



Programme à enjeux immédiat FFP :

Sauvons le tourteau (CAP)



COMITÉ DÉPARTEMENTAL
DU FINISTÈRE



Table des matières

1-	Description de la pêcherie de tourteaux en France.....	3
A)	Situation globale de la pêcherie de tourteau.....	3
B)	Distribution de l'effort de pêche de la flottille de caseyeurs hauturiers :.....	7
C)	Situation à l'étranger	8
2-	Echantillonnage des captures	9
A)	Observation en mer	9
B)	Résultat.....	10
3-	Principaux organismes pathogènes décrits chez le tourteau <i>Cancer pagurus</i>	13
A)	Revue bibliographie	13
B)	Objectifs et Démarche	15
C)	Matériel et méthodes	15
4-	Résultats	19
A)	Observations macroscopiques	19
B)	Observations cytologiques.....	19
C)	Observations histologiques.....	19
D)	Hybridation <i>in situ</i>	22
E)	PCR et séquençage	22
5-	Conclusion et perspectives	23
	Références	24



1- Description de la pêche de tourteaux en France

A) Situation globale de la pêche de tourteau

La pêche française de tourteau est le fait de plusieurs flottilles avec une production annuelle qui fluctuait globalement entre 5000 et 6000 tonnes jusqu'en 2015-2016 (Figure 1). Cette production est assurée à plus de 80% par la flottille des caseyeurs et plus particulièrement les navires hauturiers de plus de 20 mètres qui travaillent dans toute la Manche Ouest et dans le Nord du golfe de Gascogne (Figure 2). Ces navires hauturiers qui sont une dizaine assurent de 50 à 60% de la production nationale et ciblent uniquement le tourteau lors de marées d'une semaine à 10 jours. Les autres crustacés ne sont que rarement recherchés par cette flottille hauturière. Les autres caseyeurs ont une activité plus côtière avec des sorties à la journée où ils ciblent beaucoup plus le homard au printemps et en été et le tourteau en automne, depuis Boulogne sur Mer jusqu'à Noirmoutier.

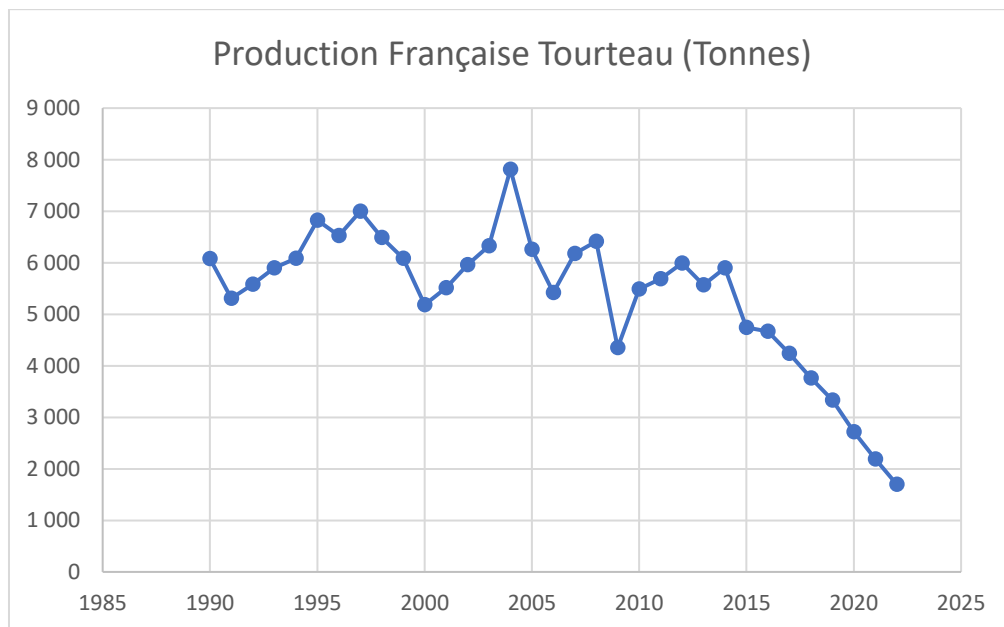


Figure 1: Production Française de Tourteaux

L'ensemble de ces captures françaises est réalisé sur le même stock qui aurait comme limite les zones CIEM 7^E, 7H, 8A et 8B. Cette limite est celle définie par le groupe de travail du CIEM. En plus des navires français, ce stock est également exploité par les navires anglais et dans une moindre mesure par quelques navires Irlandais, les captures belges et espagnoles sont extrêmement faibles. La limite Est de ce stock n'est pas tranchée entre Cherbourg et le détroit du Pas de Calais.



Figure 2: Distribution de spatiale des captures françaises de tourteaux (Vert foncé), d'araignées (Vert claire) et de homards (Violet). N'apparaît pas sur cette carte les captures dans l'Est de la Manche.

L'état du stock de tourteau (*Cancer pagurus*), durant de nombreuses années, est resté stable avec des niveaux d'abondances considérés comme élevés (Figure 3). Entre 1985 et 2015, on observe que des fluctuations annuelles existaient mais sans réelle tendance. Ces résultats proviennent du traitement des données déclaratives des caseyeurs hauturiers pour lesquels un effort particulier a toujours été effectué pour obtenir cette donnée, notamment des relations privilégiées entre les scientifiques, l'administration et les patrons de ces navires.

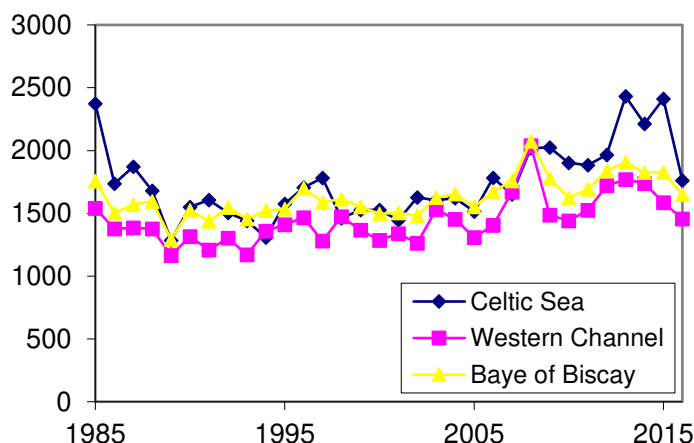


Figure 3: Evolution de l'indice d'abondance (LPUE en kg/1000 casiers) du tourteau sur une période 30 ans pour trois zones pêchées par les navires hauturiers français(a).

Depuis 2016, dans l'ensemble des zones, du large ou côtières, la tendance des rendements ou LPUE sont clairement à la baisse (Figure 4Figure 4) notamment pour la flottille des navires hauturiers. Ces données représentent la capture journalière de tourteaux en kilogramme pour 1000 casiers. La simple représentation de ces valeurs journalières pour l'ensemble des navires de la flottille entre 1999 et 2022, montre la tendance à la baisse depuis 2016 et qui s'est dégradée depuis 2018 (Figure 4a). On observe que les LPUE de fin d'été et d'automne n'atteignent plus que rarement des valeurs supérieures à 2000 kg/1000 casiers. Pour l'année 2022, les rendements sont restés à des niveaux historiquement bas. La synthèse de ces données avec comme valeur de référence une LPUE de 1000 kg/1000 casiers montrent clairement l'évolution au cours de la période récente par rapport à la période 1999-2015. Alors que la capture des tourteaux suivait une saisonnalité bien prononcée où l'on observait des rendements

qui doublés ou triplés entre mai et octobre selon les années, les années 2020 à 2022 sont quant à elles bien différentes puisqu'aucune tendance saisonnière n'apparaît. De plus, la situation a continué à se dégrader en 2022 en étant très en deçà de toute la série récente.

