvoir envisager d'appliquer le haut débit. L'objectif de ce stage était donc de réaliser un système automatisé permettant d'estimer la masse de chair de chaque huître et de l'appliquer à un grand nombre d'huîtres acquises simultanément à l'IRM.

La programmation de l'application a été réalisée sous le logiciel Scilab 6.0.0 dont le langage est similaire au langage Matlab. L'équipe IRM-Food de l'Irstea a mis à disposition deux librairies de fonctions de traitement d'images (imlab et imlab3d), qui contiennent des fonctions de génération d'histogrammes à partir d'images de niveaux de gris, de labellisation, de transformation d'images. Les données IRM acquises en juin et octobre 2016 durant les développements méthodologiques sur l'IRM et d'avril 2017 durant l'expérience de mise en application pratique de ces développements ont été utilisées pour mettre au point et tester le programme sous Scilab. La validation du programme dans sa version finale a été réalisée sur les données de l'expérience d'avril 2017.

Les travaux réalisés ont fait l'objet d'un rapport de stage (Peyramaure 2017) et la production d'un poster exposé lors de la soutenance de fin de quatrième année à l'Insa de Rennes (Peyramaure 2017b), repris dans la présente thèse en figure 28.

Stockage informatique des données brutes générées et des images traitées exploitables

Ce point n'a pas constitué un élément bloquant dans la réalisation du projet IMAGIGAS, mais sera à approfondir dans les projets futurs, si l'acquisition et le traitement haut-débit par IRM est envisagé sur plusieurs biomarqueurs. Il est important de noter que l'application réalisée simplifie déjà l'archivage des résultats d'images traitées.



Traitement d'images IRM pour la quantification de la matière sèche à haut débit chez l'huître

Stage à l'IFREMER de La Tremblade, LGPMM et à l'IRSTEA de Rennes, plateforme PRISM Paul PEYRAMAURE, 4EII, INSA de Rennes

Contexte

L'étude des caractères phénotypiques des mollusques marins telle que leur masse est confrontée à plusieurs limites. En effet, la mesure de masses réalisée à la balance de précision nécessite le sacrifice de l'animal. La mesure par l'Imagerie à Résonnance Magnétique (IRM) de la masse de chair de l'huître, validée lors de plusieurs collaborations entre l'IFREMER et l'IRSTEA, permet un suivi de l'animal car elle est non invasive et non destructive.

Objectifs du stage

Les méthodes de quantification de la masse de chair de l'huître ont été mises au point pour un nombre réduit d'animaux. L'objectif du stage est d'apporter au traitement d'images les améliorations nécessaires afin de garantir sa robustesse et de l'automatiser pour qu'il puisse s'appliquer à un grand nombre d'huîtres acquises simultanément : Objectif « haut débit ».



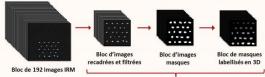
Matériels

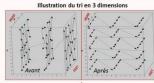
- IRM Siemens AVANTO 1.5 Tesla mis à disposition par l'IRSTEA.
- Huîtres creuses produites à l'écloserie de la station IFREMER.
- Enceinte permettant de positionner les huîtres dans l'IRM,
- Images DICOM d'huîtres issues de l'IRM,
- Prise en main du traitement d'images existant sous Image-J,
- Programmation sous le logiciel Scilab 6.0.0,
- Librairies de fonctions imlab, imlab3d développées par l'IRSTEA.

Mise en œuvre

Le traitement des images a été découpé de manière séquentielle en plusieurs étapes :

- Filtrage par la sélection des images présentant un bon rapport S/B
- permettent d'économiser les ressources de calcul et de mémoire, Recadrage pour supprimer les parties de l'image ne contenant pas d'huitre
- Masquage pour isoler les huîtres de leur environnement.
- Labellisation par l'affectation d'un label à chaque masque 3D,





- Calcul du volume de chaque masque d'huître pour la détection et la suppression d'éventuels artefacts,
- Isolement par masquage et calcul de l'histogramme des niveaux de gris (NG) de chaque huître identifiée par leur label,
- Calcul de la localisation de chaque huître dans l'espace (x, y, z, label),
- Tri en 3 dimensions des labels afin de le faire correspondre à la position réelle des animaux dans l'enceinte,
- Détermination d'un seuil pour chaque huître optimisant la relation niveaux de gris/masses de chair : Calcul du vecteur Nos de sommes des niveaux de gris supérieurs à chaque seuil, nécessaire au calcul du coefficient de détermination R2,
- Choix du mode de calcul :
 - Calibration sur des pesées « d'huîtres de calibration » et calcul de la courbe R2= f(∑NG), du seuil de NG optimal (Sopt) et de la droite de régression,
 - Estimation des masses « d'huîtres d'étude » basée sur leurs images et la régression linéaire calculée précédemment.

Résultats Les principales sorties du programme sont : L'archivage des résultats avec la génération d'un Le programme apparaît sous forme d'interface identifiant (Date-Heure) a été mis en place : graphique: Arborescence des résultats Resultats Session_2017822-1119 Session_2017822-1143 Mages_2017822-1143 Images_2017822-1150 Courbe R2= f(X) Mages_2017822-1154 Images_2017822-1157 MASSES_2017822-1150.txt MASSES_2017822-1154.txt MASSES_2017822-1157.txt REG 2017822-1143.txt

Conclusion: Ce programme a permis de traiter des images IRM de 69 huîtres acquises simultanément en 45 minutes. Dans le cadre du projet IMAGIGAS, nous avons traité des séquences d'images afin d'étudier l'évolution de la masse d'huîtres saines puis soumises à un stress par l'infection à l'herpès-virus OsHV-1 afin d'en quantifier les effets au fil du temps. Les résultats sont en cours de traitement.

Du 19 juin au 08 septembre 2017



François C. (Tuteur) Haure J. Lamy J.B.



Collewet G. Musse M. Quellec S.

Figure 28. Poster exposant la mise au point d'une application permettant le traitement automatisé d'images IRM pour estimer la masse de chair sur un grand nombre d'huîtres (Peyramaure 2017b)

Les principaux résultats de ces développements méthodologiques peuvent être résumés :

- (1) Le débit d'acquisition IRM de quinze individus en treize minutes est porté à soixante-neuf individus en quarante-cinq minutes.
- (2) L'analyse des histogrammes de NG des images a permis d'établir des seuils à partir desquels la corrélation entre les masses de chair et la somme des NG est optimale. Pour la masse de chair égouttée le seuil de NG optimal est de quatre-vingt-douze. Pour la chair sèche il est de cent seize.

Masse de chair égouttée = 0,000534437 x (somme des pixels de NG > 92) – 0,00445022

Masse de chair sèche = 0,00022202 x (somme des pixels de NG > 116) - 0,03189807

Ces seuils optimaux varient au cours de la croissance des animaux. Un travail doit encore être mené pour établir les meilleurs seuils sur une durée donnée de croissance et sur une plage de taille d'animaux.

- (3) Un histogramme de NG d'une huître creuse est relativement homogène quelle que soit la position de l'animal dans le dispositif à soixante-neuf cases.
- (4) Avec les seuils établis, les masses de chair ont pu être estimées et les erreurs par rapport aux pesées effectuées sur les animaux sacrifiés ont été évaluées. Pour la chair égouttée, l'écart absolu moyen des valeurs estimées par rapport aux pesées est de soixante-six milligrammes (soit 9,01%). Pour la chair lyophilisée, cet écart est de trente-huit milligrammes (18,5%). Plusieurs pistes sont envisagées pour améliorer ces estimations (normalisation des images, gestion des points aberrants).
- (5) L'application développée intègre l'ensemble des routines nécessaires à l'automatisation des traitements d'images acquises par IRM pour l'estimation de la masse de chair sèche à haut-débit chez les huîtres creuses. Elle permet également l'archivage des résultats obtenus.

3.1.2. Suivi de la masse de chair sèche d'huîtres creuses à haut-débit par IRM lors d'infection expérimentale par OsHV-1

En avril 2017, un essai d'application des développements méthodologiques a été entrepris.

L'hypothèse testée dans cette expérimentation est que la masse de chair sèche de l'huître creuse varie au cours d'une infection par l'herpèsvirus OsHV-1.

Durant la première étape de calibration, une série d'images d'huîtres **U1**, à jeun depuis 24 heures, de tailles et masses diverses ont été acquises à l'IRM. Ces huîtres ont ensuite été sacrifiées afin d'en effectuer les pesées et d'établir une régression linéaire entre les NG et les masses de chair sèche.

Durant la seconde étape d'estimation des masses de chair sèche par IRM sur les animaux d'étude, des images de 60 huîtres **U1** ont été acquises, dont 30 non infectées (NI) et 30 infectées (I) par une suspension d'eau de mer contaminée par le virus OsHV-1 selon le protocole décrit en partie IV § 1.4. Ces huîtres à jeun depuis 24 heures, n'ont pas été

nourries durant 72 heures et ont ensuite été pesées à la fin de l'expérimentation. Les images IRM ont été acquises à différents stades (avant infection, infection + 2h30, infection + 48h, infection +72h).

Une diminution au cours du temps de la variable « somme des NG au-dessus du seuil optimal », par conséquent de la masse de chair sèche estimée, a été observée (figure 29).

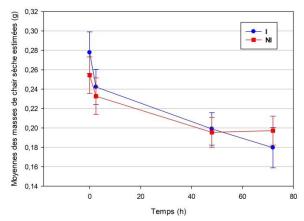


Figure 29. Variations des moyennes des masses de chair sèche estimées en fonction du temps, chez trente huîtres infectées (I) et trente huîtres non infectées (NI)

Un traitement statistique (test de Student) a été réalisé sur les masses de chair sèche moyennes en fonction de différents facteurs chez les huîtres I et NI (tableau XVII).

Au seuil de 5%, il existe une différence **très hautement significative** de la variable masse de chair sèche en fonction du facteur **Date** (avant infection, infection + 2h30, infection + 48h, infection +72h).

Au seuil de 5%, la différence de la variable masse de chair sèche en fonction du facteur **Etat_I_NI** (huîtres infectées, huîtres non infectées) n'est pas significative.

Au seuil de 5%, il existe une différence **significative** de la variable masse de chair sèche en fonction l'**interaction Date** x **Etat I NI**.

<u>Tableau XVIII. Comparaison de masses de chair sèche moyennes estimées par IRM en fonction de deux facteurs</u>

<u>Date et État I / NI chez trente huîtres infectées (I) et trente huîtres non infectées (NI)</u>

	Etat		Standard			
Effect	I_NI_	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept		0.2427	0.006689	236	36.29	<.0001
Date		-0.00074	0.000155	236	-4.81	<.0001
EtatI_NI_	I	0.01816	0.009460	236	1.92	0.0562
EtatI_NI_	N	0				
Date*EtatI_NI_	I	-0.00044	0.000219	236	-2.01	0.0456
Date*Etat I NI	N	0				

Sur la base de ce traitement statistique, il est possible de proposer un **modèle « statistique expérimental »**: $m_{sèche} = 0.2427 - 0.00074 * Date (h) - 0.00044 * Date(h) * Etat_I_NI.$

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'utilisation d'un modèle physiologique (Bougrier et al. 1995) de consommation d'oxygène de *C. gigas* en fonction de la température et de leur masse de chair sèche. Les huîtres n'étant pas nourries pendant les 72 heures d'expérimentation, il est supposé que les seules variations de leur masse soient dues à leur consommation d'oxygène. La perte de masse sèche entre t0 et t0+72h peut être calculé par :

Modèle physiologique:
$$VO_2 \text{ (mg.h}^{-1}) = [-0.432 + (0.613 * 1.042^{\mathsf{T}})] * m_{sèche}(\mathsf{t}_0)^{0.800}$$

où $m_{s \stackrel{.}{e} che}(t_0)$ est la masse de chair sèche (g) à t0 (avant infection) et T=20°C dans l'IRM.

Le modèle « statistique expérimental », s'appuyant sur les données acquises, sous-estime de trois fois la perte de masse de chair sèche par rapport au modèle physiologique (tableau XIX).

<u>Tableau XIX. Comparaison des masses de chair sèches et leurs variations entre t0 et t0+72h estimées selon le</u> modèle statistique expérimental et le modèle physiologique

Masses en grammes :	Temps (h)	Modèle statistique	Modèle physiologique
msèche moyenne des 60 huîtres	à t = 0h	0,266063658	
msèche moyenne des huîtres infectées	à t = 72h	0,15774	
msèche moyenne des huîtres non infectées	à t = 72h	0,18942	
∆msèche moyenne des huîtres infectées	entre 72h et 0h	0,108323658	0,347342256
∆msèche moyenne des huîtres non infectées	entre 72h et 0h	0,076643658	0,323788967
Δmsèche moyenne des 60 huîtres	entre 72h et 0h	0,092483658	0,335565611

A l'issu de l'analyse des résultats obtenus, il n'est pas possible de conclure que l'infection des huîtres creuses par immersion en eau de mer contaminée à OsHV-1 engendre une diminution de leur masses de chair sèche.

Des compléments à ces essais sont envisagés s'appuyant sur d'autres disciplines comme l'histologie et la biochimie pour apporter des informations sur le lien entre les NG et la composition des tissus et organes observés par IRM en partie V § 2.

3.2. Estimation de la température corporelle par IRM

Il s'agit de mesurer la variation de phase du signal entre deux temps de l'expérimentation qui après application la formule exposée en partie III § 4.2 permet d'estimer une variation de température corporelle. Cette approche présente toutefois certaines contraintes, en particulier :

- le corps ne doit pas être déplacé entre deux mesures de la phase,
- la composition des tissus a un impact sur la fréquence du signal et donc sur la variation de phase.

Cet enjeu a été abordé avec de petits effectifs en première instance, mais pourra profiter à termes des avancées de l'enjeu « haut débit » du projet IMAGIGAS.

3.2.1. Développements méthodologiques

D'avril 2016 à février 2017 huit expériences pour l'adaptation de protocoles existants de la mesure de la variation de phase par IRM ont été réalisées. Ces tests réalisés sur un yaourt et sur une huître et comparaison des résultats obtenus par IRM avec ceux obtenus avec un capteur de type fibre optique. Les résultats de ces expériences ont fait l'objet d'un compterendu d'analyses (IRSTEA 2017b) et sont synthétisés ci-dessous.

Correction des variations du champs BO

La phase du signal dépend du champ magnétique B0 qui varie au cours du temps. Les variations de B0 sont minimes, mais suffisamment élevées pour provoquer des erreurs de plusieurs degrés Celsius dans l'estimation des températures. Pour corriger cette variation, une zone « référence » (R) dans l'image est utilisée, qui correspond à un produit dont la fréquence de résonance ne varie pas avec la température (soit des lipides dont la fréquence ne varie pas avec la température, soit un autre produit placé à température constante). Ainsi les variations de phase sur cette zone seront uniquement liées aux variations du champ B0 ce qui permet de corriger la mesure de température sur le produit ou l'organisme étudié.

Expérimentations sur un yaourt (produit modèle)

Les acquisitions ont été opérées sur un yaourt à 0% de matière grasse sorti d'une chambre froide à 4°C et son augmentation de sa température a été suivie au cours du temps en le positionnant dans la cage de Faraday à température ambiante. La zone R de référence était constituée d'un bécher rempli d'huile minérale stockée dans la cage de Faraday depuis plusieurs jours et dont la température ne variait pas pendant la mesure. Ce yaourt était équipé d'une fibre optique ce qui permettait de comparer les mesures IRM avec les mesures par fibre optique. Les images ont été acquises avec différents temps d'écho (TE) 10 ; 15,5 ; 22 et 30 ms à des fins de comparaison (figure 30). La température initiale à t0 est celle mesurée par la fibre optique. Les quatre échos donnent des valeurs similaires, un écart entre la mesure par fibre et la mesure par IRM de l'ordre de 0,5°C à 1°C en fonction du TE utilisé est observé.

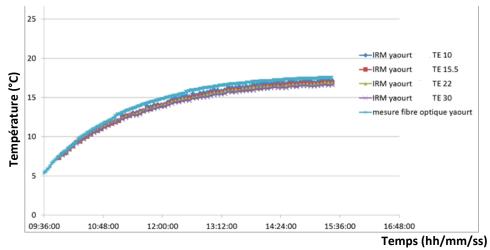


Figure 30. Variations de température mesurées sur un yaourt par fibre optique et par IRM à différents TE en fonction du temps, après correction des variations de phase non liées à la température (IRSTEA 2017b)

Expérimentations sur C. gigas

Les premiers essais ont été réalisés sur une huître creuse isolée, maintenue à température ambiante pendant toute la mesure, afin de vérifier qu'en l'absence de variation de température, l'IRM mesure bien une température constante. Il était important de faire cette vérification car des variations de phase dues éventuellement à des mouvements de l'huître auraient pu perturber la mesure de température.

La figure 31 montre l'évolution de la température pendant plus de deux heures sans et avec correction de la phase à TE = 15,5 ms. Ces mesures correspondent à une moyenne sur une zone carrée de six pixels de côté au niveau du muscle adducteur. Une légère dérive au cours du temps de l'ordre de -0,5°C est observée.

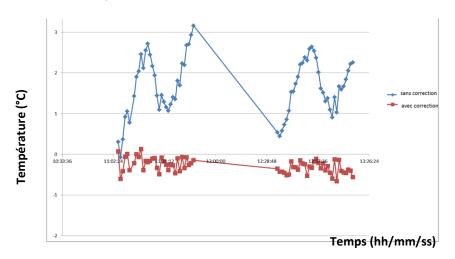


Figure 31. Variations de température mesurées par fibre optique et par IRM à TE 15,5 ms sans et avec correction en fonction du temps sur une huître creuse placée dans l'IRM à température ambiante (IRSTEA 2017b)

La figure 32 montre un exemple de cartographies de la différence de température sur la première image acquise sur l'ensemble de la chair de l'huitre, sans et avec correction de la phase à TE = 15,5 ms. Les cartes de températures sont relativement bruitées, cependant il est possible sur l'image avec correction de la phase, d'observer des variations de température autour de zéro. Quelques points aberrants notamment en périphérie sur les bords de la chair peuvent s'expliquer par de fortes hétérogénéités du champ magnétique au niveau des interfaces chair / air.

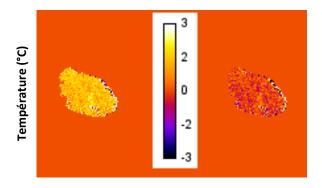


Figure 32. Exemple de cartographie d'écart de température sur la première image acquise sans (à gauche) et avec (à droite) correction de la phase (TE 15,5 ms) sur l'ensemble de la chair d'une huître creuse (IRSTEA 2017b)

Les principaux résultats de ces développements méthodologiques peuvent être résumés :

L'IRM permet une mesure non invasive de l'évolution de la température avec une précision de l'ordre du degré Celsius et ce sur un temps de l'ordre de plusieurs heures. Il est nécessaire d'utiliser une référence pour corriger les variations de phase liées aux variations du champ magnétique. Cette correction consiste en la soustraction de la variation de phase observée sur la référence, à la variation de phase observée sur l'objet ou l'animal étudié. La méthode a été validée sur un yaourt en court de réchauffement de 4 à 18 °C et sur une huitre creuse à température constante.

