

DIADEME

Recherche des causes de la mortalité massive des oursins diadèmes - *Diadema antillarum* (Philippi, 1845) en Martinique

Eric Abadie, Charlotte Bourdon

Fiche documentaire

Titre du rapport :Recherche des causes de la mortalité massive des oursins diadèmes - *Diadema antillarum* (Philippi, 1845) en Martinique

Référence interne :
R.RBE/BIODIVENV 24-007

Date de publication :
2024/06/11

Diffusion

- libre (internet)
 restreinte (intranet)
levée d'embargo : AAAA/MM/JJ
 interdite (confidentielle)
levée de confidentialité : AAAA/MM/JJ

Version : 1.1.0

Langue(s) : Français

Mots-clés / Key words :

Oursin diadème (*Diadema antillarum*), mortalité, Antilles 2022

Commanditaire du rapport :

Ce travail a été effectué avec l'aide financière de la DEAL et l'Office de l'Eau de Martinique

Auteur(s) / adresse mail

Affiliation / Direction / Service, laboratoire

Eric Abadie / eabadie@ifremer.fr

Affiliation / Ifremer/RBE/BIODIVENV

Charlotte Bourdon / Cbourdon@ifremer.fr

Affiliation / Ifremer/RBE/BIODIVENV

Sommaire

1. Etat des lieux	5
2. Plan d'action – stratégie d'échantillonnage.....	6
2.1. Echantillonnage des oursins	6
2.2. Lieux d'échantillonnage.....	6
2.3. Protocoles d'échantillonnage.....	7
3. Résultats	8
3.1. Analyses de biotoxines.....	8
3.2. Recherche de pathogènes	8
4. Conclusion - perspectives	8
Annexes	9
Echantillonnage des oursins pour analyses des biotoxines.....	9
Protocole de traitement des oursins pour analyses histologiques	9

1. Etat des lieux

En 2022, une « maladie » qui impacte les oursins diadèmes est signalée. Elle concerne de très nombreuses zones de la Martinique. L'évolution de cette maladie est fulgurante et se caractérise par la perte des épines laissant apparaître le squelette. Il est fréquent d'observer des attaques des autres organismes (poissons notamment) sur les individus moribonds ou morts. Lorsqu'une zone est impactée, la mortalité des oursins est très rapide (quelques jours) et peut être totale. Il a été rapporté des phénomènes identiques sur d'autres pays du pourtour de la Caraïbes. La carte ci jointe



(<https://www.agrra.org/sea-urchin-die-off>) répertorierait l'état de santé des oursins diadèmes.

La rapide propagation de cette « maladie » incite à émettre l'hypothèse d'une attaque par un pathogène. Cependant, l'apparition de maladies impactant les oursins ne sont pas une nouveauté et ont été observées cycliquement de par le monde. Dans les années 1980, les oursins de la Rade de Marseille ont été victimes de la maladie de l'oursin « chauve » qui a fortement affectée la population de ces oursins provoquant ainsi des impacts sur l'écosystème notamment sur les récifs coralliens (ces herbivores benthiques ont un rôle très important de broutage). Même s'il est possible au final d'identifier le pathogène, le basculement vers un nouvel état stable des écosystèmes (regime shift) se sera mis en place et il semble illusoire de revenir à un état antérieur par des actions ponctuelles comme les tentatives de repeuplement. Ces changements dans les équilibres de communautés ne sont pas rares et font certainement partie des cycles « naturels ». En fait un pathogène a intérêt à « exploiter » son hôte plutôt qu'à le tuer rapidement. Il n'est donc pas exclu que ce pathogène ait été introduit et que la population d'oursins se retrouve « naïve » devant cet organisme.

Les symptômes de la maladie se caractérise par plusieurs phases :

- L'oursin se détache du substrat
- L'organisme perd le contrôle de ses podias
- Ses épines se détachent et l'oursin devient vulnérable aux attaques
- Pertes de tissus
- Mort de l'organisme en 3 – 4 jours

Bien que l'action d'un pathogène soit privilégié, il ne peut être écarté qu'une cause extérieure ait pu favoriser l'action de ce ou ces pathogènes. Il faut donc prendre en compte les différentes hypothèses comme la présence d'un ou plusieurs contaminants chimiques (Affaiblissement de l'hôte, effets sur la réponse immunitaire), l'action de biotoxines marines (HAB) en plus de l'action de pathogènes bactérien, viral ou parasite. L'apparition d'un stress « hydrobiologique », notamment la température de l'eau, pourrait aussi l'avoir favorisé.