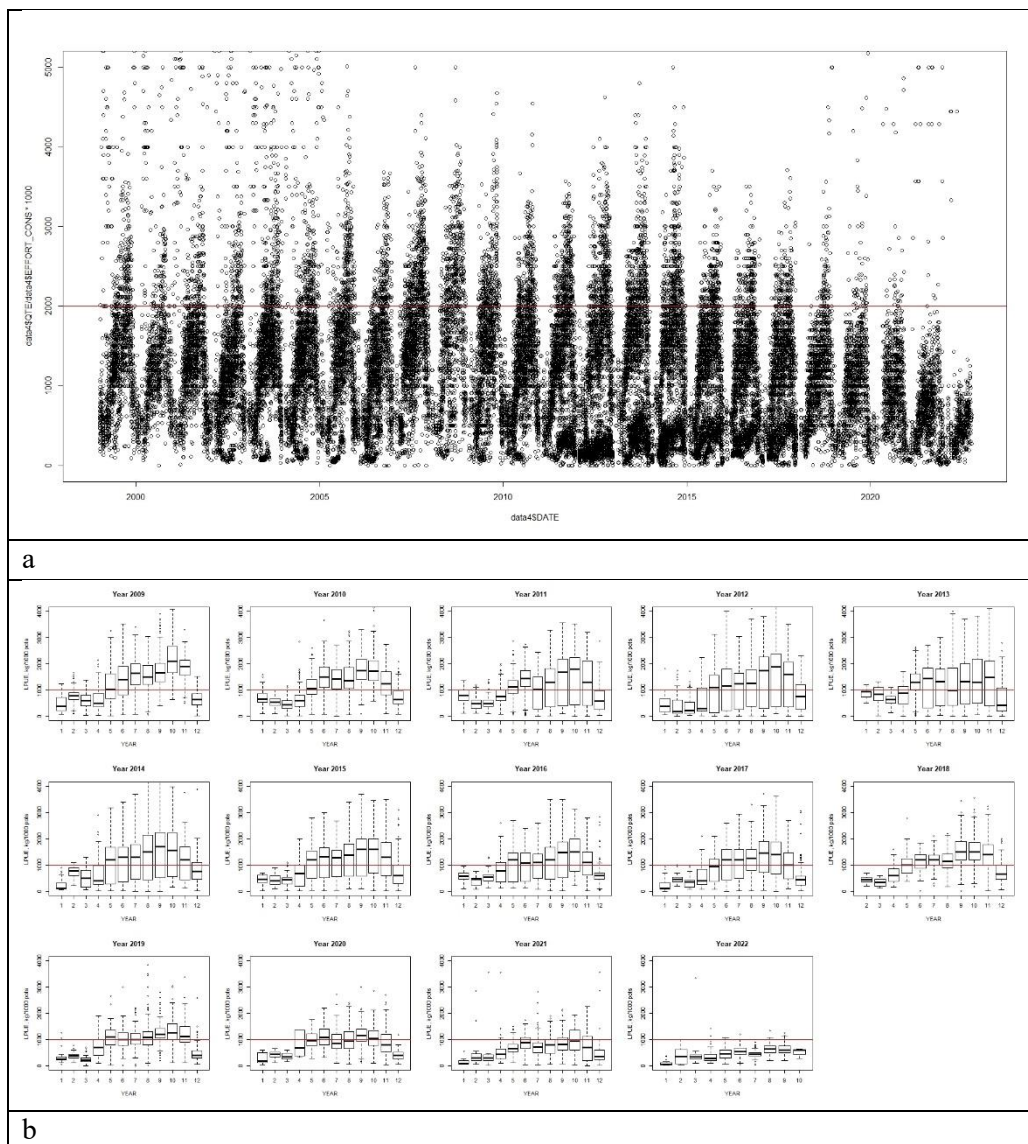


Figure 4: Evolution de l'indice d'abondance (LPUE en kg/1000 casiers) du tourteau pour la flottille caseyeur hauturière pour la période 1999-2021 (a). Evolution de l'indice d'abondance (LPUE en kg/1000 casiers) par mois pour cette même flottille avec comme point de référence 1000 kg/1000 casiers pour l'ensemble de la Manche Ouest et dans le Nord du golfe de Gascogne (b).

L'intégration de l'ensemble de ces données permet de proposer un indice pour les années récentes qui tient compte des caractéristiques de chaque navire et de leurs secteurs de pêche. Cet indice sous un format annuel ou mensuel, apporte une lecture synthétique claire de la situation actuelle (Figure 5). Les rendements ont globalement diminué de 60 % entre 2014 et 2022 atteignant aujourd'hui des niveaux historiquement bas en référence à la série sur 30 ans (Figure 3). La dynamique mensuelle est aussi similaire pour toutes les saisons depuis 2014, diminution en été ou au printemps, peut-être plus accentuée durant la saison d'août à octobre (Figure 5b). Pour l'année 2022, où nous disposons d'un nombre plus faible de données suite à l'arrêt de certains navires, l'indice annuel a continué sa chute (Figure 5b).

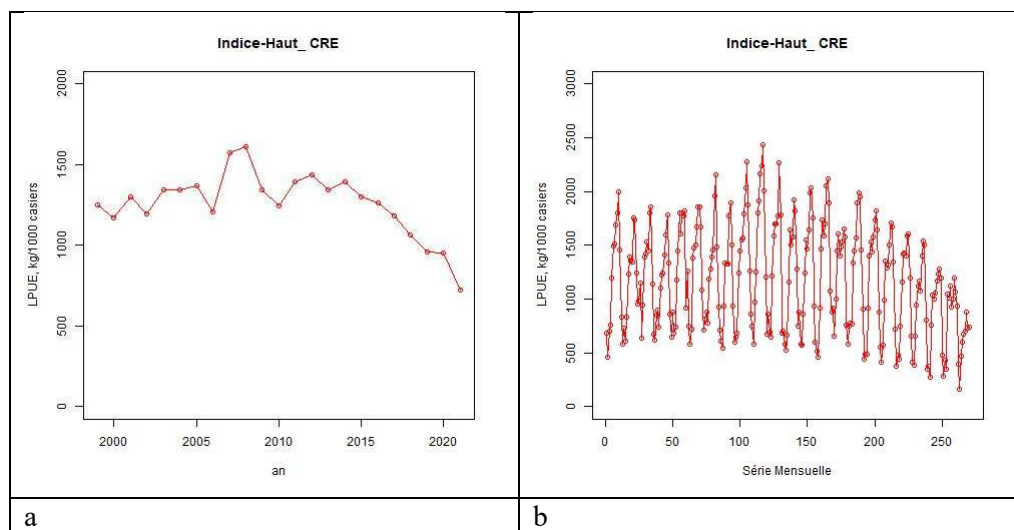


Figure 5 : Indice d'abondance du tourteau à partir des données de la flottille hauturière selon un pas de temps annuel (a) ou mensuel (b)

Cette situation intervient alors que l'effort de pêche au casier est resté stable ou a légèrement diminué sur les 10 dernières années. La conséquence directe est la valeur historiquement de la production en 2022 avec seulement 1700 tonnes (Figure 1). Pour rappel, l'encadrement de la pêche des crustacés (niveau national, puis régional et départemental) permet de contrôler l'effort de pêche nominal via un nombre de licences accordées qui limite le nombre de navires ayant accès à la ressource et via la limite autorisée de casiers pour toute licence, entre 200 et 250 casiers par marin embarqué et un maximum de 1200 par navire. Ainsi, la diminution des débarquements de 4420 à 3770 tonnes entre 2017 et 2018 est principalement liée à une baisse des débarquements de la flottille des caseyeurs. Puis, la baisse de production intervient pour toutes les flottilles, même pour celles qui ne ciblent pas le tourteau, comme les fileyeurs ou les chalutiers ayant pour conséquence une continuelle diminution de la production passant de 3400 à 2900 tonnes de 2019 à 2020. Ces chiffres sous-estiment une petite partie des captures. En effet, lorsque les débarquements journaliers des navires de ces flottilles (qui ne ciblent pas le tourteau) sont inférieurs à 50 kilogrammes, la déclaration dans les logbooks ou fiches de pêche n'est pas obligatoire. De même, peu de données sont disponibles pour les débarquements de pinces de tourteaux et par suite de tourteaux entiers ayant été capturés.

S'ajoute à cela les problèmes de cohabitation post brexit avec les unités de pêches anglaises. Certaines zones historiques pour les caseyeurs français leurs sont aujourd'hui inaccessibles en raison de l'augmentation de l'effort de pêche des Britanniques. Pour pallier la diminution de la production, les pêcheurs anglais ont fait le choix de multiplier l'effort de pêche par 2 ou par 3. Selon les dires des pêcheurs roscovites, les navires anglais déploieraient près de 3000 casiers en manche par unité voir même entre 5000 et 6000 pour les plus grosses unités. En effet, la réglementation outre-Manche ne limite pas le nombre de casiers par navire comme en France et autorise l'utilisation du casier parloir. Ce chiffre de 6000 casiers par navire doit être vu à l'échelle française puisqu'il est équivalent à l'ensemble de la flottille des navires hauturiers en manche. De ce fait, les casiers anglais ne sont pas relevés tous les jours et restent à l'eau sur une longue période occupant de plus en plus d'espace dorénavant inaccessible à la flottille française. Les productions anglaises de tourteaux restent ainsi plus stables que les nôtres mais grâce à une intensification de l'effort de pêche malgré une chute du stock.

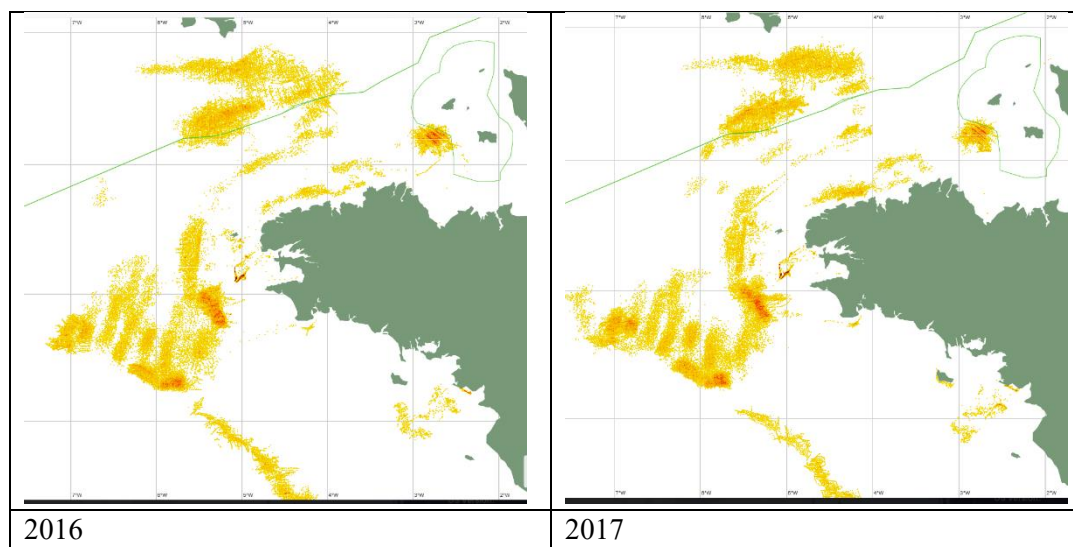
La situation actuelle s'apparentait à une diminution du recrutement en tourteau, soit une faible arrivée de jeunes tourteaux sur le fond. Le tourteau a un cycle de vie où les jeunes stades se trouvent essentiellement en zone côtière entre 0 et 20 mètres de fond. En grandissant, les individus changent

progressivement d'habitats et migrent vers des zones plus profondes. Les femelles peuvent alors effectuer des migrations de plusieurs centaines de kilomètres. Des travaux en cours ont pour objectif de développer une méthodologie afin de pouvoir suivre le recrutement du tourteau et ainsi pouvoir comprendre les fluctuations annuelles en fonction des conditions d'environnement que subissent les larves. Ce travail devrait permettre d'acquérir ensuite de nouvelles connaissances pour compléter le suivi de la biomasse adulte. Par ailleurs, les structures de taille des captures ne montrent pas de changement au cours des dernières années laissant suggérer que l'effort de pêche n'a pas engendré une sur-exploitation de croissance du stock de tourteau.

L'autre hypothèse testée ici fait suite aux observations de mortalité de tourteaux adultes juste après leurs captures ou le rejet d'individus très faibles caractérisant une situation qui semblent impacter l'ensemble de la population. Ces observations sont le fait de pêcheurs français et anglais sur des zones de pêche qui couvrent l'ensemble de la Manche et le nord du Golfe de Gascogne. Lors de l'écriture du présent projet, nous avons pu échanger avec des chercheurs du CEFAS sur les travaux récents et en cours qu'ils menaient sur la cause de cette dynamique et notamment l'identification d'un nouveau parasite. Ce parasite semblait engendrer des mortalités non négligeables lorsque sa présence était détectée sur des individus. La recherche de ce parasite ou d'autres à une échelle spatiale large se doit être recherchée tout comme son impact sur des individus adultes. Cet objectif a motivé le présent travail.