3.2.2. Suivi de la température corporelle d'huîtres creuses par IRM lors d'infection expérimentale par OsHV-1

En avril 2017, un essai d'application des développements méthodologiques a été entrepris.

L'hypothèse testée dans cette expérimentation est que la température corporelle de l'huître creuse varie au cours d'une infection par l'herpèsvirus OsHV-1.

Durant quatre heures, neuf huîtres creuses de la population U1 disposées dans l'IRM à température ambiante ont fait l'objet de mesure de variations de phase. La zone R de référence était constituée d'un bécher rempli d'huile minérale stockée dans la cage de Faraday. Une fibre optique permettait de comparer ses mesures avec celles de l'IRM. Les huîtres creuses ont été ensuite myorelaxées à l'aide d'une solution de MgCl₂, puis infectées par injection intramusculaire de suspension d'OsHV-1.

Afin de vérifier l'hypothèse qu'une modification de la température au point d'injection existe chez l'huître creuse, des acquisitions IRM ont été réalisées pendant treize heures à température ambiante sur les neuf huîtres infectées expérimentalement

Lors du traitement des données expérimentales de cet essai, les variations de température observées sur les neuf huîtres creuses avant infection étaient relativement bruitées et les résultats encourageants lors de la phase de développement méthodologique sur une huitre isolée n'ont pas été reproduits dans l'essai d'application avec neuf huîtres creuses. Des compléments de développement méthodologiques seront envisagés dans un prochain projet.

Dans l'ensemble, le travail réalisé constitue un pas supplémentaire dans l'objectif d'utiliser la technique IRM au maximum de ses capacités et ouvre des perspectives en termes de phénotypage à haut débit chez l'huître creuse.

Ce projet a fait l'objet d'un article de présentation dans la revue Produits de la mer (Guillot 2016).

Les premiers résultats ont également été présentés sous la forme d'un poster (figure 33) au congrès Physiomar les 18-21 septembre 2017 à Cambridge (François et al. 2017).













High-throughput phenotyping of health biomarkers in Crassostrea gigas by magnetic resonance imaging

Cyrille François¹, Stéphane Quellec², Guylaine Collewet², Paul Peyramaure⁴, Maja Musse², Jean-Baptiste Lamy¹, Pierre-Guy Sauriau³, Joël Haure¹

¹Ifremer, SG2M-LGPMM, Station de La Tremblade, Avenue de Mus de Loup, F-17390 La Tremblade, France

²Irstea, IRM Food, 17 avenue de Cucillé, F-35044 Rennes Cedex, France

. Université La Rochelle, UMR CNRS/7266, LIENSs, Bâtiment ILE, 2 rue Olympe de Gouges, F-17000 La Rochelle, France INSA, 20 Avenue des Buttes de Coësmes, F-35708 Rennes Cedex 7, France

Context: IMAGIGAS project aimed to explore a non-destructive and non-invasive approach by using magnetic resonance imaging (MRI) to monitor at high-throughput health biomarkers of *Crassostrea gigas*, before and during infectious challenges by Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV-1).

Health biomarker?

Global biomarker or specific of a physiological function? It depends on the physiopathological phenomenon that lead to a health trouble. Bibliographical study and comparison with others animal models show that fluctuations of body weight are often considered as gross signs in clinical studies.

Hypothesis: body weight as marker of general health status ...

1

Acquisition method?



High-throughput?

Weighting the body of *Crassostrea gigas* is complicated by the water in the palleal cavity and the presence of a shell. Precision balance is often used to weight lyophilized flesh. To realize a non destructive measurement and to respect as possible the integrity of the mollusc, preliminar assays using MRI were completed in previous Irstea /Ifremer projects (analysis of grey levels of images). ^{b,c}

of images). b.c Increase of data acquisition (number of individuals and/or frequency of acquisitions) requires: a large study population, an identification system of individuals, an enclosure to maintain oysters in correct position, informatic tools to manage the data flow and extract the relevant information.





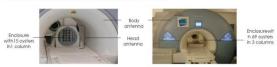


... at high-throughput.

Methodological development

Pacific oysters sensitive to OsHV-1 and viral suspension / contaminated seawater were produced at Ifremer facilities. Experiments were conducted at PRISM platform of Irstea which provided a Siemens Avanto 1,5 T MRI. Processing of acquired data was realized using Scilab software.

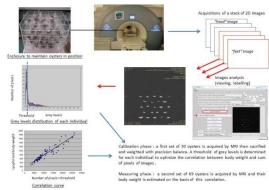
- → MRI parameters : T1-weighted Flash 3D sequence with TR=11ms TE=2.98 ms, FOV=480mm, Matrix=640, Acc=2, Thickness=1.5mm, Nb of sections=192, BP=240Hz/px and Flip=20°.
- → Choice of the tunnel (body) antenna for the reception of the signal, withdrawal of the head antenna:



extension of the volume of the measuring area

MRI Images are affected by geometric distorsion, in particular for oysters far from the center of the magnet (not all the volume of the tunnel is usable),

There are also variations of signal intensity (grey levels) linked to the position of the oysters in the tunnel, which can be to a certain extent corrected by a so-called normalization approach.^a



The estimation of body weight is based on a relation established between the sum of pixels whose grey level is greater than a particular value (threshold) in images taken by MRI and the weight of flesh of oysters measured by precision balance.

First results and applications perspectives

- → Throughput of MRI images acquisition : 69 oysters / 45 minutes.
- → Code elaborated on Scilab can easily generate body weight estimation whatever number of oysters are used
- → Putting in to practice (in progress) : OsHV-1 challenge and evolution of body weight during an infection

Références :

"Dearent A., Queller S., Pouvered A., Devened A., Degreenort L., Lapegue S, Hatte F. (2012). Ground enhanced determination of the sex of Pacific oysters by MRI. Magnetic Resonance imaging, 24(8), 1109-1110. Fishbauw, E., Devened A., Degreenort L., Lapegue S, Hatte F. (2012). Ground volume assessment in the oyster Consostere giogon at histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method. Aquaculture. 370-371(0), 84-89 (1), 100-1110. Fishbaum and a magnetic resonance imaging as a means to assess the body growth and the ground development of the oyster Consostere giogon. Aquatic Living Resources, 21(03), 333-339.

Corresponding author: cyrille.francois@ifremer.fr

<u>Figure 33. Poster exposant le projet IMAGIGAS au colloque Physiomar les 18-21 septembre 2017 à Cambridge</u>
(François *et al.* 2017)

4. Synthèse des résultats acquis par les approches développées dans la thèse

En miroir du tableau III de la partie III § 1.3, le tableau XX synthétise les principaux résultats et difficultés rencontrées dans les approches développées dans la présente thèse pour objectiver la santé biologique de *C. gigas* par le suivi de biomarqueurs d'intérêt.

Tableau XX. Principaux résultats et difficultés rencontrées pour objectiver la santé biologique de C. gigas par le suivi de biomarqueurs d'intérêt

Nom du biomarqueur	Filtration (Clearance rate) Temps d'activité de filtration (Feeding Time Activity)	Consommation d'oxygène (Oxygen consumption rate) Temps d'activité respiratoire (Respiratory Time activity)	Masse de chair sèche	Température corporelle	Echelle clinique
Nature des variables biologiques	Quantitatives	Quantitatives	Quantitative	Quantitative	Semi-qualitative
Caractéristiques physiologiques étudiées	Fonction alimentaire	Fonction respiratoire	Plusieurs fonctions, état général de santé	Plusieurs fonctions, état général de santé	Plusieurs fonctions, motricité et sensibilité du manteau et du muscle adducteur
Techniques	Dispositif expérimental	Dispositif expérimental	Imagerie par Résonance	Imagerie par Résonance	Examen physique
d'acquisition	spécifique	spécifique	Magnétique	Magnétique	
Résultats	Détermination de RI du CR chez un échantillon d'une population de référence d'huître creuses élevées en écloserie. Premiers résultats de validation interne de RI du CR	Détermination de RI d'OCR chez un échantillon d'une population de référence d'huître creuses élevées en écloserie. Premiers résultats de validation interne de RI d'OCR	Estimation de la masse de chair sèche de 69 huîtres creuses d'une population d'étude en 45 minutes dans un dispositif d'enceintes permettant la mesure en l'absence ou en présence d'eau de mer.	Estimation de la température corporelle sur une huître creuse isolée	Proposition d'une échelle clinique pronostique chez l'huître creuse lors d'infection à OsHV-1 Premiers résultats de validation interne de cette échelle
Difficultés	Durée des traitements et	Durée des traitements et	Durée des traitements des	Non applicable	Durée des acquisitions
rencontrées	interprétations biologiques des données acquises	interprétations biologiques des données acquises	données acquises	actuellement à un effectif d'huîtres creuses plus important, précision de la mesure de 1°C	de données

« Les visées de la recherche sont de développer de nouvelles connaissances, de produire de la régulation théorique. [...] Vous avez à fonder sur quelle théorie et pour quel phénomène vous vous proposez d'éprouver, de faire l'expérience de l'intérêt et de la limite d'une théorie pour expliquer et comprendre un phénomène, un événement, une situation, un segment de pratique. [..] La recherche, pour contribuer à l'évolution des théories, développe de nouvelles formes d'approche de compréhension des phénomènes, d'évènements devenus signifiants. La recherche n'est pas une étude ni une enquête, même si dans une recherche on utilise parfois des outils d'enquête, la recherche se conduit avec une méthode de recherche, reconnue et identifiée dans la communauté scientifique. [...] En principe, la recherche est adressée à une communauté scientifique, l'étude à un commanditaire, un décideur pour l'aider à prendre des décisions. [...] L'étude vise à une lisibilité par le praticien, la recherche par d'autres chercheurs, d'abord. L'étude se situe dans la praxéologie : on veut que l'intervention transforme et améliore les pratiques alors que le chercheur sait que les résultats de la recherche ne s'appliquent pas comme une grille sur le destin des pratiques. Sa posture est davantage dans la familiarité avec le terrain, de celui qui cherche à comprendre, comment dans cette pratique, on joue et ce qui s'y joue » (Eymard et al. 2004) ».

L'ambition initiale de l'auteur de la présente thèse était de faire dialoguer science et art médical. Les travaux de recherche réalisés par une méthode expérimentale devaient apporter des connaissances sur la santé biologique de l'huître creuse en testant la théorie des valeurs de références chez cet animal, ce qui déjà constituait un objectif en soi ... mais ces résultats pouvaient également être envisagés pour une utilisation future dans une pratique en lien avec la santé de l'huître creuse, ce qui explique la présence d'un chapitre applications dans la partie V et en figure 34. L'exercice de thèse a permis de surcroît de soulever chez l'auteur les limites d'une approche à visée purement médicale et d'autres dimensions de la santé chez les mollusques marins seront abordées à l'avenir.

1. Le concept de santé des mollusques marins est-il précisé à l'issue de ces travaux de recherche ?

Annoncé en partie II § 3.3, le travail de recherche de la présente thèse n'aborde qu'une dimension de la santé en s'appuyant sur le suivi de biomarqueurs de la santé biologique et en appliquant la théorie des valeurs de référence. Le concept de santé n'a donc été considéré que sous un angle particulier. Néanmoins, quels sont les premiers apports et les manques des travaux de recherche développés ici pour préciser la santé biologique chez l'huître creuse ?

RECHERCHES SUR LA SANTÉ DE L'HUÎTRE CREUSE ACTUELLE: DIMENSION BIOLOGIQUE DE LA SANTÉ EXAMEN PHYSIQUE DE DÉCISIONS **TESTS BIOLOGIQUES CHEZ** INTERPRÉTATIONS L'ANIMAL VIVANT L' ANIMAL VIVANT **DIAGNOSTIQUES ET PRONOSTIQUES** CR, OCR, FTA, RTA, NNP A différentes échelles, Echelle clinique Masse et température corporelles individuelle et collective : **APPLICATIONS** Mesures zootechniques **ÉVALUATION DE LA ÉVALUATION DE LA** Mesures médicales PROBABILITE PRE-TEST PROBABILITE POST-TEST Mesures de santé publique vétérinaire Notes attribuées de Valeurs de biomarqueurs l'échelle clinique par mesurées par rapport à rapport à une valeur seuil des valeurs seuils Très forte INTERVENTION PERSPECTIVES: **AUTRES** Confirmation Limite de décision APPLICATIONS? d'affirmation de maladie [+] ANALYSES COMPLÉMENTAIRES INDECISION? DE LABORATOIRE SUR [-] PRÉLÈVEMENT(S) Limite de décision Faible d'exclusion de maladie Infirmation Très faible ABSTENTION PERSPECTIVES: DÉTERMINANTS DE LA SANTÉ? **BIEN-ÊTRE ANIMAL? AUTRES DIMENSIONS DE LA SANTÉ?**

Figure 34. Dialogue entre recherches et applications pratiques dans le domaine de la santé chez C. gigas

Reprenons les enjeux de la question de recherche énoncée en partie II § 3.3.

1.1. Premier enjeu : choisir des biomarqueurs d'intérêt de la santé biologique

Ce choix a été réalisé *a priori* en employant pour une part des biomarqueurs déjà utilisés en écophysiologie chez l'huître creuse et d'autre part de nouveaux candidats de façon plus exploratoire. La pertinence de ces biomarqueurs a été évaluée en réalisant des expositions d'huîtres creuses à des organismes pathogènes et en cherchant à mettre en évidence des variations des valeurs de ces biomarqueurs chez les animaux malades.

Les résultats en partie IV § 1.4 montrent qu'il existe des différences significatives de CR et d'OCR entre deux heures avant et certains temps après exposition à OsHV-1 chez les animaux « Exposés » à issue fatale. Ces résultats attestent que le suivi de l'OCR et du CR est d'intérêt pour appréhender la santé (forme négative) chez l'huître creuse. Dés J2 et jusqu'à J3, des différences significatives au seuil de 5% d'OCR et de CR peuvent être mises en évidence chez les individus qui vont mourir d'infection à OsHV-1 par rapport à ceux qui survivront.

Pour les autres biomarqueurs FTA, RTA, NNP, masse de chair sèche et température corporelle, des analyses complémentaires de résultats ou des expérimentations nouvelles doivent être réalisées avant de conclure sur l'intérêt de leur suivi.

L'échelle clinique est en quelque sorte un cas à part car elle ne constitue pas un biomarqueur unique mais une intégration de plusieurs observations dans un outil. Les résultats en partie IV § 2 montre que l'échelle clinique développée permet de préciser l'état de « mort clinique » et peut être employée pour réaliser, avec une bonne discrimination, un pronostic à J6 après infection sur la base des notes attribués à J2 et J3 aux animaux placés dans de l'eau de mer contaminée par OsHV-1. Ces résultats attestent que l'utilisation de l'échelle clinique peut-être d'intérêt pour appréhender la santé (forme négative) chez l'huître creuse.

Il reste au demeurant que ces biomarqueurs sont d'intérêt surtout pour caractériser la forme négative de la santé biologique : l'absence ou la présence de (certaines) maladies. Dès lors, comment réussir à optimiser la recherche de biomarqueurs pertinents pour la santé ? Est-il toujours nécessaire de sélectionner un biomarqueur de santé par la réalisation d'essai de transmission expérimentale de maladie (ou d'essais de toxicologie si l'on considère un agent chimique par exemple) ? N'a-t-on pas ainsi choisi des biomarqueurs de maladies ? Ne faudrait-il pas une approche complétement différente ?

Pour appréhender les formes négative <u>et</u> positive de la santé, plusieurs développements sont à envisager, en particulier sur les déterminants de la santé (déjà évoqués en partie I § 5) et sur le bien être chez l'huître creuse (au sens de la définition de l'OMS, partie I § 3.2), ce qui pourrait contribuer à préciser les conditions favorables à la « vie en bonne santé » avec peut-être des biomarqueurs de la forme positive de la santé.

1.2. Deuxième enjeu : constituer des populations d'huîtres creuses saines

Les arguments justifiant le choix d'une population de référence s'appuyant sur des animaux produits dans des installations expérimentales sont exposés en partie III § 5.1. Ils sont également valables pour les populations d'étude qui devaient être saines avant expositions expérimentales à des organismes pathogènes.

Etait-il possible d'obtenir des animaux présumés sains issus d'un autre environnement ? Au regard de l'étendue de la répartition géographique de certains organismes pathogènes (OsHV-1 en particulier), il semblait difficile dans le temps imparti à l'exercice de thèse de trouver un tel environnement en France comme dans les autres pays producteurs d'huîtres creuses. Une autre difficulté liée au fait de s'approvisionner dans l'environnement littoral était de disposer d'animaux pour lesquels le parcours zootechnique était connu ; il était en effet important de limiter les effets de facteurs de variations non souhaités.

Ces travaux de recherche ont donc porté sur des populations d'écloserie expérimentale uniquement. L'équipe de Génétique du LGPMM et les équipes du LPI, de la PMMB et de la PMMLT ont contribué à différents niveaux au plan de croisement, à la production et au maintien de ces populations. Les installations Ifremer disposent des équipements nécessaires pour prémunir ces animaux des infections par des organismes pathogènes et l'enjeu de constituer des populations d'huîtres creuses présumées saines a été réalisé.

L'expression « présumé sain » soulève deux remarques. Aucun autre agent pathogène (chimique ou physique) n'a fait l'objet d'attention et seule l'absence d'agents infectieux a été visée lors du choix des animaux. Le respect du bien-être (forme positive de la définition de la santé) n'a pas fait non plus l'objet d'une attention particulière dans la sélection des animaux. Toutefois il est important de noter que durant la stabulation des animaux, avant la réalisation des essais expérimentaux, aucune mortalité n'a été observée et que les différentes étapes du travail de thèse ont été réalisées en respect des normes éthiques de l'Ifremer.

1.3. Troisième enjeu : déterminer des valeurs et intervalles de référence

La théorie des valeurs de référence a été mis en œuvre de manière concluante sur un échantillon d'une population de référence d'huîtres creuses produites dans des installations expérimentales et a permis de proposer des intervalles de référence du CR et de l'OCR en partie IV § 1.1 et dans l'article n°1 (François et al. 2019 in press).

Si ces travaux portent seulement sur des animaux produits dans des installations expérimentales Ifremer et étudiés dans des conditions de laboratoire, peut-on considérer que ces résultats sont valables pour l'ensemble des huîtres creuses élevées en écloserie ?

Selon Geffré et al. (2009) citant le CLSI (2008), pour qu'il y ait transportabilité (transference en anglais) de RI « trois conditions doivent être satisfaites (1) Le RI à transférer doit avoir été obtenu correctement et sa génération, ainsi que d'autres procédures de validation, doivent être entièrement documentées et disponibles pour examen [...], (2) Les systèmes d'analyse doivent être comparables. Une procédure classique de comparaison de méthodes (CLSI 2013) est utilisée pour déterminer si la corrélation entre les systèmes analytiques est suffisamment élevée pour utiliser les statistiques de régression pour calculer un nouvel IR à partir du précédent. [...], (3) Les populations de patients doivent être comparables. Cela implique que des informations démographiques complètes sur le groupe d'échantillons de référence d'origine sont disponibles et correspondent aux données démographiques de la nouvelle population ».