Par ailleurs, une maladie ayant des symptômes proches a déjà été décrite dans les Antilles en 1983-1984. Cependant, il n'avait pas été possible d'identifier le pathogène et la population était revenue à une situation « normale » en quelques années.

2. Plan d'action – stratégie d'échantillonnage

Le choix de prélever dans trois sites a été discuté : 1 sain, 1 en cours de contamination (présence d'oursins sains et moribonds) et 1 site fortement contaminé (absence d'oursins sains).

Cependant il a été acté que le choix du site « intermédiaire » serait compliqué à faire.
Il a été décidé de ne retenir que 2 sites : 1 sain et 1 contaminé.
Au-delà des oursins pour analyses histologiques et en biologie moléculaire, se pose la question d'analyser d'autres compartiments et de rechercher d'autres types de contaminants.

La recherche de biotoxines marines dans les oursins ne nécessite pas un effort trop important d'échantillonnage. Donc des prélèvements seront effectués en même temps que ceux pour l'histologie/biologie moléculaire.

Parmi les hypothèses retenues, il est apparu important de réfléchir sur l'échantillonnage de la colonne d'eau pour la recherche de contaminants chimiques. Ces recherches pourraient être réalisées à l'aide d'échantilleurs passifs positionnés en cages au-dessus des zones choisies. Ces cages doivent être laissées en immersion plusieurs semaines (3 et 2 respectivement). Au-delà de la disponibilité des EP (POCIS) pour les contaminants chimiques, se pose la question de la récupération des cages (nécessite 2 passages sur chaque zone).

Pour éviter la dispersion et favoriser une action rapide, la priorité a été donnée à la recherche de pathogène dans les oursins prélevés ainsi que la recherche des biotoxines marines.

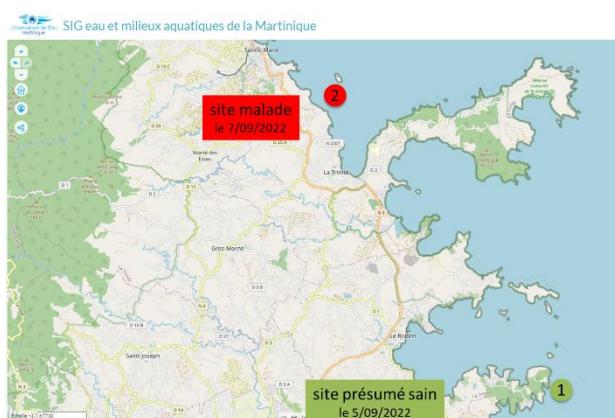
2.1. Echantillonnage des oursins

La campagne d'échantillonnage des oursins a pu être réalisée par l'équipe de l'unité BIODIVENV de l'Ifremer du Robert en septembre 2022.

2.2. Lieux d'échantillonnage

En septembre 2022, très peu de zones de Martinique pouvaient être considérées comme saine.

La carte ci-jointe présente les deux sites qui ont été échantillonnés.



Le site présumé sain est situé à Pointe Larose (absence d'oursin mort) et le site présumé contaminé était lui situé sur la caye de l'Ilet Saint Aubin (présence d'oursins moribonds et morts).

2.3. Protocoles d'échantillonnage

En l'état du matériel disponibles et des ressources financières mobilisables, seules les recherches de pathogène et de biotoxines ont été retenues.

Le détail des protocoles est annexé au présent rapport.

Le traitement de 30 individus a été réalisé à l'Ifremer au Robert. Les analyses de recherche de pathogène ont été assurées par le laboratoire de l'Ifremer à La Tremblade.

Pour la recherche des biotoxines, le broyat de 10 individus « poolés » a été préparé par l'Ifremer Martinique. Les analyses ont été réalisées par le laboratoire Ifremer de Nantes.