B) Distribution de l'effort de pêche de la flottille de caseyeurs hauturiers :

L'ensemble de cette flottille est équipé en système VMS depuis près de 15 ans. Cette spécificité permet de localiser précisément la distribution spatiale de l'effort de pêche (Figure 6). Ainsi, l'origine de la production est bien renseignée et permet d'identifier les zones d'importance historique pour la production de tourteau, il s'agit du sud de la Cornouille Anglaise pour la Manche Ouest, et le nord-ouest du golfe de Gascogne. Ces informations ont été importante pour établir les zones d'échantillonnage.



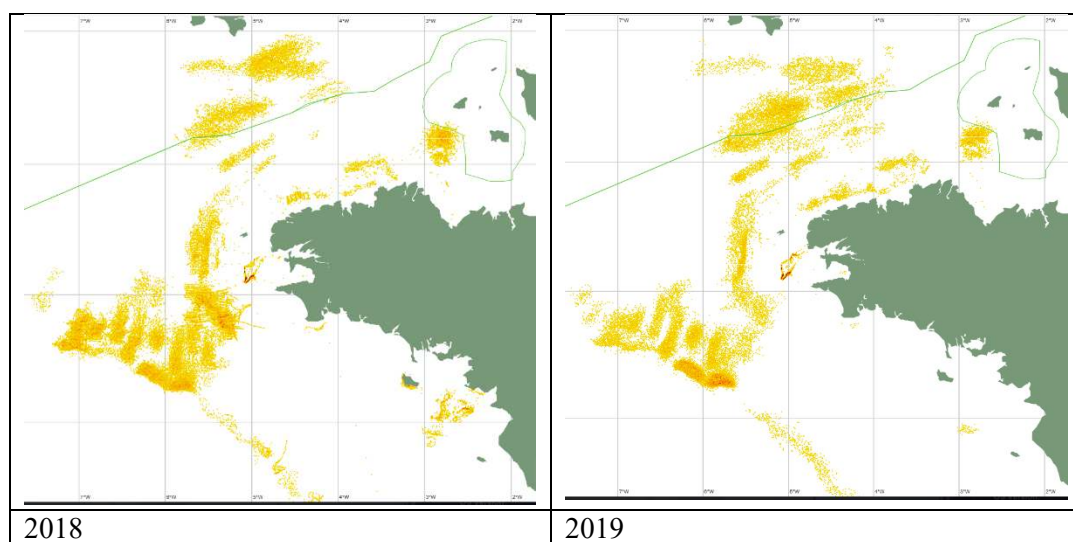


Figure 6: Distribution spatiale de l'activité des caseyeurs hauturiers.

C) Situation à l'étranger

Pour l'Irlande, les deux personnes contactées confirment une situation similaire avec des diminutions de LPUE importantes de 5 années. Toutes les approches amènent au même constat et les interviews auprès des pêcheurs irlandais vont dans le même sens. La question qu'ils se posent est liée aux mesures qui doivent être prises sans savoir le choix à faire. Certains pêcheurs qui se déplacent vers la mer du Nord observent la même tendance bien qu'en apparence moins forte. Les informations disponibles auprès de chercheurs du CEFAS pour le Royaume-Uni confirment les tendances Françaises. Ainsi, au Royaume-Uni, des travaux se sont mis en place de manière concomitante aux nôtres avec les mêmes objectifs de recherches de pathogènes à une large échelle spatiale.

Chercheur Irlandais :

« Yes we have had annual reductions in crab catch rates for the last 5 years. My colleague Guille (ccd) has almost completed a sPiCT (production model) assessment for crab in ICES Area VI using a standardised lpue index. We also have questionnaire data from fishermen on the extent of the decline. There is strong correspondence between sPiCT and Questionnaire data. The advice, based on any number of harvest rules, will be for a dramatic reduction in landings. However, we don't know if that can be implemented .. it will be difficult.

The same trends are occurring in UK. »

« Very substantial drop in catch per unit effort for this area too. Also our members who fish in the North Sea report the same pattern but maybe not as drastic. »

Chercheur Anglais

« The situation with crabs here seems ok after a slow start to the season, but that's just little bits I've heard from local fishermen. I am trying to get a sampling programme ready for next month to look for the new crab disease around the English coast, which will hopefully give us an idea of how widespread the disease is, but I'm not sure if we'll get the funding in time. »

C'est donc à partir de cette situation que les travaux du présent projet se sont mis en place avec l'objectif d'établir un premier état des lieux sur les pathogènes potentiels présents dans la population de tourteau et permettant d'apporter des réponses à la dynamique du stock exploité par les pêcheurs français.

2- Echantillonnage des captures

A) Observation en mer

Afin de mieux appréhender la problématique vécue par les patrons pêcheurs ciblant le tourteau, un observateur a embarqué pour 4 marées de 8 à 9 jours sur des caseyeurs viviers. Ainsi entre août et octobre 2021, 2 marées se sont déroulées dans le golfe de Gascogne et 2 en Manche Ouest au sud de la Cornouille Anglaise. Ces navires ciblent le tourteau dans les zones historiquement exploitées par les navires français (Figure 6).

Au cours des marées, l'observateur a échantillonné une fraction de chaque filière déployée par les pêcheurs, soit selon les navires de 7 à 9 filières par jour. Il s'agissait alors de mesurer, sexer tous les crustacés et préciser les espèces accessoires et pour les tourteaux de qualifier leur état, à savoir :

- Bon état, blanc, sans pinces, cassé, noir, malade et bien entendu indiquer s'ils étaient conservés ou non.

Deux marées supplémentaires ont été effectuées sur un navire côtier ciblant également le tourteau. Les zones ciblées étant beaucoup plus proche la côte puisque situées entre l'Ile d'Ouessant et la côte.

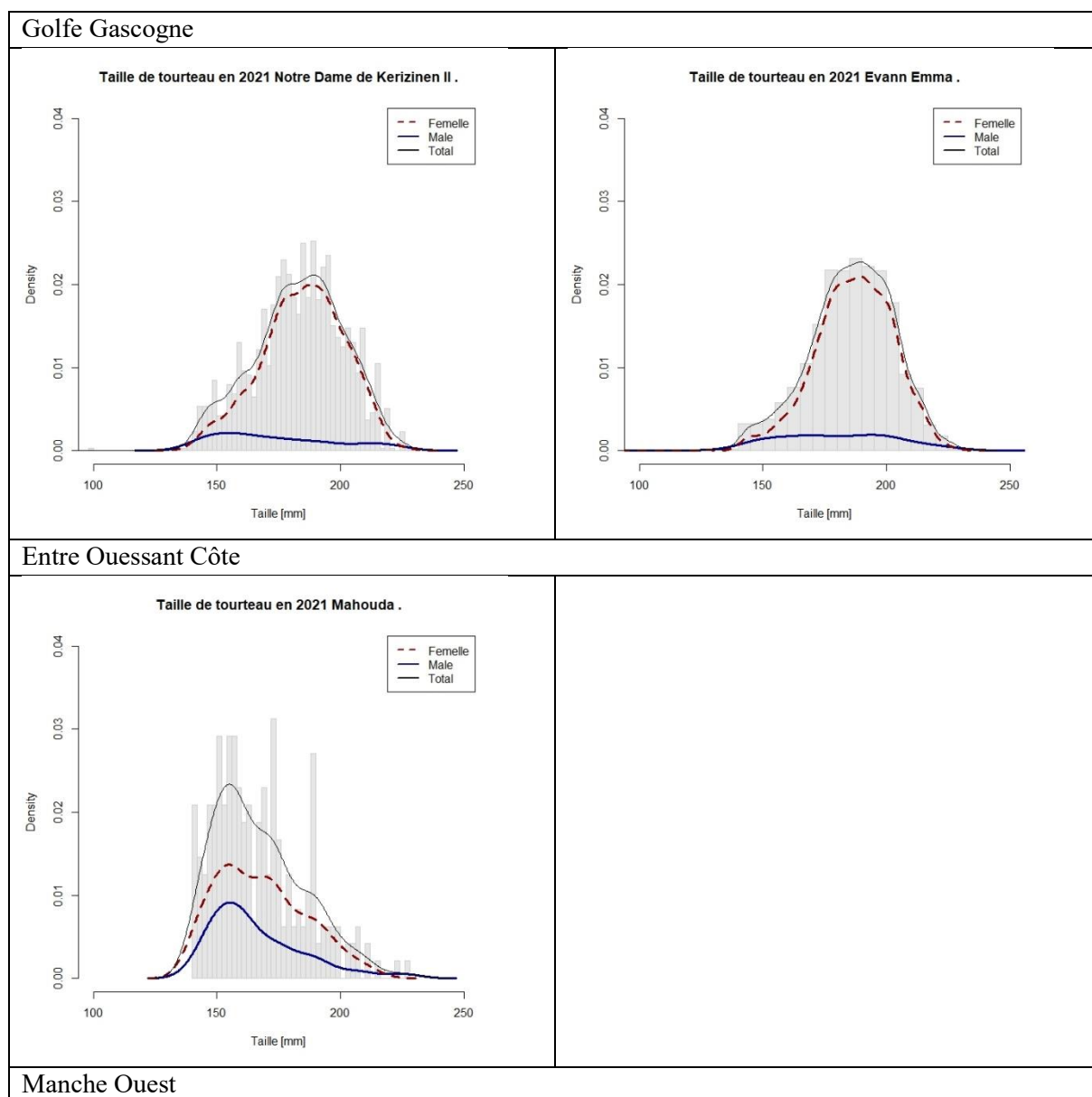
L'ensemble de ce travail a permis de suivre la capture de 8114 tourteaux répartis à part égale entre la Manche et le Golfe (Tableau 1). Pour les zones du large, les rejets ne représentent que 10 à 15 % des captures, cette valeur est un peu plus élevée à la côte.

Tableau 1 : Bilan de l'échantillonnage à bord des navires.