La transportabilité des RI déterminés dans la présente thèse, peut être confrontée à plusieurs difficultés. Concernant la condition (3) même si les procédures d'élevage peuvent par de nombreux aspects être proches d'une écloserie à une autre, il est possible que certaines pratiques spécifiques puissent avoir un impact sur les populations produites; l'origine géographique des animaux, en particulier des géniteurs, peut également différer. Concernant la condition (2), le système d'acquisition des RV, même s'il a été renseigné depuis Haure et al. (2003) et optimisé dans la présente thèse, demeure un dispositif expérimental spécifique et est de fait non largement distribué. Si d'autres outils de mesure du CR et de l'OCR sont utilisés, la corrélation entre les systèmes analytiques doit être effectivement réalisée et satisfaisante. Concernant la condition (1), d'autres travaux complémentaires semblent nécessaires. Les RI proposés dans l'article n°1 et en partie IV § 1.1 ont été exprimés en considérant les coefficients d'allométrie obtenus à partir des données de cette expérience à la température de 22°C, à la salinité de 32 ‰, avec un apport alimentaire précis. Un complément important à ces résultats serait de prolonger les travaux de Bougrier et al. (1995) sur les coefficients d'allométrie chez C. gigas et de déterminer des RI dans des conditions de température d'eau de mer différentes et d'évaluer l'effet d'autres facteurs de variation (en particulier du sexe, à un moment donné et lors de son changement chez cet animal considéré comme hermaphrodite protandre irrégulier) avant d'envisager leurs validations internes et externes.

Une autre approche aurait été de penser autrement la détermination des RI en accomplissant une **étude multicentrée** (Rustad *et al.* 2004, Fuentes-Arderiu *et al.* 2004). « La création d'IR multicentriques à partir des contributions de plusieurs laboratoires a été établie avec succès et utilisée cliniquement chez l'homme. Le développement de RI communs ou partagés a été motivé par la nécessité de partager la charge de travail, d'augmenter la taille de l'échantillon et d'augmenter le nombre d'analytes disponibles pour un usage diagnostique. La détermination de RI communs n'est possible que lorsque toutes les conditions pré-analytiques et analytiques sont comparables et que les populations de référence des différents laboratoires sont similaires. Les IR communes doivent être validées ou vérifiées dans chaque laboratoire [...] » (Geffré *et al.* 2009). Une telle étude aurait pu être réalisée sur plusieurs sites incluant des laboratoires de recherche et des partenaires privés.

1.4. Quatrième enjeu : émettre des hypothèses sur la santé d'une population

Comme mentionné en partie II § 3.2 les limites de références ne sont pas des limites qui peuvent être transposées d'emblée dans une autre population que la population de référence et permettre de trancher entre « bonne » et « mauvaise » santé chez les individus de cette nouvelle population d'étude pour adopter directement une décision médicale.

Siest *et al.* 1981 soulève qu'il est toutefois possible après la détermination de RI de réaliser la comparaison de valeurs observées à des RV :

- Chez des sujets présumés sains pour suivre l'évolution de leur santé par exemple dans le dépistage d'une affection non décelée cliniquement, de la classification dans un groupe à risques, de l'exploration dynamique fonctionnelle, de la comparaison de bilans successifs sur plusieurs périodes de temps, etc ...
- Chez des patients reconnus malades cliniquement. C'est l'emploi « traditionnel » d'un résultat de laboratoire où la valeur observée était comparée aux « valeurs normales ». Dans ce cas, l'interprétation des valeurs observées apporte un élément d'orientation complémentaire sur le diagnostic (confirmation d'un processus pathologique) ou peut être mis à profit dans la surveillance d'une maladie identifiée, ou le suivi des effets d'un traitement médical en cours.

Pour cela faut-il encore que les individus considérés présentent des caractéristiques proches de celles de la population de référence et que les conditions pré-analytiques et analytiques soient similaires.

Concernant le premier point, des premiers éléments de résultats chez des huîtres creuses présumées saines sont disponibles en partie IV en consultant les RV et RI de CR et d'OCR du tableau VIII de la population de référence avec les valeurs observées du tableau X de six populations d'étude obtenues dans les mêmes conditions pré-analytiques et analytiques. Les valeurs observées de CR et d'OCR chez les différentes populations d'étude sont pour certaines dans les RI de CR et d'OCR et pour certaines en dehors mais s'en approchent. Il faut toutefois garder à l'esprit que les populations d'étude ont été obtenues selon un plan de croisement pour lequel il est possible de suspecter l'implication d'un nombre limité de parents comparativement à ce qui a été réalisé pour produire les individus de la population de référence. Enfin, des différences de CR et de NNP sont observées chez les individus d'étude de ploïdies différentes. Il est toutefois difficile de dégager plus d'informations ; il n'est en particulier pas possible de classer les populations d'étude présumées saines en « groupes à risque » sur la seule base de la comparaison de leurs valeurs observées de CR et d'OCR par rapport aux RI de la population de référence.

Concernant le second point, seule la comparaison des valeurs observées chez les populations d'étude **entre elles** avant et après exposition à OsHV-1 a été réalisée. Les premiers éléments d'analyse de résultats en partie IV § 1.4 et 2 font suspecter un motif (pattern) à la fois au niveau de l'échelle clinique, de l'OCR et du CR chez des animaux exposés à OsHV-1. **J2-J3** après immersion en EMC semblent constituer une période charnière, à partir de laquelle des répercutions sur l'animal sont détectables.

Au cours de la présente thèse, des mesures de biomarqueurs et l'application de l'échelle clinique ont également été accomplies chez l'ensemble des populations d'étude lors d'essais de transmission expérimentale de l'infection à *V. aestuarianus*. Ces données n'ont pas été encore exploitées mais une analyse préliminaire des résultats a permis de mettre en évidence trois points à améliorer (1) la durée d'observation d'une semaine semble insuffisante pour un essai de transmission à 22°C, deux semaines semble être un minimum si les mêmes quantités de bactéries sont obtenues dans l'EMC, (2) une autre solution peut être d'accroître la quantité de bactéries, mais cela nécessiterait de disposer d'animaux 'donneurs' très excréteurs de *V. aestuarianus* dans l'EMC, (3) et par la même occasion il serait judicieux de disposer des mêmes quantités de *V. aestuarianus* dans les EMC de chaque essai de transmission expérimentale. Ce dernier point est aussi valable pour OsHV-1, bien que cela ne soit pas aisé à réaliser.

Enfin, si des valeurs observées d'un biomarqueur chez les populations d'étude de statut inconnu sont comparées entre elles, il est difficile de conclure sur l'état de santé des animaux d'étude. Les différences observées sont-elles liées aux caractéristiques des populations (ploïdie par exemple, comme identifié en partie IV § 1.3) où s'agit-il d'un signe d'un trouble de santé ? La santé est un tout global et la variation d'un biomarqueur isolé ne peut pas être interprétée séparément. A moins de disposer de biomarqueurs « critères de substitution », il semble nécessaire de compléter les mesures de valeurs de plusieurs biomarqueurs à une évaluation clinique par exemple à l'aide d'un examen physique des animaux. L'échelle clinique proposé en partie III § 3 peut contribuer à cette évaluation clinique. Le simple fait de présenter des valeurs de biomarqueurs « hors-norme » (en excès ou en défaut par rapport aux RI) n'est pas un critère suffisant pour affirmer l'état de santé

« En matière de normes biologiques, c'est toujours à l'individu qu'il faut se référer » (Canguilhem 1966). La figure 34 propose une démarche, expliquée en partie V § 3, combinant différents éléments d'orientation pour permettre une décision médicale.

En résumé sur ces quatre enjeux, il est possible de considérer que certaines avancées ont été obtenues sur la voie à accomplir, mais la direction choisie demeure très orientée sur la forme négative de la santé....ce constat appelle d'autres perspectives.

2. Perspectives de recherche

Ces premiers éléments de discussion permettent d'envisager plusieurs suites aux travaux de thèse. Outre les résultats pour répondre à la question de recherche initiale, d'autres résultats ont été mis en évidence et peuvent faire l'objet de premières perspectives.

2.1. Comparer les valeurs observées de biomarqueurs entre populations d'étude de *C. gigas* de ploïdies et de niveaux de sélection différents

Déjà Haure et al. (2003b) avaient réalisé une étude comparative des caractéristiques écophysiologiques d'huître creuses *C. gigas* de ploïdies différentes en milieu contrôlé. Entre des *C. gigas* 2n, 3n obtenues par traitement à la cytochalasine B et 3n issues de croisement de parents 2n par 4n, les tests statistiques réalisés sur les valeurs de biomarqueurs suivis (FTA, RTA CR, OCR standardisés par le poids sec avec allométries affectées) n'avaient pas révélés de différence significative entre ces populations d'huîtres au seuil de 5%.

A nouveau dans la présente thèse en partie IV § 1.3, il n'est pas mis en évidence de différences significatives au seuil de 5% pour ces biomarqueurs entre des *C. gigas* présumées saines 2n et 3n (issues de croisement 2n par 4n) ; toutefois des différences significatives sont décrites pour la première fois au niveau des CR et NNP entre, d'une part des *C. gigas* 2n, 3n et d'autre part des *C. gigas* 4n. Peut-on soulever des hypothèses pour les expliquer ? Une première hypothèse peut être la différence de surface de branchies suspectée chez les individus tétraploïdes ou plus précisément le rapport entre la surface de branchies et la surface du reste du corps qui pourraient être différentes de celles des individus 2n et 3n. Des analyses d'images combinées à des estimations de masses pourraient à l'avenir être réalisées pour tester cette hypothèse.

Par ailleurs, il n'a pas été observé de différences significatives pour ces biomarqueurs entre les *C. gigas* sélectionnées et non sélectionnées disposées dans un milieu « sain ». Est-ce-que ce résultat est également observable lors d'une infection par un organisme pathogène ? Des premiers éléments de résultats lors d'essais de transmission expérimentale de l'infection à OsHV-1 sont exposés en partie IV § 1.4 (figure 15 à 20) qui demandent des approfondissements en termes de traitement statistique. L'impact du patrimoine génétique sur les valeurs observées de biomarqueurs pourrait enfin être abordé différemment en utilisant des familles biparentales voire des lignées isogéniques.

2.2. Contribuer à la description de tableaux cliniques de maladies chez *C. gigas*

La « période charnière » **J2-J3** soulevée en partie V § 1.4 lors d'exposition à OsHV-1 constitue un sujet à approfondir. A cette période, l'échelle clinique permet de prédire avec une bonne discrimination l'issue fatale ou la survie des animaux à J6 ; de plus chez les animaux qui vont mourir les valeurs de biomarqueurs sont significativement différents à cette période par rapport à avant l'exposition à OsHV-1 (figures 15 à 20).

En comparaison, l'impact d'un microorganisme pathogène sur le CR a déjà été décrit chez d'autres espèces de mollusques marins. Soulevé en partie III § 2, il s'agit d'abord de la modification de CR lors d'infestation de *C. virginica* par le parasite *Haplosporidium nelsoni* responsable de la maladie MSX. Les études de Newell (1985) et Barber *et al.* (1991) donnent toutefois des résultats différents, qui sont pour partie attribuables aux conditions expérimentales différentes en particulier sur le plan des populations d'étude.

Cela a également été décrit chez *R. philippinarum* par Flye-Sainte-Marie *et al.* (2007). Ils ont noté que lors d'une infection par la bactérie *Vibrio tapetis*, les individus avec un stade de maladie (Conchyoline Deposit stage, CDS) ≥ 4 le CR était significativement inférieur à celui des palourdes asymptomatique (CDS = 0). Le FTA est également affecté négativement par le développement de la maladie.

Chez *C. gigas*, Soletchnik *et al.* (1998) ont étudié les impacts d'une bactérie *Chlamydia*-like sur la physiologie de l'huître creuse. Dans les populations de *C. gigas* reconnues infectées par cette bactérie, ils ont estimé que le CR représentait un meilleur bioindicateur d'un niveau d'infection élevé par rapport à d'autres paramètres physiologiques (respiration, production de matières fécales, taux d'absorption, potentiel de croissance). Ils ont montré une relation linéaire positive entre les anomalies des branchies et le taux de filtration de *C. gigas* nourrie à *Skeletonema costatum* et également une corrélation négative entre la consommation d'oxygène et les anomalies branchiales induites par *Chlamydia*-like chez *C. gigas* qu'ils ont reliée à un dysfonctionnement des branchies. Richard *et al.* (2017) ont noté que l'injection intramusculaire du virus OsHV-1 chez des *C. gigas* juvéniles induit une diminution de la consommation d'oxygène chez ces animaux.

Des mesures de biomarqueurs et l'application de l'échelle clinique ont également été accomplies chez l'ensemble des populations d'étude lors d'essais de transmission expérimentale de l'infection à *V. aestuarianus*. Ces données n'ont pas été encore exploitées mais une analyse préliminaire des résultats a permis de mettre en évidence trois points à améliorer (1) la durée d'observation d'une semaine semble insuffisante pour un essai de transmission à 22°C, deux semaines semble être un minimum si l'on conserve les mêmes quantités de bactéries dans l'EMC, (2) une autre solution peut être d'accroître la quantité de bactéries, mais cela nécessiterait de disposer d'animaux 'donneurs' très excréteurs de *Vibrio aestuarianus* dans l'EMC, (3) et par la même occasion il serait judicieux de calibrer les quantités de *V. aestuarianus* dans les EMC de chaque essai de transmission expérimentale. Ce dernier point est aussi valable pour OsHV-1, bien que cela ne soit pas aisé à réaliser.

2.3. Développer l'imagerie médicale dans la recherche sur la santé de C. gigas

Le projet IMAGIGAS qui s'est déroulé pendant le temps de la présente thèse a été l'occasion de tester de nouveaux développements susceptibles de compléter les travaux sur la santé biologique de *C. gigas*.

Les résultats obtenus dans l'objectif 1 d'IMAGIGAS décrits en partie IV § 3.1 constituent une véritable avancée. Estimer la masse de chair sèche sur plusieurs individus en même temps sans avoir à les sacrifier, permet déjà de suivre son évolution au cours d'une expérimentation. Il ne semble pas inaccessible de faire également ces mesures chez des animaux immergés. Les calculs de l'OCR et du CR s'appuient justement sur la mesure de la masse de chair sèche qui est effectuée à la mort des animaux malades ou en fin d'expérimentation après sacrifice de survivants, congélation à -20°C, lyophilisation puis pesée à l'aide d'une balance de précision. L'estimation de la masse de chair par l'IRM permettrait déjà de se dispenser de ces étapes.

Certes utiliser un IRM pour mesurer une masse semble une approche « surdimensionnée » ... mais des développements supplémentaires impliquant l'IRM sont envisageables en lien avec d'autres disciplines. Il s'agirait par exemple d'améliorer les protocoles d'IRM en s'appuyant sur les connaissances sur la composition biochimique des tissus et organes « sains » (pour rappel la part de lipides et donc de protons dans les tissus se traduit par un certain niveau de gris sur l'image IRM). Une étude de comparaison d'images obtenues par IRM et par histologie permettrait de faire profiter ces deux disciplines de connaissances partagées. Ceci pourrait aussi être également mis à profit dans la réalisation d'un atlas d'anatomie chez des animaux présumés sains. Plus loin encore il est possible d'imaginer que l'IRM apporterait également des informations d'intérêt sur les premiers désordres anatomopathologiques lors de maladies affectant *C. gigas*. Delà à combiner un système d'imagerie médicale avec un banc de physiopathologie ou d'autres dispositifs dans un même système de biomonitoring.

Les résultats décrits en partie IV § 3.2 témoigne que l'objectif 2 d'IMAGIGAS était clairement trop exploratoire. L'idée d'avoir une variation de la température corporelle lors d'un stress focal est inspirée de ce qui se passe dans les premiers stades de l'inflammation chez les vertébrés terrestres. De façon générale des acquisitions de connaissance plus poussées sont nécessaire sur le vaste sujet de l'inflammation chez les mollusques marins et l'emploi de l'IRM était peut-être prématuré pour cet objectif.

Pendant cette thèse d'autres approches d'imagerie ont également été tentées : caméra endoscopique et échographie en particulier. Si déjà des premières observations intéressantes ont été obtenues, leur utilisation au cours de la thèse n'a pas été systématique et fera l'objet d'essais ultérieurs.

En lien avec la question de recherche initiale, d'autres perspectives de recherche sont également envisageables.

2.4. Identifier des déterminants de la santé chez C. gigas

Au regard des publications en toxicologie et en pathologie des mollusques marins, de nombreuses informations sont disponibles et la forme négative de la santé est déjà relativement renseignée.

Pour contribuer à préciser la forme positive de la santé, réaliser un projet de recherche visant à inventorier les conditions qui font qu'un environnement est favorable à la vie en bonne santé de *C. gigas* pourrait constituer un nouvel enjeu.

La méthode clinique de recherche évoquée en partie II § 2 pourrait d'abord être mise en œuvre pour « produire des savoirs à partir du récit des sujets » et recenser ces environnements favorables à l'aide d'une enquête visant à recueillir les connaissances et observations des professionnels et autres usagers du milieu marin, directement ou indirectement intéressés par les mollusques marins (aquaculteurs du littoral et écloseurs-nurseurs, pêcheurs à pieds, agents des DDTM, enquêteurs-préleveurs de terrain des laboratoires d'analyses, d'université ou d'instituts de recherche, amateurs éclairés d'associations de malacologie par exemple).

S'intéressant à la santé de *C. gigas*, il semble naturel de placer le focus d'abord sur l'huître creuse, placée « au centre » en tant que principal concerné et bénéficiaire de la santé. Il s'agirait en second lieu d'inventorier les différences notables chez les animaux de statut différent dans des environnements contrastés en combinant méthodes différentielle et expérimentale de recherche évoquées en partie II § 2. Qu'est ce qui caractérise un animal observé en bonne santé dans un environnement favorable par rapport à un animal diagnostiqué malade dans un milieu défavorable ? Les animaux des zones d'interface entre ces deux types d'environnement pourraient être d'un intérêt particulier car ils pourraient être en quelque sorte le reflet de l'interface « forme positive / forme négative » de la santé. Observer des animaux déjà en place ou disposer des animaux sentinelles sur ces sites sont deux approches qui ont leurs avantages et leurs inconvénients (pas d'interférences liée à l'introduction et à une phase d'adaptation - acclimatation à un nouveau milieu dans un cas ; un statut de santé initial et un parcours zootechnique « maîtrisés » dans l'autre cas).

Il serait aussi important de dépasser le focus placé sur l'animal et de recueillir les éléments d'intérêt sur son environnement. Au regard de l'étendue des connaissances à acquérir, ce travail requiert la combinaison de plusieurs disciplines de recherche, comme déjà évoquée en partie I § 6. En parallèle de ces essais de terrain, des travaux en conditions de laboratoires pourraient également permettre de valider des hypothèses en introduisant un à un les facteurs de variation de biomarqueurs suspecté d'intervenir dans la santé de *C. gigas*.