Période	Zone	Navire	Nombre Filière	Casier par filière	Taux échantillonnage	Nombre de Tourteaux Echantillonnés	Part Rejet
03/08-13/08/2021	Golfe Gascogne	Notre Dame de Kérizinen	9	120	25%	1950	180
27/08-07/09/2021	Golfe Gascogne	Evann Emma	9	116	33%	1980	226
15/09-16/09/2021	Entre Ouessant Côte	Mahuda	7	80	28%	315	110
22/09-23/09/2021	Entre Ouessant Côte	Mahuda	4	80	30%	220	91
25/09-04/10/2021	Manche Ouest	Ile de Sieck	9	116	22.4%	1870	275
10/10-18/10/2021	Manche Ouest	Bag Kevell	9	112	11.3%	1794	149

B) Résultat

La structure de taille des tourteaux conservés est centrée sur 180 à 190 mm de large de céphalothorax pour les zones du large en Manche Ouest et dans le golfe de Gascogne (Figure 7). Par contre, la taille est légèrement plus faible à la côte. Pour les zones du large, on retrouve une caractéristique bien connue avec un sexe ratio très en faveur des femelles. Cette situation ne se retrouve pas à la côte.



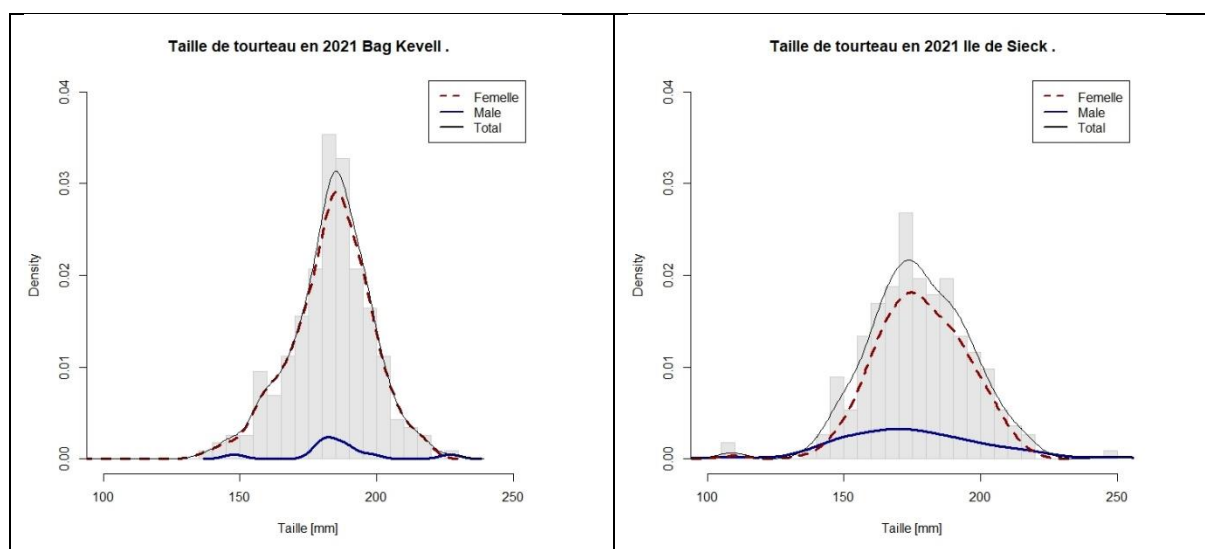
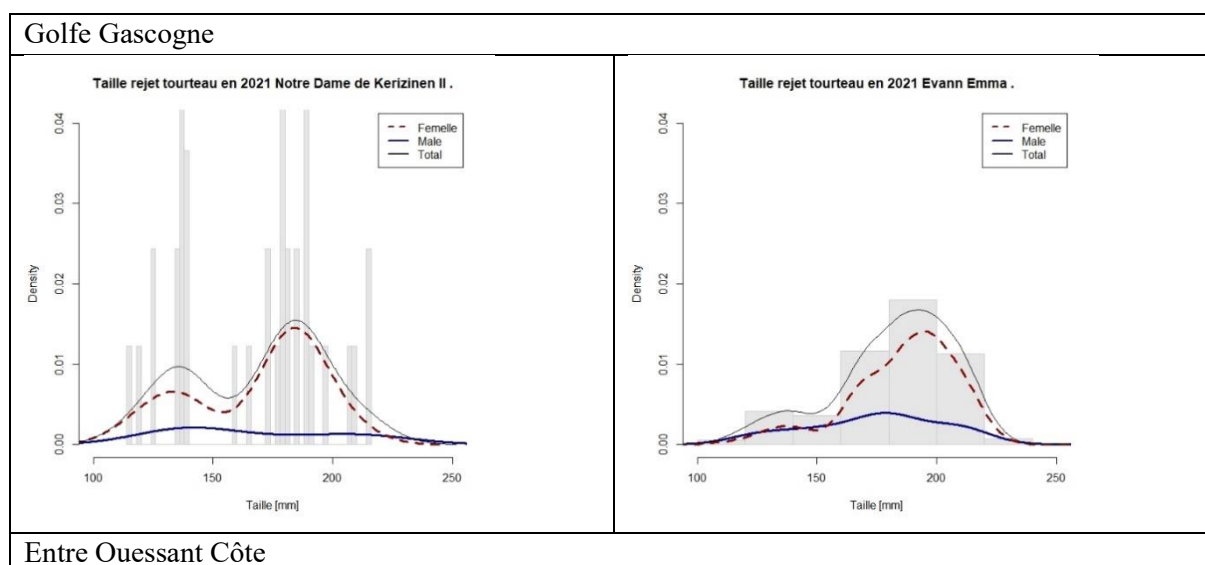


Figure 7: Structure de taille des tourteaux conservés en distinguant mâle et femelle.

La structure de taille des rejets permet de voir clairement que les tourteaux remis à l'eau ne sont liés à une taille inférieure à la taille commerciale que pour une faible proportion, moins de 25 % (Figure 8). Dans la majorité des cas, les rejets sont constitués de tourteaux blanc ou dit clair car leur taux de chair est trop faible (Tableau 2). En général, ces tourteaux viennent d'effectuer leur mue peu de temps avant leur capture.



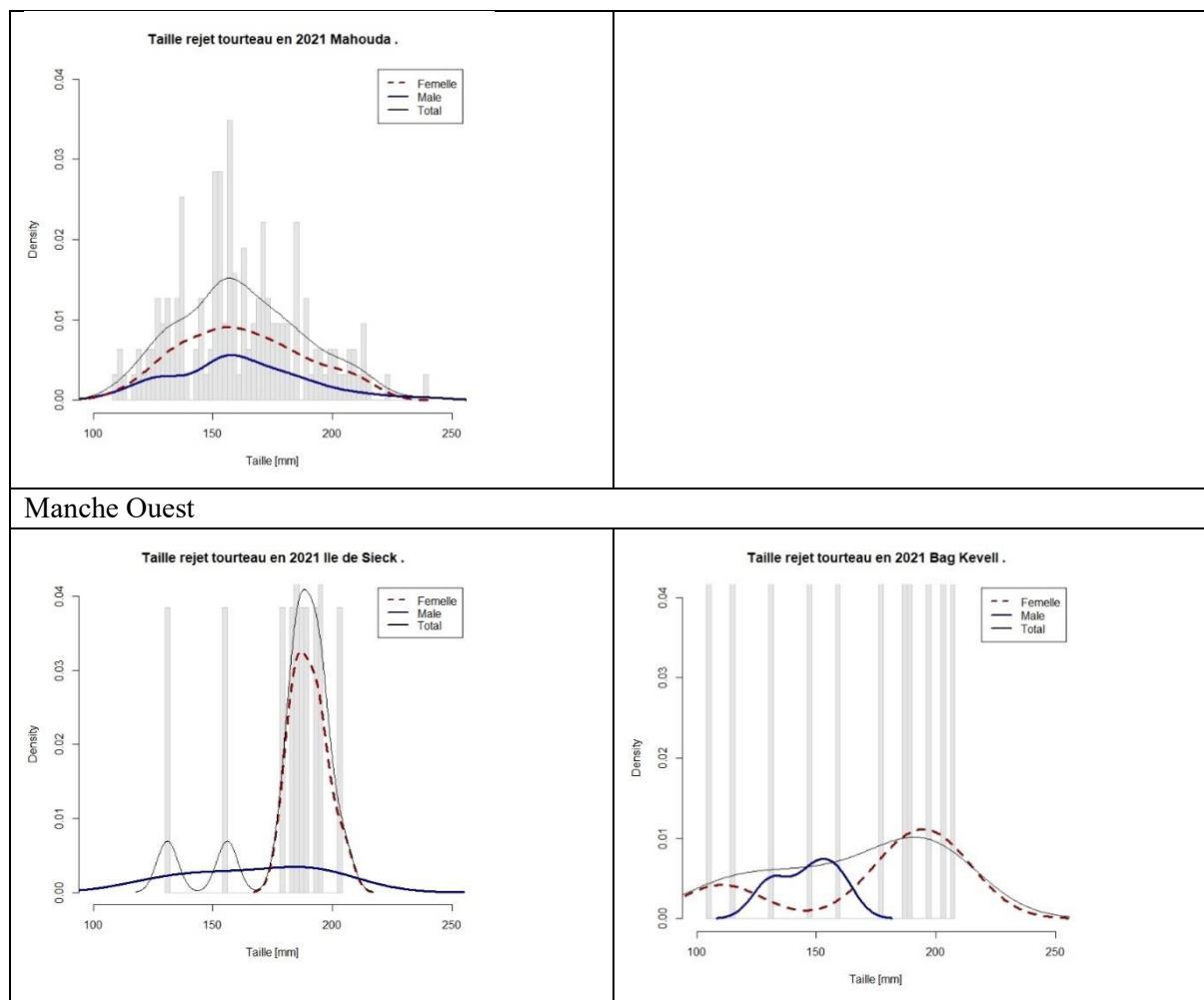


Figure 8 : Structure de taille des tourteaux rejetés en distinguant mâle et femelle.

Au cours de ce travail, un zoom devait être effectué sur les crabes qui étaient considérés comme malade par les pêcheurs. Ces crabes avaient été décrits comme très faibles à l'arrivée sur le pont des navires tout en semblant d'apparence normale, certains mourant très rapidement. La part de ces crabes suite à ce travail est très faible.

Tableau 2: Caractéristiques des rejets.

Navire	Rejet Total	Abimé, Sans Pinces	Noir	Nombre malade
Bag Kevell	149		38	0
Ile de Sieck	275		22	3
Mahouda	201	3	1	1
Evann Emma	226	26	3	15
Notre Dame	180			0

3- Principaux organismes pathogènes décrits chez le tourteau *Cancer pagurus*

A) Revue bibliographie

Une revue bibliographique a été réalisée sur les organismes pathogènes pouvant infecter le tourteau *Cancer pagurus* (Tableau 3). Ces agents infectieux peuvent être de plusieurs natures :

- des parasites protistes qui correspondent à des organismes unicellulaires le plus souvent,
- des microsporidies qui sont des parasites intracellulaires sporulant apparentés aux champignons,
- des levures qui sont des champignons unicellulaires,
- des virus.

Pour la plupart, leur impact réel sur le tourteau n'est pas connu et leur découverte est souvent fortuite et non associée à des mortalités.

Plusieurs raisons expliquent ces faits :

- premièrement, il est difficile d'obtenir des tourteaux malades car généralement les animaux affaiblis sont rapidement la proie de prédateurs et ne sont donc pas pêchés,
- deuxièmement, peu d'études sur les organismes pathogènes du tourteau ont été réalisées entraînant une méconnaissance des agents infectieux classiquement observés chez le tourteau et ayant peu d'impact, de ceux émergents et pouvant induire des mortalités conséquentes.

Il est donc important de disposer d'un historique infectieux des tourteaux afin de repérer d'éventuels organismes pathogènes émergents.

Il est aussi important de noter qu'à ce jour, aucun des organismes pathogènes affectant le tourteau n'est connu pour être pathogène pour l'homme.

Organisme pathogène	Type	Localisation	Impact chez le tourteau	Autres hôtes	Référence
<i>Janickina feisti</i>	Protiste amiboïde appartenant au phylum Amoebozoa	Manche, près de Selsey (Royaume Uni)	-Absence de signe macroscopique -Animaux léthargiques -Mortalités post-capture -Prévalence variable (entre 10 et 80%)	Aucun	Bateman et al. 2022
<i>Paramarteilia canceri</i>	Protiste appartenant au phylum Cercozoa	Manche, près de Portland (Royaume Uni)	-Absence de signe macroscopique -Animaux léthargiques -Faible prévalence (3% maximum)	Etrille commune, <i>Necora puber</i>	Feist et al. 2009 Collins et al. 2022
<i>Paramikrocytos canceri</i>	Protiste appartenant au phylum Cercozoa	Manche et mer d'Irlande (Royaume Uni)	-Absence de signe macroscopique -A l'ouverture, hypertrophie de la glande antennaire (aspect jaunâtre et visqueux) -Prévalence pouvant être élevée (jusqu'à 70%)	Aucun	Hartikainen et al. 2014a Edwards et al. 2019
<i>Hematodinium</i> sp.	Protiste flagellé appartenant au phylum Myxozoa	Ubiquiste	-Coloration rose de la carapace -Prévalence variable (jusqu'à 50%) -Associé à des mortalités	Nombreux crustacés dont différentes espèces de crabes	Smith et al. 2015
<i>Enterospora canceri</i>	Microsporidie	Manche, baie de Weymouth (Royaume Uni)	-Absence de signe macroscopique -Faible prévalence (3-4% maximum)	Aucun	Stentiford et al. 2007
<i>Hepatospora eriocheir</i>	Microsporidie	Ubiquiste, très présent en Asie	-Impact non connu	Nombreux crustacés dont différentes espèces de crabes	Bateman et al. 2016
« Levure-like »	Levure	Manche, Guernesey et baie de Weymouth (Royaume Uni)	-Détection chez des tourteaux déjà infectés par <i>Hematodinium</i> -Prévalence entre 25 et 100% chez des crabes co-infectés -Impact non connu mais impact indirect possible sur la sensibilité des crabes à <i>Hematodinium</i>	Nombreux crustacés dont l'étrille	Stentiford et al. 2003
<i>CpBV</i> (<i>Cancer pagurus</i> bacilliform virus)	Virus	Manche, baie de Kimmeridge (Royaume Uni)	-Absence de signe macroscopique -Faible prévalence (5% maximum) -Jeune crabe atteint -Impact non connu	Aucun	Bateman et Stentiford 2008

Tableau 3: Principaux organismes pathogènes détectés chez le tourteau, *Cancer pagurus*

B) Objectifs et Démarche

L'objectif principal était de pouvoir évaluer l'état zoosanitaire des crabes pêchés dans les zones impactées par le déclin des captures. Pour cela, des crabes présentant ou non des signes d'affaiblissement ont été collectés et traités de façon à pouvoir être observés en histologie et être analysés si besoin en biologie moléculaire (hybridation *in situ* et PCR-séquençage). L'histologie permet de décrire l'état des tissus et donc d'informer généralement sur l'état de l'animal et permet aussi d'observer certains organismes pathogènes et/ou lésions associées. Si un organisme pathogène est observé ou suspecté alors, des analyses complémentaires en biologie moléculaire peuvent être entreprises afin de confirmer la suspicion et de préciser l'espèce d'organisme pathogène.

Une première étape a consisté à affiner le protocole de fixation des tissus de tourteau afin de pouvoir les observer de façon satisfaisante en histologie. L'équipe du CEFAS, Weymouth, Royaume Uni a été consultée afin de donner un avis sur le protocole utilisé et sur certaines observations de lésions et organismes pathogènes. Par ailleurs, le CEFAS a fourni des lames histologiques de référence afin de pouvoir disposer d'images de référence pour les tissus sains et pour certains organismes pathogènes.

C) Matériel et méthodes

1- Prélèvements

Sept lots de crabes (3 à 26 individus par lot) ont été obtenus entre le 7 octobre 2021 et le 20 octobre 2022 pour la réalisation d'analyses en histologie (Tableau 4). Deux lots proviennent de la Chapelle (au large de la pointe du Raz) ; 2 lots proviennent du secteur Porspoder-Ouessant ; 1 lot a été pêché au sud des Iles Scilly et un lot provenait du sud de Penmarch. Par ailleurs, un lot de 5 crabes a été acheté à un mareyeur afin de pouvoir affiner le protocole de fixation pour l'histologie.

Tableau 4: Prélèvements réceptionnés et analysés dans le cadre de cette étude.

Lot	Nb crabs	Secteur de pêche	Date de prélèvement	Sexe	Etat	Macroscopie	Analyses
21/163	14	La Chapelle (80 miles au large de la pointe du Raz)	7/10/21	8M 4F 2I	4 Moribonds 10 Vivants	1 sombre 1 rose	Cytologie (3)
21/165	3	Entre Porspoder et Ouessant	21/10/21	2M 1F			Histologie
21/166	5	La Chapelle	21/10/21	5F			Histologie
21/167	9	Sud des Iles Scilly	21/10/21	5F 4M			Histologie

22/00 1	5	(Provenance Mareyeur)	18/01/22	5F	5 Vivants	1 rose	Histologie
22/03 8	26	Sud-Ouest Penmarch	16/05/22	26F	26 Faibles	2 sombres	Histologie
22/09 7	15	Entre Porspoder et Ouessant	20/10/22	7F 4M 4I	15 Vivants		Histologie

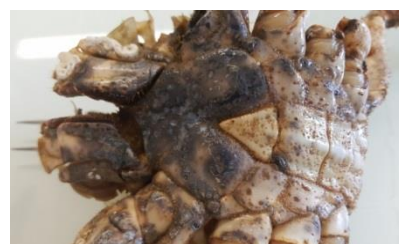
A réception, les crabes ont été mesurés dans leurs 3 dimensions (longueur, largeur et épaisseur), leur sexe déterminé, leur état général noté et la présence de couleur anormale de la carapace relevée (Tableau 4 et Figure 9).



Crabe femelle – carapace normale



Crabe male présentant une coloration rose de la carapace



Coloration noire de la carapace

Figure 9: Photographies présentant différents états de la carapace des tourteaux

Les animaux ont ensuite été sacrifiés en enfonçant un couteau dans le cœur au travers de la carapace. Après avoir séparé la carapace du reste de l'animal, un nouvel examen macroscopique a été réalisé afin de noter d'éventuelles colorations anormales de certains organes.

Des morceaux d'environ 0,5 cm² des principaux organes (glande digestive, cœur, branchies, gonades et muscle d'une patte) ont été prélevés à l'aide d'une pince et d'un ciseau (Figure 10). Les tissus ont été mis dans une cassette puis dans du fixateur Davidson (20% de formaldéhyde, 30% d'eau de mer filtrée, 10% de glycérol et 30% d'éthanol à 95%, et extemporanément 10% d'acide acétique) pour la réalisation des analyses histologiques. Des morceaux de ces mêmes organes ont été mis dans un tube de 15 ml renfermant de l'éthanol absolu pour d'éventuelles analyses en biologie moléculaire.

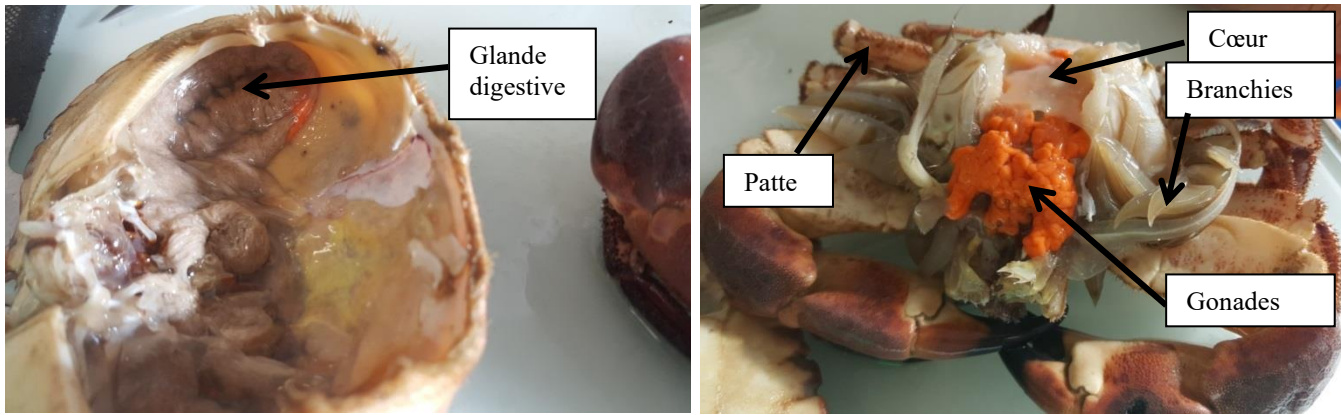


Figure 10: Photographie présentant l'anatomie du tourteau

2- Analyses en histologie

Les tissus ont été fixés pendant 24H et ont été transférés en éthanol 70% si l'inclusion ne pouvait être réalisée au bout de 24H. Les échantillons ont été déshydratés et imprégnés par la paraffine en utilisant un automate Excelsion ES (Thermo-scientific), puis inclus en paraffine (Figure 11). Des coupes de 2 μ m ont été réalisées avec un microtome RM2255 (Leica) puis séchées une nuit à température ambiante. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine puis observées au microscope photonique BX 63 (Olympus). Les photographies histologiques ont été effectuées avec une caméra numérique DP74 (Olympus).