L'identification de déterminants de santé chez *C. gigas* pourrait permettre de suggérer de nouveaux biomarqueurs reflétant la forme négative <u>et</u> la forme positive de la santé biologique et apporter également des éléments permettant d'alimenter des modèles multivariés de prédiction sur la santé.

2.5. Valider des biomarqueurs pour des mesures à haut débit et à grande échelle

L'inventivité en termes de biomarqueurs dans la recherche sur la santé ne semble pas être limitée ... la difficulté réside plus sur la disponibilité de biomarqueurs pour lesquels l'ensemble des étapes de développement aient été accomplies, de l'identification, à la sélection ou priorisation de ces biomarqueurs jusque la validation des couples biomarqueur méthode d'acquisition.

Pour valider techniquement les performances d'une méthode utilisée, il est nécessaire de déterminer ses qualités intrinsèques (exactitude, précision, linéarité, sensibilité, spécificité, limite de détection...). Pour les méthodes employées dans la thèse, certaines de ces qualités sont renseignées, d'autres mériteraient un projet spécifique pour les préciser. Pour valider ensuite le biomarqueur et sa méthode de dosage dans un contexte opérationnel, plusieurs phases peuvent être réalisées avec des expérimentations devant aboutir à la démonstration de la pertinence clinique du biomarqueur (première étude d'essai ou pilote « training ou pilot set » aboutissant à une preuve de concept, seconde étude plus large d'évaluation « test set », étude multicentrique et multi-ethnique si les résultats sont favorables « validation test », étude sur des groupes de sujets indépendants de ceux qui ont été utilisés dans les étapes précédentes (PIPAME 2009, Romanetto 2011).

En combinant les mesures de biomarqueurs par un équipement dédié et les observations cliniques par un examen physique, les expérimentations menées dans le cadre de la thèse apportent déjà quelques éléments pour une étude pilote. Néanmoins les autres étapes de validation « opérationnelle » sont à accomplir.

Que cela soit à des appels à projets, dans des colloques ou lors de réunions de groupements d'intérêt scientifique, l'expression « phénotypage haut-débit » semble être le nouvel objectif (technologique) à atteindre. Toutefois, lors du traitement des résultats en partie IV § 1 et 3, l'auteur de la présente thèse a été confronté, dans une certaine mesure, à ce que Delpech (2011) énonce « le problème devient bioinformatique compte tenu de la masse gigantesque d'informations à traiter ». Le dispositif du banc de physiopathologie permettait par exemple d'acquérir des résultats bruts toutes les secondes pendant une minute sur chaque individus toutes les seize minutes et ce pendant la durée de l'expérimentation (deux heures pour la détermination des RI, six jours lors des essais de transmissions expérimentales à OsHV-1). Les premières représentations de résultats ont permis de souligner la difficulté d'interpréter des données « haute fréquence » et de nouveaux traitements de résultats ont conduits à considérés les résultats avec des valeurs moyennées sur deux heures dans certains cas et vingt-quatre heures dans d'autres cas de sorte à pouvoir discerner des différences interprétables de valeurs de biomarqueurs et les relier à une signification biologique par exemple une expression clinique. « Le phénotypage haut-débit » n'a donc de sens que si les capacités de traitement et d'interprétation de ces données sont disponibles ... Si c'est le cas, des études à haut débit et à très grande échelle sur les variations biologiques de biomarqueurs chez C. gigas peuvent être envisagées.

2.6. Améliorer et valider l'échelle clinique

Pour aboutir à la proposition de l'échelle clinique, un travail d'observation des animaux présumés sains a d'abord été réalisé, puis les signes observés lors de pré-tests d'infection à OsHV-1 ont été ensuite rapportés.

Cette approche a permis d'apporter des éléments sur la « mort clinique » chez l'huître creuse pour laquelle sensibilité et motricité de différents organes sont pris en compte. L'échelle clinique contribue à renseigner le tableau clinique de la maladie virale. L'intensité des signes est peut être liée à l'intensité de l'infection et le motif (pattern) observé est peut-être différent en fonction de l'inoculum ; dans le cadre des travaux de thèse le nombre de copies d'ADN d'OsHV-1 par microlitres dans l'EMC à JO était compris entre 3,07E+0 à 2,56E+04, en moyenne de 3,47E+03. L'échelle clinique a également été employée lors d'essais de transmission expérimentale de l'infection à *Vibrio aestuarianus*, mais les résultats n'ont pas encore été exploités.

Il serait utile de compléter l'échelle en intégrant des informations issues de la recherche de déterminants de la santé, de les tester dans des essais mettant en jeu d'autres agents pathogènes physiques, chimiques ou biologiques et finalement, au même titre que pour les RI, de réaliser la suite des étapes visant à la validation de l'échelle clinique avant d'envisager des applications concrètes en écloserie.

Une autre approche que l'échelle clinique serait d'automatiser la réalisation de mesures sur l'activité valvaire comme cela déjà été fait avec des valvomètres chez *C. gigas* (Floch 1994, Acosta 2010, Bernard 2011, Durrieu *et al.* 2016, Payton 2017). Cela ne concerne toutefois que la motricité et non la sensibilité du muscle adducteur et du manteau. La valvomètrie ne remplace pas l'observation par l'expérimentateur qui peut détecter de nouveaux signes non encore décrits lors de trouble de santé mais peut constituer un complément intéressant dans un système complet de biomonitoring des animaux.

2.7. Confirmer les intervalles de référence de *C. gigas* et comprendre leurs implications

Outre la transportabilité et une étude multicentrée des RI de CR et d'OCR, évoquées en partie V §1.3, il pourrait être envisagé de réaliser une approche similaire de détermination de RI sur d'autres biomarqueurs de l'huître creuse. Des biomarqueurs cardiovasculaires pourraient être de bons candidats mesurables avec des méthodes d'acquisitions faiblement invasives dérivées de la photopléthysmographie, déjà appliquées chez les crabes Carcinus maenas (Depledge and Andersen 1990 première étude relatant le développement du CAPMON computer-aided physiological monitoring system, Aagaard et al. 1991) et Cancer magister (De Wachter et McMahon 1996), chez l'écrevisse Astacus astacus (Fedotov et al. 2000, Pautsina et al. 2014), et enfin les mollusques avec la moule Mytilisepta virgata et la patelle Patella vulgata (Burnett et al. 2013). L'idée en a été reprise par l'équipe du LPI pour l'étude de l'activité cardiaque chez C. gigas (Alunno Bruscia et al. 2016, 2017, 2018). Il est à noter que l'IRM a déjà été employée pour l'étude de l'activité cardiaque chez Mytilus galloprovincialis (Seo et al. 2014) et pourrait être envisagée à l'avenir chez C. gigas. La détermination de RI pourrait concerner la fréquence cardiaque mais également viser des mesures anatomiques comme les dimensions des compartiments et l'épaisseur des parois cardiaques, comme cela a déjà été le cas dans d'autres espèces animales, par exemple chez le chat sur la base de mesures réalisées en échocardiographie (Auriol 2011).

En prenant maintenant un peu de hauteur par rapport aux résultats que constituent les RI, il peut être intéressant de se poser la question de leur signification chez *C. gigas*. Comme mentionné en partie I § 6, la santé peut être perçue comme un équilibre précaire et le fait d'avoir, chez des animaux présumées en « bonne » santé, des valeurs biologiques « encadrées » dans un intervalle peut inspirer au moins deux hypothèses.

- La première est que *C. gigas* dispose de capacités de régulation de certaines fonctions physiologiques. Un prolongement possible de ces travaux pour étudier cette hypothèse serait d'aborder la vaste question de l'homéostasie et de la conformité chez les mollusques marins.
- La seconde est que les RI sont plus le reflet du couple « *C. gigas* milieu ». Dans les travaux de thèse, une attention particulière a été appliquée à maintenir les paramètres de milieu les plus stables possibles (température et salinité en particulier, origine et traitement de l'eau de mer également). Les variations du milieu ont ainsi été réduites, ce qui pourrait expliquer cet « encadrement » des valeurs biologiques ; il est important désormais d'étendre la détermination de RI chez *C. gigas* disposée dans d'autres conditions de milieu.

2.8. Vers la recherche sur le bien-être chez les mollusques marins

En 2002, l'OIE se voit confier la charge d'incorporer dans des Codes déjà existants des prescriptions relatives au bien-être animal, voire de proposer des recommandations spécifiques sur ce sujet. C'est ainsi que deux numéros de la revue scientifique et technique de l'OIE ont été consacrés à ce sujet (Bayvel et al. 2005, Mellor et Bayvel 2014) et que des recommandations ont été ajoutées au Code sanitaire pour les animaux terrestres (OIE 2018b) et à celui pour les animaux aquatiques (OIE 2018c); chez ce dernier le titre 7 est dédié au bien-être des poissons mais il n'existe pas d'équivalent pour les crustacés, les amphibiens et les mollusques aquatiques. Une norme ISO a également été publiée.

Un important travail de synthèse scientifique et réglementaire a été effectué par l'ANSES dans son avis du 16 février 2018 relatif au « Bien-être animal : contexte, définition et évaluation » (ANSES 2018) qui donne une vue d'ensemble sur l'état d'avancement de ce sujet d'intérêt. En écho à cet avis, l'INRA continue à développer des activités autour du bien-être animal, en particulier par le réseau AgriBEA (Dantzer et al. 2002) et a récemment crée un centre national de référence du bien-être animal (CNR BEA) qui a vocation à mettre en relation différents organismes partenaires sur ce sujet⁴. La création du CNR BEA, officialisée au cours de l'édition 2017 du Salon de l'agriculture, représente la première action du plan d'action prioritaire en faveur du bien-être animal défini par le ministère de l'Agriculture⁵.

Déjà envisagée en figure 2 de la partie II § 1, si dépasser l'étude de la seule santé biologique et envisager l'ensemble des dimensions de la santé devient une nouvelle ambition de recherche après la présente thèse, une des voies possibles pourrait être d'acquérir des connaissances sur le bien-être chez les mollusques marins.

3. Applications : diagnostiquer, pronostiquer et décider ?

Faire dialoguer la science et l'art médical, la recherche et la pratique ? Il est possible d'imaginer déjà quelques applications des travaux de recherche de la présente thèse, qui seront peut-être à l'origine de nouvelles idées de recherche.

3.1. Des outils de diagnostic et de pronostic chez C. gigas

Les biomarqueurs peuvent constituer des descripteurs utiles pour diagnostiquer voire pronostiquer un état de santé.

Une échelle clinique comme celle développée ici ou un score de prédiction clinique (CPR Clinical Prediction Rule en anglais, comme il pourrait en exister à l'avenir, après avoir précisé

⁴ http://institut.inra.fr/Partenaires/Monde-agricole-et-rural/Toutes-les-actualites/Centre-national-de-reference-pour-le-bien-etre-animal

⁵ https://agriculture.gouv.fr/20-actions-prioritaires-en-faveur-du-bien-etre-animal

les facteurs prédictifs et les déterminants de santé qui interviennent dans son élaboration), constituent des outils employables par un professionnel de santé (Gaspoz et Perneger 2001).

Les intervalles de référence demeurent des données de laboratoire, destinées avant tout aux laboratoires d'analyse médicale et/ou de recherche. Est-ce vraiment intéressant pour un professionnel de santé, clinicien ou un éleveur responsable de ces animaux ? Si une application au chevet des animaux est envisagée, il semble nécessaire de dépasser la détermination de RI dans une population de référence, et permettre de trancher sur le statut de santé chez une population au statut inconnu.

Pour préciser la santé, le suivi d'un seul biomarqueur n'est pas suffisant. L'ensemble des résultats (suivi de biomarqueurs mesurés et observés du vivant de l'animal et tests diagnostiques réalisés à partir d'échantillons prélevés sur l'animal) doivent être intégrés dans une approche (figure 34), inspirée de la démarche médicale, visant à donner le statut de santé (visée diagnostique) ou à le prédire (visée pronostique), pour aboutir à une décision (Masquelet 2006).

En employant l'échelle clinique de la présente thèse, il pourrait être déjà possible de déterminer une probabilité pré-test de pronostic (dès J2-J3, soit 3-4 jours avant la mort avérée si OsHV-1 est l'organisme pathogène impliqué dans la maladie). En complétant l'examen physique, par des mesures de biomarqueurs toujours chez les animaux vivants (dès J2-J3 si la mesure est réalisée sur l'OCR ou le CR), une nouvelle probabilité post-test biologique pourrait être estimée et affiner le pronostic.

Déjà à ce stade, cette approche (figure 34) pourrait être mise à profit, par exemple, en écloserie, pour deux applications (1) en quarantaine pour décider si ces animaux (géniteurs en particulier) peuvent rentrer dans l'écloserie et (2) au cours de l'élevage pour décider du maintien ou non de l'élevage sur des animaux suspects (gain de productivité par arrêt d'une bande d'élevage suspecte et reprise d'une nouvelle après nettoyage, désinfection, vide sanitaire).

Dans le cas où cette probabilité post-test ne permettrait pas de trancher sur l'état de santé, des analyses sur des prélèvements d'animaux réalisées par un laboratoire spécialisé en pathologie des mollusques pourraient apporter des éléments complémentaires de diagnostic et de pronostic.

3.2. Des outils de décision

Lien entre échelle clinique, score de prédiction clinique et score de décision clinique

D'après Herzig et al 2011 : « Avec la médecine fondée sur les preuves ou evidence based medicine (EBM) de nombreux scores cliniques prédictifs ou clinical prediction rules (CPR) sont développés chaque année par des chercheurs... Les CPR ont été développés à partir d'une combinaison de données cliniques récoltées auprès des patients (anamnèse, statuts, examens paracliniques) dans le but d'évaluer les probabilités diagnostiques ou pronostiques. L'évolution actuelle est marquée par l'essai de transformer ces scores prédictifs en scores décisionnels [Clinical Decision Rules CDR]... Peu de CPR proposent des décisions cliniques

mais se limitent à améliorer la démarche diagnostique ou pronostique prédictive. Leurs auteurs ne répondent que rarement à la question de l'attitude thérapeutique, sous-entendant implicitement qu'un diagnostic précis permettrait au clinicien de choisir la meilleure attitude ».

Liens entre intervalles de référence et limites de décision

D'après Petersen PH et al. 2012 et d'après Ozarda et al. 2018 il ne faut pas confondre intervalle de référence et limites de décision. La comparaison d'une valeur observée d'un biomarqueur à des valeurs et intervalles de référence d'un biomarqueur apporte des éléments d'information permettant d'émettre des hypothèses sur la santé mais ne permet pas de trancher. Il peut être utile de réaliser la même approche avec plusieurs biomarqueurs, mesurés et observés pour affiner ces orientations. Il convient enfin de définir la limite de décision médicale (DL). Murphy et Abbey (1967) en ont décrit le concept et Sunderman (1975) a défini des «valeurs de discrimination» et exposé leurs différences avec l'intervalle de référence. Comme l'expose Ozarda (2016), les DL sont des seuils au-dessus ou au-dessous desquels une décision médicale spécifique est recommandée et sont dérivées des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) et des valeurs prédictives (Sikaris 2014). Les DL s'appuient sur un questionnement diagnostique avec des études cliniques spécifiques pour définir la probabilité de la présence d'une certaine maladie ou d'un résultat différent. Ces limites conduisent à la décision que les individus avec des valeurs supérieures ou inférieures à la limite de décision devraient être traités différemment. Les DL sont définies par consensus et varient selon les populations. Il est important que les RI ne soient pas confondus avec les DL (Ceriotti et Henny 2008, Boyd 2010, Petersen et al. 2012, Sikaris 2012, Ceriotti 2017, CLSI 2008).

De cette application envisagée (figure 34) découle une nouvelle ambition de recherche après la présente thèse, celle de déterminer des limites de décision médicale pour les maladies affectant les mollusques marins.

Le rapport complexe entre santé et maladie reste à élucider mais comme dit Canguilhem (1966) :

« Être en bonne santé c'est pouvoir tomber malade et s'en relever,

c'est un luxe biologique. »

Aagaard A, Andersen BB, Depledge MH (1991). Simultaneous monitoring of physiological and behavioral activity in marine organisms using non-invasive, computeraided techniques. *Marine Ecology Progress Series*, 73, 277 - 282 p. https://doi.org/10.3354/meps073277.

Ackerman JD (1999). Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 1551-1561 p. https://doi.org/10.1139/f99-079.

Ackerman JD et Nishizaki MT (2004). The effect of velocity on the suspension feeding and growth of the marine mussels *Mytilus trossulus* and *M. californianus*: implications for niche separation. *Journal of Marine Systems*, 49, 195-207 p. https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2003.06.004.

Acosta A-L (2010). Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : biomarqueurs potentiels de stress environnemental. Sciences agricoles. Université de La Rochelle.

Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé (AFSSAPS) (2011). Les biomarqueurs, les produits de santé et l'Afssaps. Cahier d'acteur. Disponible sur : https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-desante/(offset)/0, consulté le 12/10/2018.

Aguirre-Velarde A, Jeana F, Thouzeau G, Flye-Sainte-Marie J (2016). Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 451, 385-389 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.030.

Aiello EL (1957). Factors affecting ciliary activity on the gill of the mussel *Mytilus edulis*. *Physiological Zoology*, 33(2), 120-135 p. https://doi.org/10.1086/physzool.33.2.30152299.

Akashige S, Hirata Y, Takayama K, Soramoto K (2005). Seasonal changes in oxygen consumption rates and filtration rates of the cultured Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 71(5), 762-767 p. http://dx.doi.org/10.2331/suisan.71.762.

Alunno-Bruscia M, Ponties A, Queau I, Petton S, Petton B (2016). Cardiac activity tested as a health indicator in oysters *Crassostrea gigas*: a first data set. VIBRIO 2016 - 7th Vibrio conference . 29 March-1st April, Roscoff

Alunno-Bruscia M, Petton S, Ratiskol D, Le Grand J, Queau I, Petton B (2017). Cardiac activity, filtration and respiration rates as non-invasive physiological indicators of the health status of the oyster *Crassostrea gigas*. Physiomar 2017 - The physiology of aquatic invertebrates in a changing world. 18-21 September 2017, Cambridge, UK.

Alunno-Bruscia M, Petton S, Daigle G, Ratiskol D, Le Grand J, Queau I, Petton B (2018). Cardiac activity, filtration and respiration rates as non-invasive physiological indicators of the oyster (*Crassostrea gigas*) susceptibility during a disease event. SFEcologie 2018 - international Conference on Ecological Sciences. October 22-25 2018, Rennes.

American Society for Veterinary Clinical Pathology - Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (ASVCP-QALS) (2011). Guidelines for the determination of reference intervals (RI) in veterinary species. Disponible sur : http://www.asvcp.org/pubs/pdf/RI%20Guidelines%20For%20ASVCP%20website.pdf, consulté le 11/09/2018.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (2018) Avis relatif au « Bien-être animal : contexte, définition et évaluation », saisine n° 2016-SA-0288, Paris, 34 p.

Atkins AJ, Magnuson WG, Colburn WA, Degruttola VG, Demets DL, Downing GJ, Hoth DF, Oates JA, Peck CC, Schooley RT, Spilker BA, Woodcock J, Zeger SL (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69, 89-95 p. https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989.

Auriol L (2011). Étude des intervalles de référence des mesures échocardiographiques chez le chat de race sphynx. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 120 p.

Azema P, Travers M-A, De Lorgeril J, Tourbiez D, Dégremont L (2015). Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Veterinary Research*, 46(139), 1-14 p. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0282-0.

Azema P, Travers M-A, Benabdelmouna A, Dégremont L (2016). Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 139, 92-101 p. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.002.

Azema P, Lamy J-B, Boudry P, Renault T, Travers M-A, Dégremont L (2017). Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*, 49(23), 1-16 p. https://doi.org/10.1186/s12711-017-0297-2.

Bacon GS, MacDonald B, Ward JE (1998). Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles I. Feeding activity and selection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219, 105-125 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00177-9.

Barber BJ, Ford SE, Haskin HH (1988a). Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. I. Condition index and relative fecundity. *Journal of Shellfish Research*, 7, 25-31 p.

Barber BJ, Ford SE, Haskin HH (1988b). Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. II. Tissue biochemical composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 91A, 603-608 p. http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(88)90641-X.

Barber BJ, Ford SE, Littlewood DTJ (1991). A physiological comparison of resistant and susceptible oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) exposed to the endoparasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber & Mackin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 146(1), 101-112 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90256-V.

Barbosa-Solomieu V, Renault T, Travers M-A (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2-10 p. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011.

Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D (1997). Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212(2), 149-172 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02756-6.

Barillé L, Héral M, Barillé-Boyer A-L (1997b). Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquatic Living Resources*, 10(1), 31-48 p. https://doi.org/10.1051/alr:1997004.

Barillé L, Lerouxel A, Dutertre M, Haure J, Barillé A-L, Pouvreau S, Alunno-Bruscia M (2011). Growth of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in a high-turbidity environment: Comparison of model simulations based on scope for growth and dynamic energy budgets. *Journal Of Sea Research*, 66(4), 392-402 p. https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.07.004.

Bass EL (1977). Influences of respiration and salinity on oxygen consumption of tissues in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 58B, 120-130 p. https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90096-7.

Bayne BL (1967). The respiratory response of *Mytilus perna* L. (Mollusca: Lamellibranchia) to reduced environmental oxygen. *Physiological Zoology*, 40 (3), 307-313 p. https://doi.org/10.1086/physzool.40.3.30152867.

Bayne BL (1971). Ventilation, the heart beat and oxygen uptake by *Mytilus edulis* L. in declining oxygen tension. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 40A, 1065-1085 p. https://doi.org/10.1016/0300-9629(71)90295-7.

Bayne B (1973). Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Netherlands Journal of Sea Research*, 7, 399-410 p. https://doi.org/10.1016/0077-7579(73)90061-6.

Bayne BL (2004). Comparison of measurements of clearance rates in bivalve molluscs. *Marine Ecology-Progress Series*. 276, 305-306 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps276305.

Bayne BL, Bayne CJ, Carefoot TC, Thompson RJ (1976). The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad. *Oecologia*, 22(3), 211-228 p.

Bayne BL, Widdows J, Newell RIE (1977). Physiological measurements on estuarine bivalve molluscs in the field. In: Keegan BF, Ceidigh PO, Boaden PJS. Biology of benthic organisms. Pergamon Press, Oxford, UK, 57-68 p.

Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E (1987). Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 111, 1-22 p. http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(87)90017-7.

Bayne BL, Iglesias JIP, Hawkins AJS, Navarro E, Heral M, Deslous-Paoli JM (1993). Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: responses to variation in quantity and organic content of the seston. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73, 813-829 p. https://doi.org/10.1017/S0025315400034743.

Bayne BL, Hedgecock D, McGoldrick D, Rees R (1999). Feeding behaviour and metabolic efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 233, 115-130 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00125-7.

Bayvel ACD, Rahman SA, Gavinelli A (2005) Bien-être animal : enjeux mondiaux, tendances et défis. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties*, 24 (2), 467-806 p.

Beiras R, Perez CA, Albentosa M (1994). Comparison of the scope for growth performance of *Ostrea edulis* seed reared at different food concentration in an open-flow system. *Marine Biology*, 119, 227-233 p. https://doi.org/10.1007/BF00349561.

Benabdelmouna A et Ledu C (2015). Autotetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) obtained using normal diploid eggs: induction and impact on cytogenetic stability. *Genome*, 58(7), 333-348 p. http://dx.doi.org/10.1139/gen-2015-0014.

Beninger PG, Veniot A. (1999). The oyster proves the rule: mechanisms of pseudofeces transport and rejection on the mantle of *Crassostrea virginica* and *C. gigas. Marine Ecology-Progress Series*, 190, 179-188 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps190179.

Beninger PG, St-Jean SD, Poussart Y (1995). Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology*, 123, 293-303 p. https://doi.org/10.1007/BF00353621.

Beninger PG, Veniot A, Poussart Y (1999). Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing. *Marine Ecology-Progress Series*, 178, 259-269 p. https://doi.org/10.3354/meps178259.

Beninger PG, Cannuel R, Jaunet S (2005). Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates. *Marine Ecology Progress Series*, 295, 191-199 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps295191.

Bézy O (2009). «La santé c'est la vie dans le silence des organes». *La revue lacanienne*, 3, 47-50 p. https://doi.org/10.3917/lrl.091.0047.

Bernard C (1865). Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. 1^{ère} edition, Baillière JP et fils, Librairie de l'Académie Impériale de Médecine, Paris, France. Disponible sur : https://www.irphe.fr/~clanet/otherpaperfile/articles/Bernard/bernard_introduction_etude_medecine experimentale.pdf, consulté le 11/09/2018.

Bernard FR (1984). La physiologie appliquée à la mariculture de certains bivalves (Mollusca) du Pacifique nord-est. *Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques*, 63, 26 p.

Bernard I (2011). Ecologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : vers une explication de la variabilité du captage. PhD Thesis, Université de La Rochelle, Ecole doctorale Gay Lussac. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00040/15155/.

Bertalanffy LV (1957). Quantitative laws on metabolism and growth. *The Quarterly Review of Biology*, 32(3), 217-231 p. https://doi.org/10.1086/401873.

Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquières G (1995). Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134(1), 143-154 p. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00036-2.

Bougrier S, Collet B, Geairon P, Geffard O, Héral M, Deslous-Paoli JM (1998). Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219, 205-216 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00181-0.

Bouxin H (1931). Influences des variations rapides de la salinité sur la consommation d'oxygène chez *Mytilus edulis* var. *galloprovincialis* (LMK). *Bulletin de l'Institut océanographique (Monaco)*, 569, 1-11 p.

Boyd JC (2010). Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian Journal of Andrology*, 12, 83-90 p. https://doi.org/10.1038/aja.2009.9.

Bower SM, McGladdery SE, Price IM (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish, *Annual Review of Fish Diseases*. 4, 1-199 p. https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0.

Bower SM (2010) Précis des maladies infectieuses et des parasites des fruits de mer exploités commercialement. Disponible sur : http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/index-fra.html, consulté le 18/12/2018.

Boyd JC (2010). Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian Journal of Andrology*, 12, 83-90 p. https://doi.org/10.1038/aja.2009.9.

Bricelj VM et Malouf RE (1984). Influence of algal and suspended sediment concentrations on the feeding physiology of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, 84, 155-165 p. https://doi.org/10.1007/BF00393000.

Browne MA, A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RC (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42 (13), 5026-5031 p. https://doi.org/10.1021/es800249a.

Bruce JR (1926). The respiratory exchanges of the mussel (*Mytilus edulis*). *Biochemical Journal*. 20, 829-846 p. https://doi.org/10.1042/bj0200829.

Burnett, NP, Seabra R, De Pirro M, Wethey DS, Woodin SA, Helmuth B, Zippay ML, Sarà G, Monaco C, Lima FP (2013). An improved noninvasive method for measuring heartbeat of intertidal animals. *Limnology Oceanography : Methods*, 11, 91 - 100 p. https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.91.

Buzin F (2011). Optimisation des conditions hydrobiologiques pour la conservation de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en système re-circulé. PhD Thesis, Université de Nantes. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00092/20350/.

Canguilhem G (1966). Le normal et le pathologique. PUF, Paris, France.

Cannon WB (1932). The Wisdom of the Body. 1^{ère} edition. Norton WW, New York, USA.

Cannuel R (2005). Bases biologiques de la production de deux Mollusques d'intérêt économique: reproduction chez *Megathura crenulata*, reproduction et développement chez *Crassostrea gigas*. PhD Thesis, Université de Nantes.

Casas SM, Lavaud R, La Peyre MK, Comeau LA, Filgueira R, La Peyre JF (2018). Quantifying salinity and season effects on eastern oyster clearance and oxygen consumption rates. *Marine Biology*, 165(90), 1 - 13 p. https://doi.org/10.1007/s00227-018-3351-x.

Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) (2017). L'essentiel sur l'imagerie médicale. Disponible sur : http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx, consulté le 17/12/ 2018.

Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales (CNRTL) (2018). Définition de la santé. Disponible sur : http://www.cnrtl.fr/definition/sant%C3%A9], consulté le 11/09/2018.

Ceriotti F et Henny J (2008). "Are my laboratory results normal?" Considerations to be made concerning Reference Intervals and Decision Limits. *The electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 19(2), 106-114 p.

Ceriotti F (2017). Quality specifications for the extra-analytical phase of laboratory testing: reference intervals and decision limits. *Clinical Biochemistry*, 50(10-11), 595-598 p. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.03.024.

Cheng A (1983). De la place de l'homme dans l'univers : la conception de la triade Ciel-Terre-Homme à la fin de l'antiquité chinoise. *Extrême-Orient, Extrême-Occident*, 3, 11-22 p. https://doi:10.3406/oroc.1983.893.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, document C28-A3. Troisième édition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline, document EP9-A281. Troisième édition, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.

Cognie B (2001). Alimentation de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg): étude des mécanismes de sélection des particules et des processus rétroactifs entre le bivalve et les microalgues. PhD Thesis, Université de Nantes.

Cognie B, Barillé L, Massé G, Beninger PG (2003). Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Ecology-Progress Series*, 250, 145-152 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps250145.

Cole BE, Thompson JK, Cloern JE (1992). Measurement of filtration rates by infaunal bivalves in a recirculating flume. *Marine Biology*, 113, 219-225 p. https://doi.org/10.1007/BF00347274.

Collier A (1959). Some observations on the respiration of the American oyster *Crassostrea* virginica (Gmelin). Publications of the Institute of Marine Science University of Texas, 6, 92-108 p.

Contandriopoulos A-P (2006). Eléments pour une « topographie » du concept de santé. Ruptures, revue transdisciplinaire en santé, 11(1), 86-99 p.

Cottreel M-A (2015). Santé individuelle et santé publique. Disponible sur : http://scenari.crdp-limousin.fr/stss/pole1_chapitre1/co/chap1pole1STSS_.html, consulté le 11/09/2018.

Couchoud C et Labeeuw M (2009). Un score clinique pour prédire le pronostic à 6 mois des patients âgés mis en dialyse. *Néphrologie & Thérapeutiques*. 5 : 133-136 p.

Coughlan J (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*, 2, 356-358 p. https://doi.org/10.1007/BF00355716.

Cousteaux A-S (2010). Représentations de la santé et cycle de vie. De la recherche du bienêtre au maintien des capacités. OSC Sciences Po/CNRS, Notes & Documents, 2010-01. Disponible sur: https://spire.sciencespo.fr/notice/2441/4cgs0k1ujo94dpgd74pg7hoss9, consulté le 11/09/2018.

Cranford PJ et Gordon DC (1992). The influence of dilute clay suspensions on sea scallop (*Placopecten magellanicus*) feeding activity and tissue growth. *Netherlands Journal of Sea Research*, 30, 107-120 p. https://doi.org/10.1016/0077-7579(92)90050-O.

Cranford PJ et Hill PS (1999). Seasonal variation in food utilization by the suspension – feeding bivalve molluscs *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus*. *Marine Ecology Progress Series*, 190, 223-239 p. https://doi.org/10.3354/meps190223.

Cranford PJ, Armsworthy SL, Mikkelsen O, Milligan TG (2005). Food acquisition responses of the suspension - feeding bivalve *Placopecten magellanicus* to the flocculation and settlement of a phytoplankton bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326, 128-143 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.012.

Cranford PJ, Ward JE, Shumway SE (2011). Bivalve Filter Feeding: Variability and Limits of the Aquaculture Biofilter. In: Shumway SE (2011). Shellfish, Aquaculture and the Environment Wiley-Blackwell, .81-124 p. https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch4.

Cummings J, Ward TH, Dive C (2010). Fit-for-purpose biomarker method validation in anticancer drug development. *Drug Discovery Today*, 15(19-20), 816-25 p. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.07.006.

Dahlgren G et Whitehead M (1991). Policies and strategies to promote social equity in health. Background document to WHO, Strategy paper for Europe. Institute of Futures Studies, 67 p. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/5095964_Policies_and_strategies_to_promote_s ocial_equity_in_health_Background_document_to_WHO_-_Strategy_paper_for_Europe, consulté le 11/09/2018.

Dame RF (1972). The Ecological energies of growth, respiration and assimilation in the Intertidal American Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 17, 243-250 p. https://doi.org/10.1007/BF00366299.

Dantzer R, Lévy F, Veissier I (2002). Les recherches sur le bien-être animal à l'INRA : bilan et perspectives du réseau AGRIBEA. INRA, 16 p. Disponible sur : https://www6.inra.fr/agri_bien_etre_animal/Le-reseau-AgriBEA/Axes-prioritaires.

Davenel A, González R, Suquet M, Quellec S, Robert R (2010). Individual monitoring of gonad development in the European flat oyster *Ostrea edulis* by in vivo magnetic resonance imaging. *Aquaculture*, 307(1-2), 165-169 p. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.013.

Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86, 41-53 p. https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0.

Defossez J-M et Hawkins AJS (1997). Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis, Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus. Marine Biology*, 129, 139-147 p. https://doi.org/10.1007/s002270050154.

Dégremont L, Bedier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain J-F, Boudry P (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 249(1-4), 213-229 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.046.

Dégremont L (2011). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, 317(1-4), 94-98 p. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.029.

Dégremont L, Nourry M, Maurouard E (2015a). Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture*, 446, 111-121 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.029.

Dégremont L, Garcia C, Allen Standish K Jr (2015b). Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 226-241 p. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.010.

Dégremont L, Lamy J-B, Pepin J-F, Travers M-A, Renault T (2015c). New Insight for the Genetic Evaluation of Resistance to Ostreid Herpesvirus Infection, a Worldwide Disease, in *Crassostrea gigas. Plos One*, 10(6), 1-12 p. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127917.

De Gruttola VG, Clax P, De Mets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL (2001). Considerations in the evaluation of surrogate endpoints inclinical trials: summary of a National Institutes of Health Workshop. *Controlled Clinical Trials*, 22(5), 485-502 p. https://doi.org/10.1016/S0197-2456(01)00153-2.

De Lafontaine Y, Gagne F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*, 50, 51-71 p. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00094-6.

Delpech M (2011). L'identification des biomarqueurs. *Revue du Rhumatisme*, 78, 161-164 p. https://doi.org/10.1016/S1169-8330(11)70032-1.

Depledge MH, Andersen BB (1990). A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 96(4), 473 - 477 p. https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90664-E.

Dever GEA (1976). An epidemiological model for health policy analysis. *Social Indicators Research*, 2(4), 453-466 p. https://doi.org/10.1007/BF00303847.

Denis L, Alliot E, Grzebyk D (1999). Clearance rate responses of Mediterranean mussels to variations in the flow, water temperature, food quality and quantity. *Aquatic Living Resources*, 12, 279-288 p. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)86639-5.

Deslous - Paoli J-M, Héral M, Goulletquer P, Boromthanarat W, Razet D, Garnier J, Prou J, Barillet L (1987). Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles. *Océanis*, 13 (4–5), 575-579 p.

De Wachter B et McMahon B (1996). Haemolymph flow distribution, cardiac performance and ventilation during moderate walking activity in *Cancer magister* (Dana) (Decapoda, Crustacea). *The Journal of Experimental Biology*, 199(3), 627 – 33 p.

D'Houtaud A (2003). L'image sociale de la santé. Recherches sociales. L'Harmattan, Collection logiques sociales, Paris, France.

Dolmer P (2000). Feeding activity of mussels *Mytilus edulis* related to near - bed currents and phytoplankton biomass. *Journal of Sea Research*, 44, 221-231 p. https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00052-6.

Drulhe M (1997). Santé et société : le façonnement social de la santé. PUF, Paris, France.

Dupuy C, Le Gall S, Hartmann HJ, Breret M (1999). Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology-Progress Series*, 177, 165-175 p. https://doi.org/10.3354/meps177165.

Dupuy C, Vaquer A, Lam - Höai T, Rougier C, Mazouni N, Lautier J, Collos Y, Le Gall S (2000). Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural phytoplankton community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Marine Ecology Progress Series*, 205, 171-184 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps205171.

Durkheim É (1893). De la division du travail social. Réédition 2007, PUF, Collection Quadrige, Paris, France.

Durrieu G, Pham Q-K, Foltête A-S, Maxime V, Grama I, Le Tilly V, Duval H, Tricot J-M, Naceur CB, Sire O (2016). Dynamic extreme values modeling and monitoring by means of sea shores water quality biomarkers and valvometry. Environmental Monitoring and Assessment, 188(7), 401 – 408 p. https://doi.org/10.1007/s10661-016-5403-3.

Dutertre M, Beninger PG, Barillé L, Papin M, Rosa P, Barillé A-L, Haure J (2009). Temperature and seston quantity and quality effects on field reproduction of farmed oysters, *Crassostrea gigas*, in Bourgneuf Bay, France. *Aquatic Living Resources*, 22(3), 319-329 p. https://doi.org/10.1051/alr/2009042.

Dwyer III JJ et Burnett LE (1996). Acid—base status of the oyster *Crassostrea virginica* in response to air exposure and to infections by *Perkinsus marinus*. *The Biological Bulletin*, 190, 139-147 p. https://doi.org/10.2307/1542682.

Echevarria M, Naar JP, Tomas C, Pawlik JR (2012). Effects of *Karenia brevis* on clearance rates and bioaccumulation of brevetoxins in benthic suspension feeding invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 106-107, 85-94 p. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.011.

European Medicines Agency (EMA) (2010). Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and assays in the context of drug development. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-co-development-pharmacogenomic-biomarkers-assays-context-drug-development_en.pdf, consulté le 09/10/2018.

Evans RG et Stoddart GL (1990). Producing health, consuming healthcare. *Social science and Medicine*, 31(12), 1347-1363 p. https://doi.org/10.1016/0277-9536(90)90074-3.

Evans RG, Barer M, Marmor T. (1996). Être ou ne pas être en bonne santé : Biologie et déterminants sociaux de la maladie. John Libbey Eurotexte et Les Presses de l'Université de Montréal, Paris et Montréal, France et Canada.

Eymard C, Vial M, Thuilier O (2004). Le travail de fin d'étude : s'initier à la recherché en soins et santé ? Lamarre, Rueil-Malmaison, France.