Figure 11: Blocs de paraffine contenant différents organes de tourteaux

Les différentes étapes de l'histologie ont été réalisées sous assurance qualité selon la norme 17025.

3- Analyses complémentaires

Cytologie

Le premier lot réceptionné n'a pu être observé en histologie car le protocole de fixation n'était pas optimal. Trois individus moribonds ont néanmoins pu être observés en cytologie. Pour cela, une goutte d'hémolymph a été prélevée à l'aide d'une seringue puis déposée sur une lame et la lame cytocentrifugée (500 g, 1 min) avant d'être colorée à l'Hémacolor et observée au microscope.

Hybridation *in situ*

En complément des analyses histologiques, certains individus ont été analysés en hybridation *in situ* (HIS) en utilisant la sonde Bo/BoAS selon le protocole Cochenec et al. (2000). Cette sonde cible les protozoaires appartenant à la famille des Haplosporididae.

La sonde utilisée a été préparée par incorporation de nucléotides marqués à la digoxygénine par PCR. La PCR a été réalisée en ajoutant 1 µl d'ADN plasmidique (Bo/BoAS 10⁶ copies) à 49 µl de mix (5µl de tampon x10, 5µl de MgCl₂ à 25mM, 5µl de dNTP à 2mM, 2.5µl de DIG dUTP à 25mM, 1µl de l'amorce Bo (CATTAAATTGGTCGGGCCGC) à 100µM, 1µl de l'amorce BoAS (CTGATCGTCTTCGATCCCC) à 100µM, 0.5µl Taq polymérase (Promega), 19µl d'eau de qualité biologie moléculaire).

L'amplification génique a été faite dans un thermocycleur T100 (Bio-rad) en utilisant le programme suivant : dénaturation 5min à 94°C puis 30 cycles des étapes suivantes, 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C et 10 min d'élongation à 72°C. En fin de cycle, 5 µl de produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose à 1%.

Des coupes de 2µm d'épaisseur ont été déposées sur lames traitées (Q path adhesive slide, VWR) puis déparaffinées (xylène, 2 bains de 15 min) et réhydratées (éthanol 100%, 2 bains de 15 min). Les tissus ont été déprotéinisés avec de la protéinase K 100µg/ml en tampon TE (Tris 50 mM, EDTA 10mM) pendant 10 min à 37°C. Après un passage en éthanol absolu pour stopper la protéinase K, les lames ont été recouvertes avec 20 ng de sonde pour 100µl de mix d'hybridation (50% formamide, 10% dextran sulfate, 4X SSC, 250g/ml extrait de tRNA et 10% denhart). Les lames ont été dénaturées à 94°C (5 min), puis conservées sur glace (5 min) et mises en chambre humide à 42°C sur la nuit. Le lendemain, les préparations ont été lavées en tampon SSC 2X (2x 5min, à température ambiante, en SSC 0.4X (1 min, à 42°C) et dans la solution 1 (100mM acide maléique, 5M NaCl, pH=7,5). Les tissus ont été plongés 30 min (température ambiante) dans de l'agent bloquant (1% poids/volume de blocking reagent dans la solution 1) puis incubés 1 heure avec l'anticorps anti-DIG AP (1/500 en solution 1). L'excès d'anticorps a été éliminé par des lavages en solution 1 (2x 5 min) puis par un bain de 10 min en solution 2 (1 M Tris pH=8, 5 M NaCl, 1 M MgCl₂, pH=9,5). La révélation a été réalisée en incubant les lames dans du NBT/BCIP (20µl/ 1ml solution 2) pendant 1 heure. La réaction a été stoppée en solution 3 (1 M Tris, pH=8, 0,5 M EDTA, pH=8) puis contre colorées 1 min au jaune de Bismarck. Après déshydratation et montage à l'Eukitt, les lames ont été observées au microscope.

PCR et séquençage

Pour donner suite aux observations histologiques, une extraction d'ADN a été réalisée à partir des branchies de 4 crabes présentant des lésions branchiales et/ou des cellules sporulées dans l'épithélium branchial. L'extraction a été réalisée à l'aide du kit commercial QIAamp® DNA Mini Kit selon les recommandations du fournisseur. Une fois l'ADN extrait, une PCR nichée ciblant les parasites de la famille des Haplosporidae a été réalisée en utilisant les deux couples d'amorces C5fHap-Sb1n et V5fHapl-Sb2nHap développés par Hartikainen et al. (2014b) et ciblant le gène de l'ARN ribosomique 18S. Toutes les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 20µl comprenant du tampon Promega 1X, 2,5µM de MgCl₂, 0,8mM dNTPs, 0,5µM de chaque amorce, 10µg d'albumine de sérum bovin (BSA), 0,1 U GoTaq G2 (Promega) et 1µl d'ADN extrait à 10ng.

Les cycles d'amplification ont été réalisés sur un thermocycleur T100 (BioRad) selon le programme suivant : 95°C pendant 5 minutes, 30 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 secondes et 64°C pendant 45 seconde puis pour finir, 72°C pendant 10 minutes.

Les produits de PCR ont été déposés sur des gels d'agarose à 1 % colorés au bromure d'éthidium et visualisés à l'aide d'un illuminateur UV. Les amplicons obtenus ont ensuite été purifiés et envoyés pour séquençage à la société Eurofins Genomics.

Les chromatogrammes reçus ont été analysés à l'aide de FinchTV 1.4 (Geospiza) et les séquences obtenues comparées à celles de la base de données GenBank à l'aide de l'algorithme BLAST (Altschul et al. 1997).

4- Résultats

A) Observations macroscopiques

Au total, cinq crabes ont présenté une coloration anormale de la carapace (Tableau 3) : 3 présentaient une coloration sombre (Figure 12a) pouvant être associée à la présence de bactéries (Stentiford 2008) et deux présentaient une coloration rose (Figure 12b) pouvant être associée à la présence d'*Hématodinium* sp. (Smith et al. 2015).

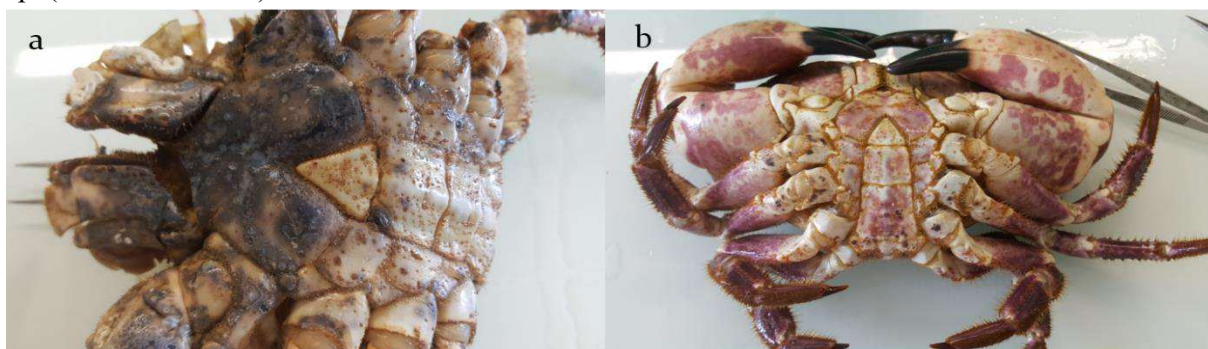


Figure 12: Coloration anormale de la carapace : 4a coloration sombre pouvant être associée à la présence de bactéries- 4b coloration rose pouvant être associée à la présence d'*Hématodinium* sp.

B) Observations cytologiques

Sur les trois individus moribonds pour lesquels des analyses cytologiques ont été réalisées (Tableau 4), deux présentaient des cellules ressemblant au parasite *Paramikrocytos* (Figure 13 a et b). L'un de ces individus présentait également des bactéries (Figure 13 b)

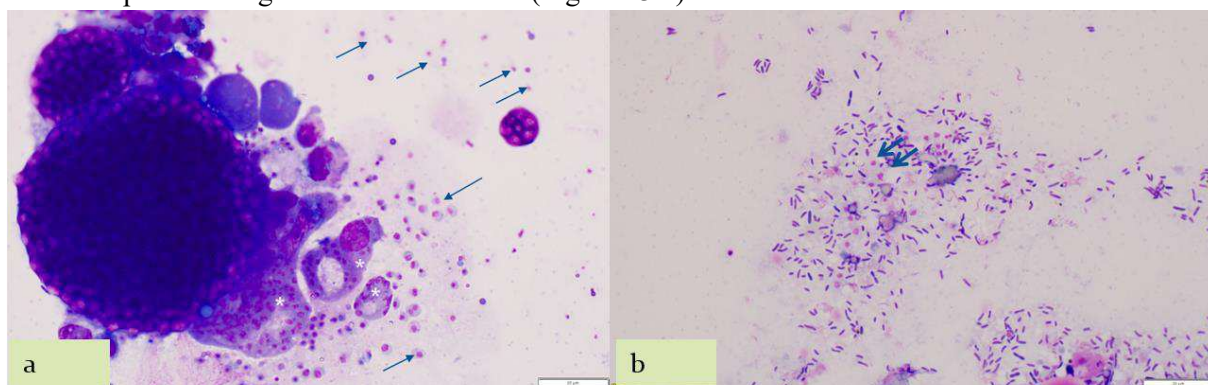


Figure 13: a et b- Analyses cytologiques- Observation de cellules ressemblant à des micro-parasites uni- ou bi-nucléés (flèches) et à des plasmodes (étoile)- Nombreuses bactéries (b)

C) Observations histologiques

Les observations histologiques ont révélé la présence de lésions. En effet, 40 % des individus présentaient une infiltration hémocytaire et 60% une nécrose de certains tissus (Tableau 5).