Famme P (1980). Effect of shell valve closure by the mussel *Mytilus edulis* L. on the rate of oxygen consumption in declining oxygen tension. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67A(1), 167-170 p. https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90423-5.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1950-2016). Global Aquaculture Production *Crassostrea gigas*. Disponible sur : http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/fr, consulté le 11/09/2018.

Fedotov VP, Kholodkevich SV, Strochilo AG (2000). Study of contractile activity of the crayfish heart with the aid of a new non-invasive technique. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 36(3), 288-293 p. https://doi.org/10.1007/BF02737045.

Fernández B, Albentosa M, Viñas L, Franco A, Gonzàlez JJ, Campillo JA (2010). Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte (Galicia, NW Spain) by means of mussel chemical, biochemical and physiological parameters. *Ecotoxicology*, 19, 735-750 p. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0450-y.

Filgueira R, Labarta U, Fernandez-Reiriz MJ (2006). Flow-through chamber method for clearance rate measurements in bivalves: design and validation of individual chambers and mesocosm. *Limnology and Oceanography Methods*, 4, 284-292 p. https://doi.org/10.4319/lom.2006.4.284.

Flahauw E (2013). Caractérisation génétique de l'effort reproducteur de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités estivales de juvéniles : Approch QTL. PhD Thesis, Université de La Rochelle, Ecole doctorale Gay Lussac. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00233/34377/

Flatland B, Freeman KP, Friedrichs KR, Vap LM, Getzy KM, Evans EW, Kendal E Harr (2010). ASVCP Quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Veterinary Clinical Pathology*, 39, 264-277 p. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00251.x.

Floch A (1994). Un capteur biologique original enregistrant les mouvements valvaires des mollusques bivalves. PhD Thesis, Ecole Nationale Vétérinaire Nantes. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00442/55377/

Flye-Sainte-Marie J, Pouvreau S, Paillard C, Jean F (2007). Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349, 378-389 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.05.029.

Foster-Smith RL (1975). The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* (L.), *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 17, 1-22 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90075-1.

Foucault M (1963). Naissance de la Clinique. PUF, Paris, France.

François C, Quellec S, Collewet G, Peyramaure P, Musse M, Lamy J-B, Sauriau P-G, Haure J (2017). High-throughput phenotyping of health biomarkers in *Crassostrea gigas* by magnetic resonance imaging. Physiomar 17. 18-21 Septembre 2017, Cambridge, UK. Disponible sur: https://archimer.ifremer.fr/doc/00404/51553/.

Frank DM, Hamilton JF, Ward JE, Shumway S (2007). A fiber optic sensor for high resolution measurement and continuous monitoring of valve gape in bivalve molluscs. *Journal of Shellfish Research*, 26, 575-580 p. https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[575:AFOSFH]2.0.CO;2.

Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441-453 p. https://doi.org/10.1111/vcp.12006.

Fuentes-Arderiu X, Mas-Serra R, Aluma-Trullas A, Marti-Marcet MI, Dot-Bach D (2004). Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42, 778 - 782 p. https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.130.

Gale LD, Manzi JJ, Crosby MP (1991). Energetic costs to the eastern oyster *Crassostrea* virginica due to recent parasitism by the ectoparasitic gastropod Boonea impressa. *Marine Ecology Progress Series*, 79, 89-98 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps079089.

Galtsoff PS (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin .*Fishery Bulletin*, 64, 1-480 p. https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.2.0312.

Galtsoff PS et Wipple DV (1930). Oxygen consumption of normal and green oysters. *Bulletin of the United States Bureau of Fisheries*, 46, 489-508 p.

Gardner JPA et Thompson RJ (2001). The effects of coastal and estuarine conditions on the physiology and survivorship of the mussel *Mytilus edulis* and *M. trossulus* and their hybrids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265, 119-140 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00328-8.

Garnier M, Labreuche Y, Nicolas JL (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 358-365 p. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003.

Garric J, Morin S, Vincent-Hubert F (2010). Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux & Territoires*, 1, 12-17 p. https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2010.1.03.

Gaspoz JM et Perneger T (2001). Les scores de prediction Clinique : définition, dérivation, validation et limites. Revue Médicale Suisse. 2366(3), 21703 p. Disponible sur : https://www.revmed.ch/RMS/2001/RMS-2366/21703.

Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Condorcet D, Trumel C, Braun J-P (2009). Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(3), 288-298 p. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00179.x.

Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C (2011). Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1), 107-112 p. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00287.x.

Geffré A, Condorcet D, Trumel C, Braun J-P (2011b). Validation of preexisting reference intervals: can the procedure be applied to canine hemostasis? *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23, 343-347 p. https://doi.org/10.1177/104063871102300225.

Gerdes D (1983). The Pacific oyster *Crassostrea gigas* Part I. Feeding behaviour of larvae and adults. *Aquaculture*, 31, 195-219 p. https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90313-7.

Ghiretti F (1966). Respiration In: Wilburg KM, Yonge CM (Eds) Physiology of Mollusca, volume II, Academic Press, New York San Francisco, London, 175-208 p.

Gibbs EPJ (2014). The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. Veterinary Record, 174(4), 85-91 p. http://dx.doi.org/10.1136/vr.g143.

Goldberg M, Zins M (2012). Apport des cohortes à la connaissance de la santé. Actualité et dossier en santé publique, 78 : 52 p.

Goulletquer P, Wolowicz M, Latala A, Geairon P, Huvet A, Boudry P (1999). Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquatic Living Resources*, 12 (4), 271-277 p. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)86638-3.

Gräsbeck R et Saris NE (1969). Establishment and use of normal values. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 26(Suppl 110), 62-63 p.

Gray JMA (1924). The mechanism of ciliary movement.—IV. The relation of ciliary activity to oxygen consumption. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 96, 95-114 p. https://doi.org/10.1098/rspb.1924.0013.

Griffiths CL et King JA (1979). Some relationships between size, food availability and energy balance in the ribbed mussel *Aulacomya ater*. *Marine Biology*, 51, 141-149 p. https://doi.org/10.1007/BF00555193.

Grieshaber MK, Kreutzer U, Pörtner HO (1988). Critical PO₂ of euryoxic animals. *In*: Oxygen sensing in tissues, Publisher: Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Editors: Acker H. 37-48 p.

Grimm V et Wissel C (1997). Babel, or the ecological stability discussions: an inventory and analysis of terminology and a guide for avoiding confusion. *Oecologia*, 109(3), 323-334 p. https://doi.org/10.1007/s004420050090.

Grunkemeier GL et Jin R (2001). Receiver Operating Characteristic Curve Analysis of Clinical Risk Models. *The Annals of Thoracic Surgery*. 72: 323-326 p.

Gueguen M (2009). Modélisation de la détoxication de mollusques bivalves contenant des phycotoxines paralysantes ou diarrhéiques / Detoxification modelling of bivalves containing paralytic and diarrhoeic phycotoxins. PhD Thesis, Université de Nantes.

Guessous I et Durieux-Paillard S (2010). Validation des scores cliniques : notions théoriques et pratiques de base. *Revue Médicale Suisse*, 6, 1798-1802 p.

Guillot D (2016). Un scanner pour les produits de la mer. Produits de la mer, 165, 34 p.

Gultekin DH et Gore JC (2005). Temperature dependence of nuclear magnetization and relaxation. *Journal of Magnetic Resonance*, 172(1), 133-141 p. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2004.09.007.

Gunn-Christie RG, Flatland B, Friedrichs KR, Szladovits B, Harr KE, Ruotsalo K, Knoll JS, Wamsley HL, Freeman KP (2012). ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical, analytical, and postanalytical factors for urinalysis, cytology, and clinical

chemistry in veterinary laboratories. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1). 18-26 p. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00412.x.

Guo X, DeBrosse GA, Allen, SK (1996). All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142(3), 149-161 p. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01243-5.

Hansel BW, Dolmer P, Vismann B (2011). *In situ* method for measurements of community clearance rate on shallow water bivalve populations. *Limnology and Oceanography: Methods,* 9, 454-459 p. http://dx.doi.org/10.4319/lom.2011.9.454.

Hatt PJ, Davenel A, Eliat PA, Quellec S (2009). Magnetic resonance imaging as a means to assess the body growth and the gonad development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 22(3) 331-339 p. https://doi.org/10.1051/alr/2009038.

Haure J, Penisson C, Bougrier S, Baud J-P (1998). Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture*, 169(3-4), 211-224 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00383-4.

Haure J, Huvet A, Palvadeau H, Nourry M, Penisson C, Martin JLY, Boudry P (2003). Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218(1), 539-551 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00493-3.

Haure J, Fortin A, Dupuy B, Nourry M, Palvadeau H, Papin M, Penisson C, Martin J-L (2003b). Etude comparative des caractéristiques écophysiologiques et des performances de croissance de l'huître creuse Crassostrea gigas diploïde et triploïde en milieu contrôlé. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1509/.

Hawkins AJS, Smith RFM, Bayne BL, Héral M (1996). Novel observations underlying the fast growth of suspension - feeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 131, 179-190 p. https://doi.org/10.3354/meps131179.

Hawkins AJS, Smith RFM, Tan SH, Yasin ZB (1998). Suspension - feeding behaviour in tropical bivalve molluscs: *Perna viridis, Crassostrea belcheri, Crassostrea iradelei, Saccostrea cucculata* and *Pinctada margarifera*. *Marine Ecology Progress Series,* 166, 173-185 p. https://doi.org/10.3354/meps166173.

Hawkins AJS , James MR, Hickman RW, Hatton S, Weatherhead M (1999). Modelling of suspension - feeding and growth in the green - lipped mussel *Perna canaliculus* exposed to natural and experimental variations of seston availability in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*, 191, 217-232 p. https://doi.org/10.3354/meps191217.

Hawkins AJS, Fang JG, Pascoe PL, Zhang JH, Zhang XL, Zhu MY (2001). Modelling short - term responsive adjustments in particle clearance rate among bivalve suspension - feeders:

separate unimodal effects of seston volume and composition in the scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 262, 61-73p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00282-9.

Hégaret H, Wikfors GH, Shumway SE (2007). Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research*, 26, 549-559 p. https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2.

Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (2004). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 471. Rome, FAO. 177p.

Herzlich C (1969). Santé et maladie, analyse d'une représentation sociale. Réédition 2005, EHESS, Paris, France.

Herzlich C et Pierret J (2010). Au croisement de plusieurs mondes : la constitution de la sociologie de la santé en France (1950-1985). Revue française de sociologie, 51(1), 121-148 p. https://doi.org/10.3917/rfs.511.0121.

Herzig L, Bischoff T, Favrat B, Vaucher P, Gencer B, Mühlemann (2011). Développement, implémentation, utilisation pratique d'un score diagnostique. *Revue Médicale Suisse*, 7, 1078-1083 p.

Hewitt JE et Pilditch CA (2004). Environmental history and physiological state influence feeding responses of *Atrina zelandica* to suspended sediment concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306, 95-112 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.003.

His E, Robert R, Dinet A (1989). Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100(4), 455-463 p. https://doi.org/10.1007/BF00394822.

Holling CS (1973). Resilience and Stability of Ecological Systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4, 1-23 p. https://doi.org/10.1146/annurev.es.04.110173.000245.

Hopkins HS (1946). The influence of season, concentration of sea water and environmental temperature upon the oxygen consumption of tissues in *Venus mercenaria*. *Journal of Experimental Zoology*, 102(2), 143-158 p. https://doi.org/10.1002/jez.1401020202.

Hunt E et Lavoie A-M (2011). Les méthodes de recherche quantitatives et qualitatives peuvent-elles déjà coexister ? *Recherche en soins infirmiers*, 105, 25-30 p. https://doi.org/10.3917/rsi.105.0025.

Hutchison S et Hawkins LE (1992). Quantification of the physiological responses of the European flat oyster *Ostrea edulis* L. to temperature and salinity. *Journal of Molluscan Studies*, 58, 215-226 p. http://dx.doi.org/10.1093/mollus/58.2.215.

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) (2018). Les agents pathogènes affectant les mollusques marins. Fiches pédagogiques. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00439/55015/, consulté le 18/12/2018.

Iglesias JIP, Navarro E, Alvarez PJ, Armentia Y (1992). Feeding, particle selection and absorption in cockles *Cerastoderma edule* (L) exposed to variable conditions of food concentration and quality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 162, 177-198 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90200-T.

Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) (2016). IMAGIGAS Compte-rendu d'analyse des résultats du 23 juin 2016, équipe IRM Food ,15 pp.

Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) (2017). IMAGIGAS Compte-rendu d'analyse des résultats du 20 octobre 2016, équipe IRM Food , 15 pp.

Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) (2017b). IMAGIGAS Compte-rendu d'analyse des résultats du 20 juin 2017, équipe IRM Food, 6 pp.

James MR, Weatherhead MA, Ross AH (2001). Size - specific clearance, excretion, and respiration rates, and phytoplankton selectivity for the mussel *Perna canaliculus* at low levels of natural food. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35, 73-86 p. http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2001.9516979.

Jansen JM, Pronker AE, Kube S, Sokolowski A, Sola JC, Marquiegui MA, Schiedek D, Bonga SW, Wolowick M, Hummel H (2007). Geographic and seasonal patterns and limits on the adaptive response to temperature of European *Mytilus* spp. and *Macoma balthica* populations. *Oecologia*, 154, 23–34 p. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0808-x.

Jørgenson CB (1990). Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark, 140 p.

Jørgenson CB (1996). Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 142, 287-302 p. https://doi.org/10.3354/meps142287.

Jørgensen CB, Møhlenberg F, Sten-Knudsen O (1986). Nature of relation between ventilation and oxygen consumption in filter feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 29, 73-88 p.

Jørgenson CB, Larsen PS, Riisgård HU (1990). Effects of temperature on the mussel pump. *Marine Ecology Progress Series*, 64, 89-97 p. https://doi.org/10.3354/meps064089.

Lalonde M (1974). Nouvelle perspective de la santé des canadiens. Un document de travail. Disponible sur : http://nccdh.ca/fr/resources/entry/new-perspective-on-the-health-of-canadians, consulté le 11/09/2018.

Lange R (1968). The relation between the oxygen consumption of isolated gill tissue of the common mussel, *Mytilus edulis* L and salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2, 37-45 p. http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(68)90012-9.

Laporte S (2014). Comment élabore-t-on un score clinique, un score de risque ? *Journal des Maladies Vasculaires*, 39(2), 94 p. https://doi.org/10.1016/j.jmv.2013.12.108.

Larsen PS et Riisgård HU (2009). Viscosity and not biological mechanisms often controls the effects of temperature on ciliary activity and swimming velocity of small aquatic organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 381, 67-73 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.09.021.

Lavezzari G et Womack AW (2016). Industry Perspectives on Biomarker Qualification. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 99(2), 208-213 p. https://doi.org/10.1002/cpt.264.

Le Deuff RM et Renault T (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas. Journal of General Virology*, 80, 1317-1322 p. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1317.

Lee Y-J, Han E, Wilberg MJ, Lee WC, Choi K-S, Kang C-K (2018). Physiological processes and gross energy budget of the submerged longline-cultured Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a temperate bay of Korea. *PLoS ONE*, 13(7), 1-24 p. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199752.

Le Gall S, Hassen MB, Le Gall P (1997). Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 301-306 p. https://doi.org/10.3354/meps152301.

Le Moullac G, Quéau I, Le Souchu P, Pouvreau S, Moal J, Le Coz JR, Samain JF (2007). Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research*. 3(5), 357-366. https://doi.org/10.1080/17451000701635128.

Levinton JS, Ward JE, Shumway SE (2002). Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Marine Biology*, 141, 367-376 p. https://doi.org/10.1007/s00227-002-0830-9.

Loret P, Gall SL, Dupuy C, Blanchot J, Pastoureaud A, Delesalle B, Caisey X, Jonquières G (2000). Heterotrophic protists as a trophic link between picocyanobacteria and the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Aquatic Microbial Ecology*, 22, 215-226 p. https://doi.org/10.3354/ame022215.

Loveland RE et Chu DSK (1969). Oxygen consumption and water movement in *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29, 173-184 p. http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X(69)91733-2.

Lucas T, Musse M, Bornert M, Davenel A, Quellec S (2012). Temperature mapping in bread dough using SE and GE two-point MRI methods: experimental and theoretical estimation of uncertainty. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(3), 431-445 p. https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.09.004.

Kenny D, Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Kallner A (1999). Consensus agreement. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59, 585 p. https://doi.org/10.1080/00365519950185409.

Kittner C et Riisgård HU (2005). Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for temperature compensation. *Marine Ecology Progress Series*, 305, 147-152 p. https://doi.org/10.3354/meps305147.

Kjelgaard-Hansen M et Jensen AL (2010). Subjectivity in defining quality specifications for quality control and test validation. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(2), 134-135 p. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00232 2.x.

Koehn RK et Shumway SE (1982). A genetic/ physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine biology letters*, 3, 35-42 p.

Krogh A (1914). The quantitative relation between temperature and standard metabolism in animals. *Internationale Zeitschrift für Physikalische - Chemische Biologie*, 1, 491-508 p.

Kruger F (1960). Zur Frage der Grössenabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von *Mytilus edulis* L. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 7, 125-148 p. https://doi.org/10.1007/BF01626179.

MacDonald BA et Ward JE (1994). Variation in food quality and particle in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Ecology Progress Series*, 108, 251-264 p. https://doi.org/10.3354/meps108251.

Maire O, Amouroux J-M, Duchêne J-C, Grémare A (2007). Relationship between filtration activity and food availability in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 152, 1293-1307 p. https://doi.org/10.1007/s00227-007-0778-x.

Mangnum C et Winkle VW (1973). Responses of aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. *American Zoologist*, 13, 529-541 p. http://dx.doi.org/10.1093/icb/13.2.529.

Mariette F, Collewet G, Davenel A, Lucas T, Musse M (2012). Quantitative MRI in Food Science & Food Engineering. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons. 8 p.

Marrer E et Dieterle F (2007). Promises of biomarkers in drug development – A reality check. *Chemical Biology & Drug Design*, 69, 381-94 p. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00522.x.

Martin J-L, Haure J, Thebault A, Goulletquer P (2003). Impact de la pollution aux hydrocarbures sur l'écophysiologie et la pathologie des bivalves d'intérêt commercial de la Côte Atlantique. Actes du Séminaire LITEAU, Paris, 20-22 janvier 2003, 4 p. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3308/.

Masquelet A (2006). Les grandes étapes de la démarche médicale. In : Alain-Charles Masquelet éd., Le raisonnement médical (pp. 7-16). Paris cedex 14, France: Presses Universitaires de France.

Maurice M (1996). L'écotoxicologie appliquée au milieu marin. Rapport R.INT.DEL/96.11/NANTES. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00123/23412/.

McDowell I (2017). Définitions de la santé. Disponible sur : https://www.med.uottawa.ca/sim/data/Health Definitions f.htm, consulté le 11/09/2018.

Mcfarland K, Donaghy L, Volety AK (2013). Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions*, 8, 299-310 p. http://dx.doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06.

Mellor DJ, Bayvel ACD (2014). Bien-être animal : quelles évolutions ? Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties, 33 (1), 11 – 357 p.