Ces lésions ont été plus particulièrement observées chez les individus du lot 22/038 qui correspondait à un lot de crabes affaiblis. Sur ce lot, tous les individus présentaient une nécrose des branchies (Figure 14: Principales lésions observées en histologie : a infiltration hémocytaire (ici au niveau du tissu conjonctif du coeur) ; b nécrose des tissus (ici au niveau des branchies)) et près de la moitié présentait une infiltration hémocytaire au niveau du cœur (Figure 14 a).

Des anomalies nucléaires ont également été observées chez certains individus du lot 22/097. Ces images évoquent des cellules en apoptose (Figure 15 a) et des inclusions intranucléaires (Figure 15 b).

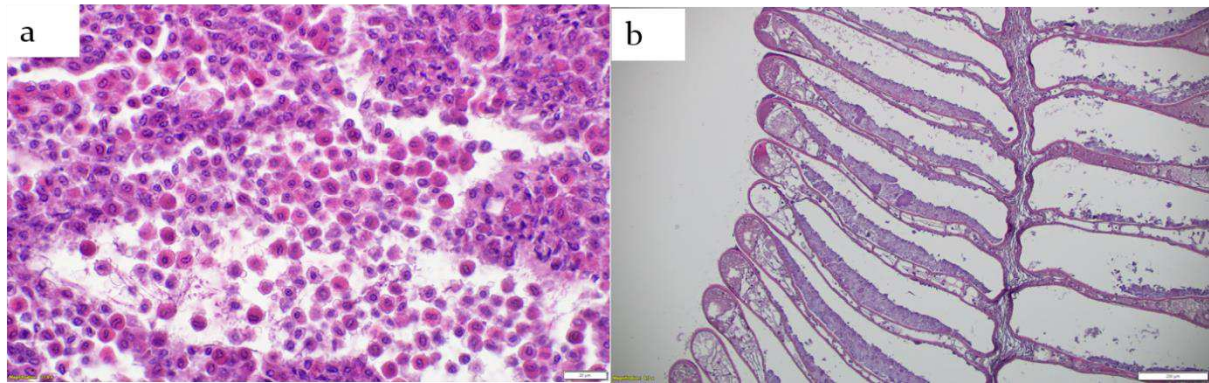


Figure 14: Principales lésions observées en histologie : a infiltration hémocytaire (ici au niveau du tissu conjonctif du coeur) ; b nécrose des tissus (ici au niveau des branchies)

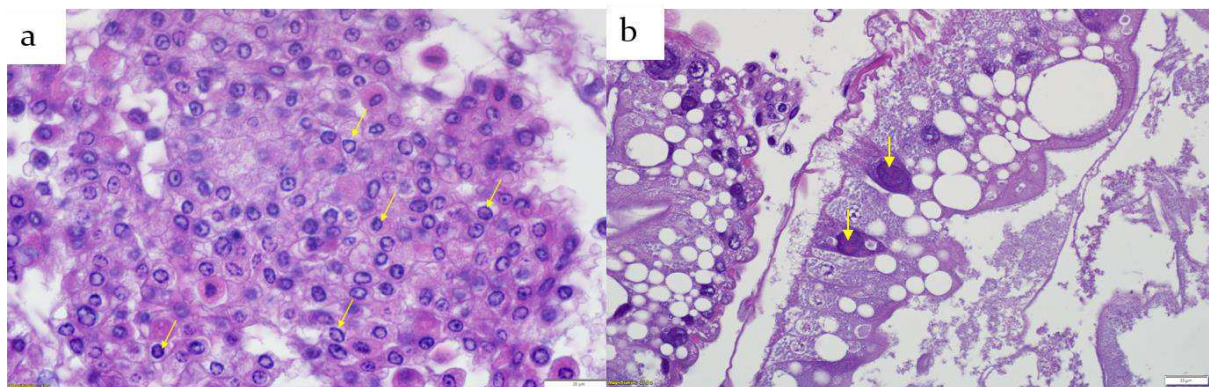


Figure 15: Anomalies nucléaires : a noyaux présentant une marginalisation de la chromatine (flèches) pouvant faire penser à des cellules en apoptose ; b noyaux présentant des inclusions pouvant faire penser à des inclusions intranucléaires (flèches)

Par ailleurs, l'examen des lames histologiques a révélé la présence de bactéries chez 4 individus (Tableau 5). Deux de ces crabes présentaient des foyers bactériens au niveau du cœur (Figure 16)

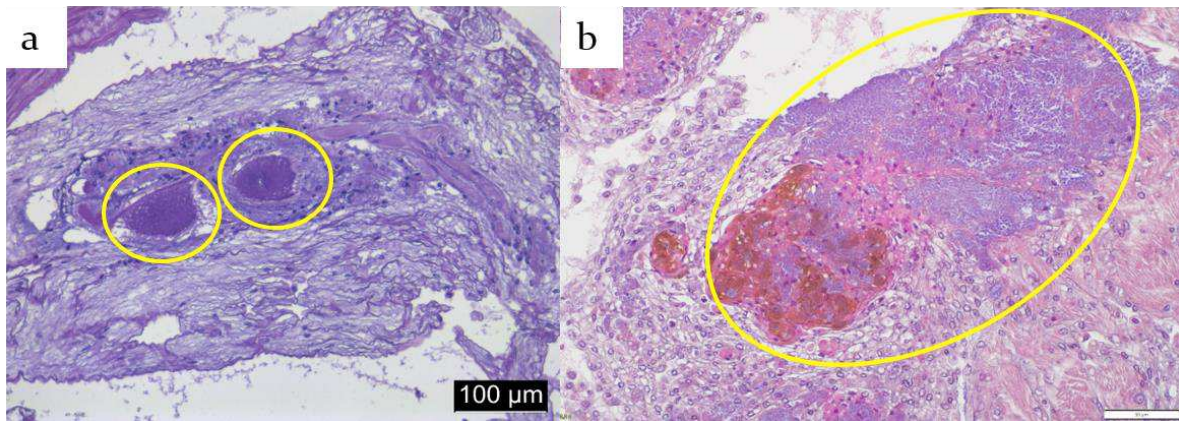


Figure 16 : a et b- Foyers bactériens au niveau du cœur (encerclés)

Un individu présentait au niveau des branchies des cellules sporulées ressemblant aux spores des Haplosporidies (Tableau 4:Prélèvements réceptionnés et analysés dans le cadre de cette étude. Tableau 4 ; Figure 17).

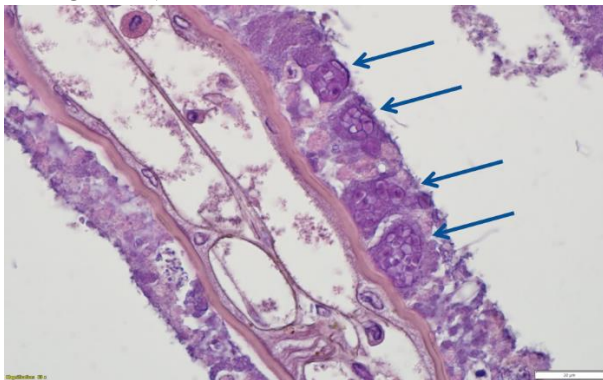


Figure 17: Cellules sporulées (flèches) ressemblant aux Haplosporidies au niveau des branchies.

Enfin, pour 4 individus, des cellules ressemblant au parasite *Paramikrocytos canceri* ont été observées au niveau de l'hépatopancréas ou de la gonade (Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus en cytologie et en histologie au cours de cette étude. Tableau 5 ; Figure 18). L'un de ces individus présentait un niveau d'infection élevé (Figure 18 b).

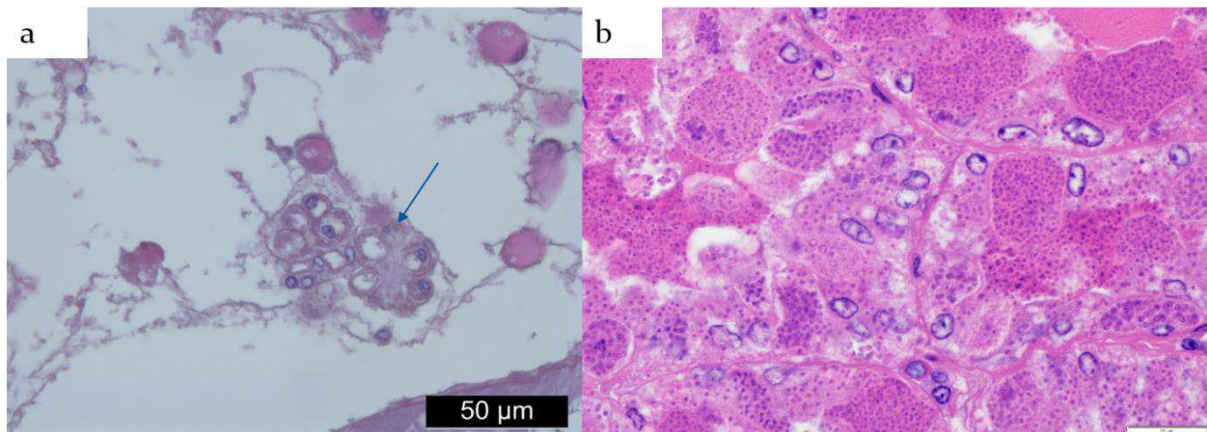


Figure 18 : Observation de parasites ressemblant à *Paramikrocytos canceri* : a une cellule (flèche) pouvant évoquer le parasite ; b nombreux parasites occupant les cellules de l'hépatopancréas.

Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus en cytologie et en histologie au cours de cette étude

Lot	Date de prélèvement	Infiltration	Nécrose	Autres
21/163*	7/10/21			2/3 <i>Paramikrocytos-like</i> 1/3 Bactéries
21/165	21/10/21	3/3	-	1/3 Bactéries (cœur)
21/166	21/10/21	1/5	4/5	1/5 <i>Paramikrocytos-like</i> (hépatopancréas)
21/167	21/10/21	1/9	3/9	2/9 Bactéries (hépatopancréas)
22/001	18/01/22	2/5	-	-
22/038**	16/05/22	12 / 26 (cœur)	26/26 (branchies)	Cellules sporulées 1/26 (branchies)
22/097	20/10/22	6/15	4/15	3/15 <i>Paramikrocytos-like</i> (hépatopancréas et gonade) 1/15 Bactéries (cœur) 5/15 Anomalies nucléaires

* Observations faites en cytologie

** Double lecture faite par le CEFAS

D) Hybridation *in situ*

Huit crabes présentant des branchies nécrotiques dont celui qui présentait des cellules sporulées ressemblant aux haplosporidies ont été analysés en hybridation *in situ* en utilisant la sonde Bo Boas. Cette sonde permet de détecter de façon non spécifique les Haplosporidies. Alors que le contrôle positif et le contrôle négatif ont présenté les résultats attendus, aucun marquage spécifique n'a été relevé sur les 8 crabes testés en hybridation *in situ*.

Ainsi, nous n'avons pas pu démontrer que les cellules sporulées correspondaient à des Haplosporidies.

E) PCR et séquençage

Quatre crabes présentant des branchies nécrotiques dont celui qui présentait des cellules sporulées ressemblant aux haplosporidies ont été analysés en nested PCR en utilisant les amorces C5fHap/Sb1n

puis V5F/Sb2n (Hartikainen et al. 2014b) et en suivant les recommandations de Georgia Ward (CEFAS). Ces amorces permettent d'amplifier de façon non spécifique les haplosporidies. Un individu (différent de celui présentant des cellules sporulées) a présenté un résultat positif en PCR. Le produit d'amplification obtenu a été séquençé. Une séquence de 595 nucléotides a été obtenue et comparée aux séquences homologues présentes dans les bases de données publiques.

Cette séquence présente 99% d'identité avec la séquence MN537841- *Haplosporida* sp. clone Crab_03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Cette séquence a été obtenue à partir d'eau dans laquelle ont été incubés des crabes *Cancer pagurus* et *Carcinus maenas* (Royaume Uni) - (Urrutia et al. 2019 - <https://doi.org/10.3354/dao03417>).

L'analyse en PCR n'a pas permis de confirmer que les cellules sporulées correspondent à des haplosporidies. Néanmoins, il a été possible de détecter de l'ADN d'un haplosporidie dans un des individus testés.

5- Conclusion et perspectives

Ainsi les activités conduites en 2021-2022 ont permis d'établir un protocole pour pouvoir analyser les tourteaux en histologie et en biologie moléculaire et d'acquérir du matériel de référence pour les principaux organismes pathogènes connus chez les tourteaux.

L'ensemble des analyses mises en œuvre sur les 7 lots de crabes réceptionnés a permis de montrer la présence de coloration anormale de la carapace chez 5 individus dont trois laissant suspecter la présence de bactéries et deux laissant suspecter la présence d'*Hématodinium*. Ce parasite est connu pour avoir un impact sur le tourteau.

Les observations en histologie ont révélé la présence de lésions de type infiltration et nécrose sur 40 à 60% des animaux analysés et la présence d'anomalies nucléaires chez quelques individus. Ces différentes lésions peuvent être associées à la présence de certains organismes pathogènes mais également traduire un état d'affaiblissement des crabes.

Par ailleurs, les observations en cytologie et histologie ont mis en évidence la présence de bactéries dans quatre crabes. Certaines bactéries observées sont probablement le résultat d'une surinfection ou d'un état physiologique dégradé. Cependant, deux de ces crabes présentaient des foyers bactériens au niveau du cœur. Dans ce cas, la présence des bactéries a très certainement un impact sur le fonctionnement de cet organe.

Un individu présentait des cellules sporulées au niveau des branchies ressemblant à des haplosporidies. Cette observation n'a été confirmée ni en hybridation *in situ* ni en PCR. Néanmoins, de l'ADN d'haplosporidie a été détecté dans un individu présentant de la nécrose au niveau des branchies (sur 4 individus testés) suggérant la présence d'un Haplosporida non complètement caractérisé dans les tissus de tourteau.

Enfin, six individus présentaient des cellules uni ou plurinucléées ressemblant à *Paramikrocytos canceri* dans l'hépatopancréas ou la gonade. Des analyses complémentaires en biologie moléculaire sont nécessaires pour confirmer l'espèce du parasite. *Paramikrocytos canceri* a été mis en évidence chez des tourteaux au Royaume-Uni sans qu'un impact sur le crabe soit rapporté. Néanmoins, dans un des crabes analysés, le niveau d'infection est très important.

Pour l'instant, les parasites *Janickina feistii* et *Paramarteilia canceri* n'ont pas été observés dans les animaux analysés.

La présence de parasites et autres organismes pathogènes est importante à considérer car elle peut contribuer aux mortalités et à l'affaiblissement des individus. Mais il s'agit d'un facteur parmi d'autres

et le changement global peut contribuer à exacerber cet impact et faire émerger de nouveaux organismes pathogènes.

Ces premiers résultats confirment l'intérêt de l'histologie pour apprécier l'état des tissus et vérifier la présence / absence de certains organismes pathogènes. Il est important de préciser que ces observations doivent être complétées par des analyses moléculaires pour vérifier l'espèce des parasites observées. Enfin, l'interprétation de ces résultats est aussi étroitement liée à l'échantillonnage qui doit être réalisé de façon appropriée afin d'évaluer l'impact des parasites/organismes pathogènes sur les populations de crabes. Ainsi, il est envisagé de poursuivre ces analyses sur de nouveaux prélèvements réalisés à différentes étapes de la vie du crabe et sur les principaux secteurs de pêche affectés par cette diminution drastique des captures.

La poursuite de ce travail en parallèle des développements opérés au sein du projet RECCRU sur la mise en place d'un indice d'abondance sur les jeunes tourteaux et d'une analyse des séries historiques de plancton de la campagne scientifique Pelgas vont permettre d'établir les facteurs majeurs qui génèrent cette baisse du stock de tourteau à l'échelle du stock Manche Ouest Nord Golfe de Gascogne. La dimension de ce travail s'inscrit ainsi dans la définition de l'impact du changement climatique quant à son rôle direct ou indirect dans l'évolution observée.

Références

- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bateman KS, Stentiford GD. Cancer pagurus bacilliform virus (CpBV) infecting juvenile European edible crabs *C. pagurus* from UK waters, 2008. *Dis Aquat Organ*. 1:79(2):147-51. doi: 10.3354/dao01900
- Bateman KS, Wiredu-Boakye D, Kerr R, Williams BA, Stentiford GD. Single and multi-gene phylogeny of *Hepatospora* (Microsporidia) - a generalist pathogen of farmed and wild crustacean hosts, 2016. *Parasitology*. 143(8):971-82. doi: 10.1017/S0031182016000433
- Bateman KS, Stentiford GD, Kerr R, Hooper C, White P, Edwards M., Ross S., Hazelgrove R., Daumich C., Green M. J., Ivory D., Evans C., Bass D., 2022. Amoebic crab disease (ACD) in edible crab *Cancer pagurus* from the English Channel, UK. *Dis Aquat Org* 150:1-16. <https://doi.org/10.3354/dao03668>
- Collins E, Ward GM, Bateman KS, Cheslett DL, Hooper C, Feist SW, Ironside JE, Morrissey T, O'Toole C, Tully O, Ross SH, Stentiford GD, Swords F, Urrutia A, Bass D, 2022. High prevalence of *Paramarteilia canceri* infecting velvet swimming crabs *Necora puber* in Ireland. *Dis Aquat Organ*. 148:167-181. doi: 10.3354/dao03652
- Edwards M, Coates CJ, Rowley AF, 2019. Host Range of the Mikrocytid Parasite *Paramikrocytos canceri* in Decapod Crustaceans. *Pathogens*. 8(4):252. doi: 10.3390/pathogens8040252
- Feist SW, Hine PM, Bateman KS, Stentiford GD, Longshaw M, 2009. *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercaria) in the European edible crab (*Cancer pagurus*) with a proposal for the revision of the order

- Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitol (Praha)*. 56(2):73-85. doi: 10.14411/fp.2009.012.
- Hartikainen H, Stentiford GD, Bateman KS, Berney C, Feist SW, Longshaw M, Okamura B, Stone D, Ward G, Wood C, Bass D. 2014a. Mikrocytids are a broadly distributed and divergent radiation of parasites in aquatic invertebrates. *Current Biology* 24: 807-812. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.033>.
- Hartikainen, H., Ashford, O., Berney, C., Okamura B., Feist S.W., Baker-Austin C., Stentiford G.D., Bass D., 2014b. Lineage-specific molecular probing reveals novel diversity and ecological partitioning of haplosporidians. *ISME Journal* 8, 177–186. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.136>
- Smith AL, Hirschle L, Vogan CL, Rowley AF, 2015. Parasitization of juvenile edible crabs (*Cancer pagurus*) by the dinoflagellate, *Hematodinium* sp.: pathobiology, seasonality and its potential effects on commercial fisheries. *Parasitology*. 142(3):428-38. doi: 10.1017/S0031182014001255.
- Stentiford GD, Evans M, Bateman K, Feist SW, 2003. Co-infection by a yeast-like organism in *Hematodinium*-infected European edible crabs *Cancer pagurus* and velvet swimming crabs *Necora puber* from the English Channel. *Dis Aquat Organ*. 54(3):195-202. doi: 10.3354/dao054195.
- Stentiford GD, Bateman KS, Longshaw M, Feist SW, 2007. *Enterospora canceri* n. gen., n. sp., intranuclear within the hepatopancreatocytes of the European edible crab *Cancer pagurus*. *Dis Aquat Organ*. 75(1):61-72. doi: 10.3354/dao075061
- Stentiford, G. D. 2008. Diseases of the European edible crab (*Cancer pagurus*): a review. *ICES Journal of Marine Science*, 65: 1578–1592.
- Urrutia A, Bass D, Ward G, Ross S, Bojko J, Marigomez I, Feist SW, 2019. Ultrastructure, phylogeny and histopathology of two novel haplosporidians parasitising amphipods, and importance of crustaceans as hosts. *Dis Aquat Org* 136:87-103. <https://doi.org/10.3354/dao03417>