Meyhöfer E (1985). Comparative pumping rates in suspension-feeding bivalves. *Marine Biology*, 85, 137-142 p. https://doi.org/10.1007/BF00397432.

Mias L (1996). Qu'est-ce que la santé ? Disponible sur : http://papidoc.chic-cm.fr/565definirsante.html, consulté le 11/09/2018.

Mitchell PH (1914). The oxygen requirements of shellfish. *Bulletin of the United States Bureau of Fisheries*, 32, 207-222 p.

Montaigne M (1595). Essais livre III chapitre XIII. Disponible sur : https://fr.wikisource.org/wiki/Essais/Livre III/Chapitre 13, consulté le 11/09/2018.

Montes MO, Hanna SK, Lenihan HS, Keller AA (2012). Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *Journal of Hazardous Materials*, 225-226, 139-145 p. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.009.

Morga B, Picot S, Faury N, Dégremont L, Renault T, Lupo C, Travers M-A (2019). Does first barrier passage shunt matter in disease reproduction? Update from OsHV-1 infection in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. *In press*.

Morin M (2006). Nouvelles définitions de la santé : un regard psychosocial. *Spirale*, 37(1), 29-41 p. https://doi.org/10.3917/spi.037.41.

Mubiana VK et Blust R (2007). Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 63, 219-235 p. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005.

Murphy EA et Abbey H (1967). The normal range-a common misuse. *Journal of Chronic Disease*, 20, 79-88 p. https://doi.org/10.1016/0021-9681(67)90099-9.

National Research Council (NRC) (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3-9 p. https://doi.org/10.2307/3430428.

Navarro E, Iglesias JIP, Ortega MM (1992). Natural sediment as a food source for the cockle *Cerastoderma edule* (L.): effect of variable particle concentration on feeding, digestion and the scope for growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 156, 69-87 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90017-5.

Navarro E, Iglesias JIP, Ortega MM, Larretxea X (1994). The basis for a functional response to variable food quantity and quality in cockles *Cerastoderma edule* (Bivalvia Cardiidae). *Physiological Zoology*, 67, 468-496 p. https://doi.org/10.2307/30163859.

Navarro JM et González CM (1998). Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture*, 167, 315-327 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00310-X.

Navarro JM, Leiva GE, Martinez G, Aguilera C (2000). Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247, 67-83 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00140-4.

Navarro JM et Contreras AM (2010). An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Biology*, 157, 1967-1974 p. https://doi.org/10.1007/s00227-010-1465-x.

Newcombe CL, Miller CE, Chappel DW (1936). Preliminary report on respiratory studies in *Littorina irrorata*. *Nature*, 137, 33 p. https://doi.org/10.1038/137033a0.

Newell RIE (1985). Physiological effects of the MSX parasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber & Mackin) on the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*, 5(2), 91-95 p.

Newell RIE et Roy A (1973). A statistical model relating the oxygen consumption of a mollusk (*Littorina littorea*) to activity, body size and environmental conditions. *Physiological Zoology*, 46, 252-275 p. http://dx.doi.org/10.1086/physzool.46.4.30155609.

Newell RIE, Johson LG, Kofoed LH (1977). Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*. *Oecologia*, 30(2), 97-110 p. http://dx.doi.org/10.1007/BF00345414.

Newell RIE et Jordan SJ (1983). Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 13, 47-53 p. http://dx.doi.org/10.3354/meps013047.

Newell RIE, Paynter KT, Burreson EM (1994). Physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster *Crassostrea virginica*: feeding and metabolism (Abstract). *Journal of Shellfish Research*, 13, 294 p.

Newell RIE et Langdon CJ (1996). Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds). The Eastern oyster *Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Book, Maryland, 185-229 p.

Newell CR, Campbell DE, Gallagher SM (1998). Development of the mussel aquaculture lease site model MUSMOD ©: a field program to calibrate model formulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219, 143-169 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00179-2.

Newell CR, Pilskaln CH, Robinson SM, MacDonald BA (2005). The contribution of marine snow to the particle food supply of the benthic suspension feeder, *Mytilus edulis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321, 109-124 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.01.006.

Nicks B et Vandenheede M (2014). Santé et bien-être des animaux : équivalence ou complémentarité ? *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 33(1), 97-101 p. http://dx.doi.org/10.20506/rst.33.1.2261.

Nicolas JL, Garnier M, Gay M, Le Roux F (2002). Vibrio associated with juvenile oyster during summer mortality in France. *Journal of Shellfish Research*, 21, 419 p.

Nozawa A (1929). The normal and abnormal respiration in the oyster in the oyster, *Ostrea circumpicta* Pils. *Science Reports, Tôhoku Imperial University. Fourth Series*, IV(2), 315-325 p.

Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2011). Position française sur le concept « One Health/Une seule santé » : Pour une approche intégrée de la santé face à la mondialisation des risques sanitaires. Disponible sur : https://www.diplomatie.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_One_Health.pdf, consulté le 11/09/2018.

Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2018a). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. OIE, 8th Edition, 589 p. Disponible sur : http://www.oie.int/fr/normes/manuel-aquatique/acces-en-ligne/.

Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2018b) Code sanitaire pour les animaux terrestres. Disponible sur : http://www.oie.int/fr/normes/code-terrestre/acces-en-ligne/.

Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2018c) Code sanitaire pour les animaux aquatiques. Disponible sur : http://www.oie.int/fr/normes/code-aquatique/acces-en-ligne/.

Organisation mondiale de la santé (OMS) (1946). Constitution de l'Organisation Mondiale de la Santé. Disponible sur : http://www.who.int/governance/eb/who_constitution_fr.pdf, consulté le 11/09/2018.

Organisation mondiale de la santé (OMS) (1997). Déclaration de Jakarta. Disponible sur : http://www.who.int/healthpromotion/conferences/previous/jakarta/en/hpr_jakarta_declar ation fr.pdf, consulté le 11/09/2018.

Organisation mondiale de la santé (OMS) (1999). Glossaire de la promotion de la santé, Division de la promotion, de la communication pour la santé, service éducation sanitaire et promotion de la santé. Disponible sur http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_HPR_HEP_98.1_fre.pdf, consulté le 11/09/2018.

Organisation mondiale de la santé (OMS) (2005). Charte de Bangkok pour la promotion de la santé à l'heure de la mondialisation. Disponible sur : http://www.who.int/healthpromotion/conferences/6gchp/BCHP_fr.pdf, consulté le 11/09/2018.

Organisation mondiale de la santé – Commission des déterminants sociaux de la santé (OMS CDSS) (2009). Combler le fossé en une génération. Instaurer l'équité en santé en agissant sur les déterminants sociaux de la santé. Disponible sur : http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44083/9789242563702_fre.pdf?sequence =1&isAllowed=y, consulté le 11/09/2018.

Ozarda Y (2016). Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica*, 26(1), 5-16 p. https://doi.org/10.11613/BM.2016.001.

Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J (2018). Distinguishing reference intervals and clinical decision limits - A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(6), 420 – 431 p. https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1482256.

Pace DA, Marsh AG, Leong PK, Green AJ, Hedgecock D, Manahan DT (2006). Physiological bases of genetically determined variation in growth of marine invertebrate larvae: A study of growth heterosis in the bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335, 188-209 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.03.005.

Pautsina A, Kuklina I, Štys D, Císar P, Kozák P (2014). Non invasive crayfish cardiac activity monitoring system. *Limnology and Oceanography: Methods*, 12, 670 - 679 p. https://doi.org/10.4319/lom.2014.12.670.

Payton L (2017). Chronobiologie moléculaire et comportementale deshuîtres Crassostrea gigas diploïdes et triploïdes exposées à l'algue toxique Alexandrium minutum. Interactions entre organismes. Université de Bordeaux.

Petersen J, Bougrier S, Smaal A, Garen P, Robert S, Larsen JEN, Brummelhuis E (2004). Intercalibration of mussel *Mytilus edulis* clearance rate measurements. *Marine Ecology Progress Series*, 267, 187-194 p. https://doi.org/10.3354/meps267187.

Petersen PH, Jensen EA, Brandslund I (2012). Analytical performance, reference values and decision limits. A need to differentiate between reference intervals and decision limits and to define analytical quality specifications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(5), 819-831 p. https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0844.

PetitClerc C et Solberg HE (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *Clinica Chimica Acta*, 170, S1-S11 p. https://doi.org/10.1016/0009-8981(87)90150-1.

Peyramaure P (2017a). Traitement d'images IRM pour la quantification de la matière sèche à haut débit chez l'huître. Rapport de stage de 4^{ème} année Insa Rennes, 20 pp.

Peyramaure P (2017b). Traitement d'images IRM pour la quantification de la matière sèche à haut débit chez l'huître. Poster de soutenance de 4^{ème} année Insa Rennes.

Pichot A (2008). La santé et la vie. *Philosophia Scientiæ*, 12(2), 7-34 p. http://dx.doi.org/10.4000/philosophiascientiae.101.

Pierret J (1984). Les significations sociales de la santé : Paris, l'Essonne, l'Hérault ». In : Augé M, Herzlich C. Le sens du mal. Anthropologie. Histoire. Sociologie de la maladie. Éditions des Archives contemporaines Paris, France, 217-256 p.

Piferrer F, Beaumont A, Falguiere J-C, Flajshans M, Haffray P, Colombo L (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4), 125-156 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036.

Pilditch CA et Grant J (1999). Effect of variations in flow velocity and phytoplankton concentration on sea scallop (*Placopecten magellanicus*) grazing rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 240, 111-136 p. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00052-0.

Pôle interministériel de prospective et d'anticipation des mutations économiques (PIPAME) (2009). Réflexion prospective autour des biomarqueurs. Disponible sur : https://archives.entreprises.gouv.fr/2012/www.industrie.gouv.fr/p3e/etudes/bio/etudes11. html, consulté le 08/10 2018.

Plebani M, Padoan A, Lippi G (2015). Biological variation: back to basics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(2), 155-156 p. http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-1182.

Pörtner HO (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88, 137–146 p. https://doi.org/10.1007/s001140100216.

Powell EN, Bochenek EA, Klinck JM, Hofmann EE (2002). Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture*, 210(1), 89-117 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00891-2.

Pouvreau S, Jonquières G, Buestel D (1999). Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture*, 176, 295-314 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00102-7.

Pouvreau S, Bodoy A, Buestel D (2000). *In situ* suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: combined effects of body size and weather - related seston composition. *Aquaculture*, 181, 91-113 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486%2899%2900215-X.

Prins TC, Dankers N, Smaal AC (1994). Seasonal variation in the filtration rates of a semi - natural mussel bed in relation to seston composition 1. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 176, 69-86 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90198-8.

Raillard O (1991). Étude des interactions entre les processus physiques et biologiques intervenant dans la production de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) du bassin Marennes-Oléron : essais de modélisation. PhD Thesis, Université Paris 6. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00107/21855/

Read KRH (1962). Respiration of the bivalve Molluscs *Mytilus edulis* L. and *Brachidontes demissus plicatulus* Lam. as a function of size and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 7, 89-101 p.

Reipschläger A et Pörtner H-O (1996). Metabolic depression during environmental stress: The role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 1801-1807 p.

Ren JS, Ross AH, Schiel DR (2000). Functional descriptions of feeding and energetics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*, 208, 119-130 p. https://doi.org/10.3354/meps208119.

Renault T (2007). Tenter de maîtriser les maladies infectieuses chez les mollusques : une clé pour une aquaculture durable. Habilitation à diriger des travaux de Recherche. Disponible sur : http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3486/.

Réseau de pathologie des mollusques (REPAMO) (2009). Bilan 2008 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. Disponible sur https://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19709/. Consulté le 19/12/2018.

Richard M, Bourreau J, Montagnani C, Ouisse V, Gall P Le, Fortune M, Munaron D, Messiaen G, Callier MD, Roque E (2017). Influence of OsHV-1 oyster mortality episode on dissolved inorganic fluxes: An ex situ experiment at the individual scale. *Aquaculture*, 475, 40 -51 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.026.

Riisgård HU (2001). On measurement of filtration rates in bivalves: the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 275-291 p. https://doi.org/10.3354/meps211275.

Riisgård HU (2001b). Physiological regulation versus autonomous filtration in filter – feeding bivalves: starting points for progress. *Ophelia*, 54, 193-209 p. 10.1080/00785236.2001.10409465.

Riisgård HU et Seerup DF (2003). Filtration rates in the soft clam *Mya arenaria*: effects of temperature and body size. *Sarsia*, 88, 415-428 p. https://doi.org/10.1080/00364820310003208.

Riisgård HU, Kittner C, Seerup DF (2003). Regulation of the opening state and filtration rate in filter - feeding bivalves (*Cardium edule, Mytilus edulis, Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 284, 105-127 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00496-3.

Riisgård HU, Lüskow F, Pleissner D, Lundgreen K, Lopez MAP (2013). Effect of salinity on filtration rates of mussels *Mytilus edulis* with special emphasis on dwarfed mussels from the low-saline Central Baltic Sea. *Helgoland Marine Research*, 67, 591-598 p. https://doi.org/10.1007/s10152-013-0347-2.

Riisgård HU, Mulot M, Merino L, Pleissner D (2014). Effect of salinity-changing rates on filtration activity of mussels from two sites within the Baltic *Mytilus* Hybrid Zone. The Brackish Great Belt (Denmark) and the Low Saline Central Baltic Sea. *Open Journal of Marine Science*, 4, 101-109 p. http://dx.doi.org/10.4236/ojms.2014.42011.

Riva A et Massé H (1983). Etude écophysiologiquede quelques mollusques bivalves. Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier. 1983 IFREMER. Actes de Colloques n°1, 45-62 p. Disponible sur : https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1177/.

Rodhouse PG (1978). Energy transformations by the oyster *Ostrea edulis* L. in a temperate estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 34(1), 1-22 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(78)90053-9.

Romanetto J (2011). Intérêts des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincarré – Nancy 1. Disponible sur : https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739098.

Rustad P, Felding P, Lahti A (2004). Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42, 783 - 791 p. https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.131.

Saout C, Charbonnel B, Bertrand D, Cecchi-Tenerini R, Geffroy L, Mallet J-C (2008). Pour une politique nationale d'éducation thérapeutique du patient. Disponible sur :

https://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/084000578/index.shtml, consulté le 11/09/2018.

Saurel C, Gascoigne JC, Palmer MR, Kaiser MJ (2007). *In situ* mussel feeding behavior in relation to multiple environmental factors: regulation through food concentration and tidal conditions. *Limnology and Oceanography*, 52 (5), 1919-1929 p. https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.1919.

Scaros O et Fisler R (2005). Biomarker technology roundup: from discovery to clinical applications, a broad set of tools is required to translate from the lab to the clinic. *Biotechniques*, 38 (Suppl), 30-32 p. https://doi.org/10.2144/05384SU01.

Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H (2005). Optimal Cut-point and Its Corresponding Youden Index to Discriminate Individuals Using Pooled Blood Samples. *Epidemiology*. 16(1): 73-81 p.

Scott DM et Major CW (1972). The effect of copper (II) on survival, respiration, and heart rate in the Common BlueMussel, *Mytilus edulis. Biological Bulletin*, 143(3), 679-688 p. https://doi.org/10.2307/1540190.

Semba Prasetiya F (2015). Greening phenomenon in bivalve by marennine produced from *Haslea ostrearia* and its consequences on bivalve's integrated response. PhD Thesis, Université du Maine. Disponible sur : https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01279527.

Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y (2014). Testing the constant-volume hypothesis by magnetic resonance imaging of *Mytilus galloprovincialis* heart. *Journal of Experimental Biology*, 217(6), 964 - 973 p. https://doi.org/10.1242/jeb.092577.

Serré M (2002). De l'économie médicale à l'économie de la santé. Genèse d'une discipline scientifique et transformations de l'action publique. *Actes de la recherche en sciences sociales*, 143, 68-79 p. https://doi.org/10.3917/arss.143.0068.

Shumway SE (1982). Oxygen consumption in oysters: an overview. *Marine Biology Letters*, 3, 1-23 p.

Shumway SE (2009). Natural Environmental Factors. In: The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Publisher Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland. Eds Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF. 2nd edition (2009). 489-491 p.

Shumway SE et Koehn RK (1982). Oxygen Consumption in the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 9, 59-68 p. https://doi.org/10.3354/meps009059.

Siest G, Henny J, Schiele F (1981). Interprétation des examens de laboratoire : valeurs de référence et variations biologiques. Karger, Paris, France.

Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queralto JM, Petersen PH (2013). The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clinical Chemical and Laboratory Medicine*, 51(1), 47-64 p. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0682.

Sikaris K (2012). Application of the Stockholm Hierarchy to Defining the Quality of Reference Intervals and Clinical Decision Limits. *The Clinical Biochemist Reviews*, 33, 141-148 p.

Sikaris K (2014). Physiology and its importance for Reference Intervals. *The Clinical Biochemist Reviews*, 35, 3-14 p.

Silverman H, Lynn JW, Beninger PG, Dietz TH (1999). The role of latero-frontal cirri in particle capture by the gills of *Mytilus edulis*. *The Biological Bulletin*, 197, 368-376 p. https://doi.org/10.2307/1542791.

Smaal AC et Vonck APMA (1997). Seasonal variation in C, N and P budgets and tissue composition of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 153, 167-179 p. https://doi.org/10.3354/meps153167.

Sobral P et Widdows J (2000). Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245, 111-125 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00154-9.

Smaal AC, Vonck APMA, Bakker M (1997). Seasonal variation in physiological energetics of *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule* of different size classes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77, 817-838 p. https://doi.org/10.1017/S0025315400036213.

Solar O et Irwin A (2007). A conceptual framework for action on the social determinants of health. Discussion paper, WHO's Commission on social determinants of health. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/handle/10665/44489, consulté le 11/09/2018.

Solberg HE (1987). Approved recommendation on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170, 13-32 p. https://doi.org/10.1016/0009-8981(87)90151-3.

Solberg HE (1988). Approved recommendation on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 177, 1-12 p. https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90074-5.

Soletchnik P, Goulletquer P, Héral M, Razet D, Geairon P (1996). Evaluation du bilan énergétique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en baie de Marennes - Oléron (France). *Aquatic Living Resources*, 9, 65-73 p. https://doi.org/10.1051/alr:1996009.

Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Goulletquer P (1997). Écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse : réponses métaboliques (respiration)

et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources*, 10, 177-185 p. https://doi.org/10.1051/alr:1997019.

Soletchnik P, Goulletquer P, Cochennec N, Renault T, Geairon P (1998). Ecophysiological study on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* naturally infected by a *Chlamydia*-like microorganism: effect of infection level and diet on oyster physiological responses. *Haliotis*. $27, 1-19 \, \mathrm{p}$.

Stephen C et Karesh WB (2014). Le concept « une seule santé » donne-t-il des résultats ? *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 33(2), 381-396 p. http://dx.doi.org/10.20506/rst.33.2.2301.

Stickle WB et Duerr FG (1970). The effects of starvation on the respiration and major nutrient stores of *Thais lamellosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 33(3), 689-695 p. https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)90379-8.

Stickle WB (1971). The metabolic effects of starving *Thais lamellosa* immediately after spawning. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 40A(3), 627-634 p. https://doi.org/10.1016/0300-9629(71)90247-7.

Strohmeier T, Strand Ø, Cranford P (2009). Clearance rates of the great scallop (*Pecten maximus*) and blue mussel (*Mytilus edulis*) at low seston concentrations. *Marine Biology*, 156, 1781-1795 p. https://doi.org/10.1007/s00227-009-1212-3.

Stronks K, Dike van de Mheen H, Looman CWN, Mackenbach JP (1996). Behavioural and structural factors in the explanation of socio-economic inequalities in health: an empirical analysis. *Sociology of health & illness*, 18, 653-674 p. https://doi.org/10.1111/1467-9566.ep10934524.

Sunderman FW Jr (1975). Current concepts of "Normal values", "Reference values", and "Discrimination values" in clinical chemistry. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 21, 1873 - 1877 p.

Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet MEJ, Le Goïc N, Quillien V, Mingant C, Epelboin Y, Corporeau C, Guyomarch J, Robbens J, Paul-Pont I, Soudant P, Huvet A (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 2430-2435 p. https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113.

Tamayo D, Ibarrola I, Urrutxurtu I, Navarro E (2014). Physiological basis of extreme growth rate differences in the spat of oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biology*, 161(7), 1627-1637 p. https://doi.org/10.1007/s00227-014-2447-1.

Tang B et Riisgård HU (2018). Relationship between oxygen concentration, respiration and filtration rate in blue mussel *Mytilus edulis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 36(2), 395-404 p. https://doi.org/10.1007/s00343-018-6244-4.

Taylor AC et Brand AR (1975a). Effects of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve *Arctica islandica* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 19, 187-196 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90046-5.

Taylor AC et Brand AR (1975b). Comparative study of the respiratory responses of the bivalves *Arctica islandica* (L.) and *Mytilus edulis* L. to declining oxygen tension. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 190, 443-456 p. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1975.0105.

Thomas Y, Flye-Sainte-Marie J, Chabot D, Aguirre-Velarde A, Marques Gonçalo M, Pecquerie L. (2019). Effects of hypoxia on metabolic functions in marine organisms: Observed patterns and modelling assumptions within the context of Dynamic Energy Budget (DEB) theory. *Journal of Sea Research*, 143, 231-242 p. https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.05.001.

Thompson RJ (1984). The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non - estuarine environment. *Marine Biology*, 79, 277-288 p. https://doi.org/10.1007/BF00393259.

Thompson RJ et Bayne BL (1974). Some relationship between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 27, 317-326 p. https://doi.org/10.1007/BF00394367.

Tomaru Y, Ebisuzaki S, Kawabata Z, Nakano SI (2002). Respiration rate of the japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, feeding on *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture Research*, 33, 33-36 p. https://doi.org/10.1046/j.1355-557X.2001.00640.x.

Toro JE, Vergaral AM, Gallegillos R (1996). Multiple-locus heterozygosity, physiology and growth at two different stages in the life cycle of the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 134, 151-158 p. https://doi.org/10.3354/meps134151.

Tran D, Massabuau J-C, Vercelli C (2008). Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture*, 277, 58-65 p. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.002.

Travers M-A (2018). Regard à travers les Vibrio pour mieux comprendre les interactions Hôtes-Bactéries-Environnement. Habilitation à diriger des travaux de Recherche. Disponible auprès de l'auteure : Marie.Agnes.Travers@ifremer.fr.

Tripepi G, Jager KJ, Dekker FW, Zoccali C (2009). Diagnostic methods 2: receiver operating characteristic (ROC) curves. *Kidney International*. 76: 252–256 p.

Tripepi G, Jager KJ, Dekker FW, Zoccali C (2011). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 25: 1399–1401 p.

Tsangaris C, Cotou E, Papathanassiou E, Nicolaidou A (2010). Assessment of contaminant impacts in a semi-enclosed estuary (Amvrakikos Gulf, NW Greece): Bioenergetics and

biochemical biomarkers in mussels. *Environmental Monitoring and Assessment*, 161, 259-269 p. https://doi.org/10.1007/s10661-008-0743-2.

Urrutia MB, Iglesias JIP, Navarro E, Prou J (1996). Feeding and absorption in *Cerastoderma edule* under environmental conditions in the Bay of Marennes - Oleron (Western France). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76, 431-450 p. https://doi.org/10.1017/S0025315400030654.

Van Dam L (1935). On the utilisation of oxygen by *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 12, 86-94 p.

Van Dam L (1954). On the respiration in scallops (Lamellibranchia). *Biological Bulletin*, 107, 192-202 p. http://dx.doi.org/10.2307/1538606.

Van der Maren J-M (2004). Méthodes de recherche pour l'éduction. Éducation et formation. Fondements. Montréal : Les Presses de l'Université de Montréal, DeBoeck Université, 2e édition, 502 p.

Van Winkle W (1968). The effects of season, temperature and salinity on the oxygen consumption of bivalve tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26, 69-80 p. https://doi.org/10.1016/0010-406X(68)90313-7.

Van Winkle W et Mangum C (1975). Oxyconformers and oxyregulators: A quantitative index. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 17(2), 103-110 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90025-8.

Velasco LA et Navarro JM (2002). Feeding physiology of infaunal (*Mulinia edulis*) and epifaunal (*Mytilus chilensis*) bivalves under a wide range of concentrations and qualities of seston. *Marine Ecology Progress Series*, 240, 143-155 p. https://doi.org/10.3354/meps240143.

Velasco LA et Navarro JM (2003). Feeding physiology of two bivalves under laboratory and fi eld conditions in response to variable food concentrations. *Marine Ecology Progress Series*, 291, 115-124 p. https://doi.org/10.3354/meps291115.

Vernberg FJ, Schlieper C, Schneider DE (1963). The influence of temperature and salinity on ciliary activity of excised gill tissue of molluscs from North Carolina. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 8, 271-285 p. https://doi.org/10.1016/0010-406X(63)90130-0.

Von Bertalanffy L (1968). La Théorie générale des systèmes. Réédition 2002, Dunod, Paris, France.

Ward JE et Langdon CJ (1986). Effects of the ectoparasite *Boonea* (=Odostomia) *impressa* (Say) (Gastropoda: pyramidellidae) on the growth rate, filtration rate, and valve movements of the host *Crassotrea virginica* (Gmelin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 99, 163-180 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90235-2.

Ward JE, Cassell HK, MacDonald BA (1992). Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). I. Stimulatory effects of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 163, 235-250 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981%2892%2990052-C.

Ward JE, Newell RIE, Thompson RJ, MacDonald BA (1994). *In vivo* studies of suspension feeding processes in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *The Biological Bulletin*, 186, 221-240 p. https://doi.org/10.2307/1542056.

Ward JE, Levinton JS, Shumway SE, Succi T. (1998). Particle sorting in bivalves: *in vivo* determination of the pallial organs of selection. *Marine Biology*, 131, 283-292 p. https://doi.org/10.1007/s002270050321.

Ward JE et Shumway SE (2004). Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300, 83-130 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002.

Ward JE et Kach DJ (2009). Marine Aggregates Facilitate Ingestion of Nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research*, 68, 137-142 p. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002.

Wegner A, Besseling E, Foekema EM, Kamermans P, Koelmans AA (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2490-2497 p. https://doi.org/10.1002/etc.1984.

Widdows J et Bayne BL (1971). Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51, 827-843 p. https://doi.org/10.1017/S0025315400018002.

Widdows J (1976). Physiological adaptation of *Mytilus edulis* to cyclic temperatures. *Journal of Comparative Physiology*, 105 (2), 115-128 p. https://doi.org/10.1007/BF00691115.

Widdows J (1978). Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58, 109-124 p. https://doi.org/10.1017/S0025315400024449.

Widdows J, Fieth P, Worrall CM (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 50, 195-207 p. https://doi.org/10.1007/BF00394201.

Widdows J, Bayne BL, Donkin P, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Salkeld PN (1981). Measurement of the responses of mussels to environmental stress and pollution in Sullom Voe: a base-line study. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 80B, 323-338 p. https://doi.org/10.1017/S0269727000006631.

Widdows J, Newell RIE, Mann R (1989). Effects of hypoxia and anoxia on survival, energy metabolism, and feeding of oyster larvae (*Crassostrea virginica*, Gmelin). *Biological Bulletin*, 177(1), 154-166 p. https://doi.org/10.2307/1541843.

Widdows J, Lucas JS, Brinsley MD, Salkeld PN, Staff FJ (2002). Investigation of the effects of current velocity on mussel feeding and mussel bed stability using an annular flume. *Helgoland Marine Research*, 56, 3-12 p. https://doi.org/10.1007/s10152-001-0100-0.

Widdows J et Navarro JM (2007). Influence of current speed on clearance rate, algal cell depletion in the water column and resuspension of biodeposits of cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343, 44-51 p. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.11.011.

Wiener N (1951). Homeostasis in the individual and the society. In: Masani PR, *Collected Works Vol.* IV: *Cybernetics, Science, and Society, Ethics, Æsthetics, and Literary Criticism; Book Reviews and Obituaries*. Réédition 1986, MIT Press, Cambridge, UK.

Wildish DJ, Kristmanson DD, Hoar RL, DeCoste, AM, McCormick SD, White AW (1987). Giant scallop feeding and growth responses to flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 113, 207-220 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90101-8.

Wildish DJ, Miyares MP (1990). Filtration rate of blue mussels as a function of flow velocity: preliminary experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 142, 213-219 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(90)90092-Q.

Wildish DJ, Saulnier AM (1993). Hydrodynamic control of filtration in *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 174, 65-82 p. https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90251-I.

Willson LL et Burnett LE (2000). Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246, 223-240 p. https://doi.org/10.1016/S0022-0981%2899%2900183-5.

Winter JE (1973). The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Marine Biology*, 22, 317-328 p. https://doi.org/10.1007/BF00391388.

Winter JE (1978). A review on the knowledge of suspension feeding in lamellibranchiate bivalves with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture*, 1, 1-13 p. https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90124-2.

Wong WH et Cheung SG (2001). Feeding rates and scope for growth of green mussel, *Perna viridis* (L.) and their relationship with food availability in Kat O, Hong Kong. *Aquaculture*, 193, 123-137 p. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00478-6.

Xu X-Y, Lee WT, Chan AKY, Lo HS, Shin PKS, Cheung SG (2017). Microplastic ingestion reduces energy intake in the clam *Atactodea striata*. *Marine Pollution Bulletin*, 124, 798-802 p. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.027.

Yamamoto K-I et Handa T (2011). Effect of hypoxia on oxygen uptake in the Pacific oyster *Crassostrea gigas. Aquaculture Science*, 59 (2), 199-202 p.

Youden WJ (1950). Index for rating diagnostic test. Cancer. 3(1): 32-35 p.

Zeuthen E (1953). Oxygen uptake as related to body size in organisms. *The Quarterly Review of Biology*, 28(1), 1-12 p. https://doi.org/10.1086/399308.

Du concept de santé à la détermination d'intervalles de référence chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Résumé:

Considérée comme une préoccupation de tous, la santé n'est pas un concept facile à cerner. S'il n'existe pas une définition universelle de la santé, ses différents usages et acceptions permettent toutefois d'en préciser les dimensions biologique, psychique et sociale. En santé animale, la dimension biologique demeure la plus étudiée, mais il n'existe pas pour autant de définition consensuelle à portée internationale de la santé animale. Dès lors comment appréhender la santé chez les mollusques marins ?

Un être vivant peut être décrit fonctionnellement en physiopathologie par le suivi de biomarqueurs en conditions de laboratoire. Chez l'être humain et de nombreux animaux, des valeurs « normales » de biomarqueurs ont été proposées ; celles-ci ont été déterminées en réalisant des mesures ou des observations chez des échantillons de populations réputées en « bonne santé », la sélection rigoureuse de ces populations et échantillons constituant un enjeu majeur. Cette démarche a longtemps reposé sur l'idée qu'un être vivant est en « bonne santé » quand il est dans la « norme », ou exprimé autrement, que ses valeurs de biomarqueur s'inscrivent dans la distribution de valeurs du biomarqueur obtenues chez une population en « bonne santé ». Différentes étapes ont ensuite conduit à faire évoluer la terminologie des valeurs « normales » ou usuelles, parfois nommées constantes médicales, pour préférer celles de valeurs de référence et d'intervalles de référence. Les définitions de ces termes ainsi que leur détermination ont fait l'objet de nombreuses publications et de normes internationales qui constituent le corpus scientifique de la théorie des valeurs de référence.

Après avoir choisi des biomarqueurs d'intérêt sur la santé biologique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (premier enjeu), constituer des populations d'huîtres creuses supposées saines (deuxième enjeu), est-il possible dans une première étude de déterminer des intervalles de référence de ces biomarqueurs dans un groupe échantillon de référence (troisième enjeu), puis de vérifier qu'ils apportent des éléments d'information permettant d'émettre des hypothèses sur la santé, en réalisant des études complémentaires de comparaison avec les valeurs observées de biomarqueurs chez des huîtres creuses infectées expérimentalement par des organismes pathogènes, le virus OsHV-1 (ostreid herpesvirus type 1) d'une part, la bactérie *Vibrio aestuarianus* d'autre part (quatrième enjeu) ?

Une population de référence d'huîtres creuses diploïdes et plusieurs populations d'étude d'huîtres creuses de ploïdies et de niveaux de sélection différents à l'égard de leur résistance accrue aux maladies infectieuses ont été produites dans les installations expérimentales Ifremer. Les biomarqueurs étudiés dans le cadre de la présente thèse visaient soit une fonction physiologique particulière (filtration, temps d'activité de filtration, consommation d'oxygène, temps d'activité respiratoire, énergie de maintien) soit étaient supposés être le reflet de l'état général de l'animal (masse de chair, température corporelle). Plusieurs techniques d'acquisitions de valeurs ont été opérées au Laboratoire Ifremer de Génétique et de Pathologie de La Tremblade mêlant un examen physique des animaux à l'utilisation d'un banc de physiopathologie. Dans le cadre du projet de recherche IMAGIGAS, des acquisitions de valeurs de biomarqueurs ont également été réalisées par imagerie par résonance magnétique en collaboration avec l'équipe IRM-Food de l'IRSTEA de Rennes.

Parmi les résultats acquis au cours de cette thèse, il convient d'en souligner certains d'importance. (1) Des intervalles de référence ont été déterminés pour la première fois chez l'huitre creuse pour des biomarqueurs mesurables de la filtration et de la respiration en conditions reproductibles de laboratoire chez un échantillon de la population de référence (2) La comparaison de valeurs de biomarqueurs chez des échantillons de populations d'étude a mis en évidence au seuil de 5% des différences très hautement significatives de la filtration et des différences hautement significatives de l'énergie de maintien en fonction de la ploïdie des huîtres creuses échantillonnées (3) En s'appuyant sur l'observation des animaux lors de leur examen physique, une échelle clinique a été développée permettant avec une bonne discrimination de réaliser un pronostic chez l'huître creuse lors d'infection par le virus OsHV-1 et de préciser le concept de « mort clinique » chez l'huître creuse. (4) Chez des huîtres creuses exposées à OsHV-1, J2-J3 apparaît comme étant une période charnière à partir de laquelle des répercutions sur ces animaux sont détectables à la fois par l'échelle clinique et par la mesure des biomarqueurs étudiés de la filtration et de la respiration. (5) Les développements méthodologiques réalisés en imagerie par résonance magnétique permettent enfin d'estimer la masse de chair sèche sur plusieurs individus en même temps de façon non destructive et de suivre son évolution au cours d'une expérimentation.

A l'issue de la présentation de ces travaux de recherche, leurs apports pour appréhender le concept de santé des mollusques marins sont discutés et des perspectives de recherche et d'applications sont soulevées.

Mots clés : santé, huître, valeurs de référence, filtration, consommation d'oxygène

From the concept of health to the determination of reference intervals in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*

Sumary:

Of interest of everyone, health is not an easy concept to figure out. Although there is no universal definition of health, its various uses and meanings allow us to specify its biological, psychic and social dimensions. In animal health, the biological dimension remains the most studied, there is therefore no consensual definition of international animal health. So how to understand the health of marine shellfish?

A living being can be functionally described in physiopathology by monitoring biomarkers under laboratory conditions. In men and many animals, "normal" biomarker values have been proposed; these have been determined by carrying out measurements or observations in samples of healthy populations, the rigorous selection of these populations and samples being a major issue. This approach has long been based on the idea that a living being is in "good health" when it is in the "norm", or otherwise expressed, that its biomarker values are part of the distribution of biomarker values obtained in a population in "good health". Different stages then led to changing the terminology of "normal" or usual values, sometimes called medical constants, to prefer those of reference values and reference intervals. The definitions of these terms and their determination have been the subject of numerous publications and international standards which constitute the scientific body of the theory of reference values.

After choosing biomarkers of interest in biological health in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (first issue), to establish healthy oyster populations (second issue), is it possible in a first study to determine reference intervals of these biomarkers in a reference sample group (third issue), then to verify that they provide elements of hypotheses on the health, by carrying out complementary studies of comparison with the observed values of biomarkers in Pacific oysters experimentally infected by pathogens, OsHV-1 (ostreid herpesvirus type 1) on the one hand, *Vibrio aestuarianus* on the other (fourth issue)?

A reference population of diploid Pacific oysters and several study populations of Pacific oysters of different ploidy and selection levels for their increased resistance to infectious diseases were produced in Ifremer experimental facilities. The biomarkers studied aimed either at a particular physiological function (clearance rate, filtration time activity, oxygen consumption rate, respiratory time activity, sustaining energy also called no net production) or represented the general condition of the animal (flesh weight, body temperature). Several value acquisition techniques were performed at the Ifremer Laboratory of Genetics and Pathology of La Tremblade combining a physical examination of animals and the use of a physiopathology bench. As part of the IMAGIGAS research project, acquisitions of biomarker values were also carried out by magnetic resonance imaging in collaboration with IRM-Food team of IRSTEA in Rennes.

Among the results acquired during this thesis, it should be emphasized some of importance. (1) Reference intervals were determined for the first time in Pacific oysters for clearance and oxygen consumption rates under reproducible laboratory conditions in a sample of the reference population. (2), Very highly significant differences in clearance rate and highly significant differences in no net production according to ploidy (significance threshold 5%) were found in Pacific oysters from samples of study populations (3) Based on the observation of the animals during their physical examination, a clinical scale was developed allowing a prognosis with a good discrimination in the Pacific oyster after infection by OsHV-1 and clarifying the concept of "clinical death" in the oyster. (4) In Pacific oysters exposed to OsHV-1, J2-J3 appears to be a pivotal period from which disorders are detectable on these animals both by the clinical scale and by the measurement of clearance and oxygen consumption rates (5) The methodological developments carried out in magnetic resonance imaging finally make it possible to estimate the dry flesh weight on several individuals at the same time non-destructively and to follow its evolution during an experiment.

Following the presentation of this research, their contributions to understanding the concept of marine mollusc health are discussed and research and application perspectives are proposed.

Keywords: health, oyster, reference values, clearance rate, oxygen consumption rate



Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM) Avenue Mus de Loup 17390 La Tremblade