Les échantillons pour analyses ont été expédiés par un transporteur spécialisé.

3. Résultats

3.1. Analyses de biotoxines

La recherche des toxines lipophiles : Acide Okadaïques et dinophysis toxins (AO/DTXs), Azaspiracides (AZA), Gymnodimines (GYMs), Pectenotoxines (PTXs), Spirolides (SPXs), Pinnatoxines et Portimine (PnTXs), Palytoxines, Ovatoxines et analogues (PLTXs, OVTXs)

connues pour provoquer d'éventuelles baisses des défenses immunitaires, a été réalisée en juin 2023.

Aucune toxine n'a été détectée dans les échantillons.

3.2. Recherche de pathogènes

La recherche des pathogène a été effectuée par le laboratoire ASIM de l'Ifremer La Tremblade en juillet 2023.

Le rapport complet des analyses réalisées est annexé au présent rapport.

En résumé,

- Plusieurs individus du lot contaminé présentent une infiltration hémocytaire qui est parfois associée à la présence d'organismes pathogènes.
- La présence de ciliés et de bactéries a été noté dans les deux lots d'oursins (sain et malade). Cette présente n'explique pas à elle seule la mortalité (faible nombre dans les individus).
- Des regroupements de cellules pigmentées dans plusieurs individus du lot « malades » pourraient correspondre à une réaction de défense des oursins.

Cependant il n'a pas été possible d'identifier formellement de pathogène responsable de cette mortalité.

4. Conclusion - perspectives

Cet épisode de mortalité massive dans les Antilles et plus largement dans les pays de la Caraïbes, a révélé plusieurs enseignements.

La mobilisation des différents acteurs a été relativement rapide et a permis d'engager une réflexion sur les actions à mener pour investiguer les causes de cette « maladie ».

Cependant, malgré cette mobilisation, il n'a pas été possible d'engager toutes les actions envisagées faute de moyens humains et financiers. Par ailleurs il a fallu faire face à l'absence sur le territoire, de produits et matériels scientifiques nécessaires à la préparation des échantillons pour analyses.

Néanmoins, une campagne de prélèvement a pu être menée par l'Ifremer avec le soutien financier de la DEAL et de l'ODE Martinique.

Les résultats des analyses ne permettent pas formellement d'identifier le pathogène responsable même si la piste du cilié est évoquée.

Une équipe américaine a cependant pu identifier un scuticocilié (Hewson, I., et al. (2023)). comme agent pathogène probable de cette mortalité. Son origine et sa propagation dans la Caraïbe reste à éclaircir.

Annexes

Echantillonnage des oursins pour analyses des biotoxines

- 1) Echantillonner 10 oursins pour chaque zone (1 saine et 1 contaminée). Prélever l'intégralité de la chair des 10 oursins de chaque zone et la placer dans un falcon de 50 ml (échantillons poolés). Centrifuger les deux falcons et éliminer le surnageant.
- 2) Les falcons sont conservés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse

Protocole de traitement des oursins pour analyses histologiques

Objet et domaine d'application

Cette instruction décrit un protocole standard de prétraitement des échantillons d'oursins pour la recherche d'organismes pathogènes en histologie et en biologie moléculaire.

Informations générales

En matière de surveillance en santé animale, l'histologie est intéressante comme première étape, car elle apporte un grand nombre d'informations sur la condition physiologique des animaux examinés et sur la présence éventuelle d'organismes pathogènes. Une bonne préparation des échantillons, et particulièrement l'obtention d'une **coupe de l'organisme** incluant le **maximum d'organes** à observer, est donc primordial.

Généralement, l'histologie ne suffit pas pour détecter de petits organismes pathogènes (virus et certaines bactéries) ou définir l'espèce des parasites observés. Dans ce cas, des études en biologie moléculaire sont nécessaires. Pour cela, il est recommandé de fixer une partie des animaux dans du fixateur pour l'histologie et de conserver tout ou partie des restes d'animaux soit congelé à -20°C ou de préférence en éthanol absolu pour la biologie moléculaire.

Equipements, environnement et consommables

Equipements nécessaires

1. Règle ou pied à coulisse
2. Gros ciseaux (pour ouvrir les oursins en deux)
3. Scalpel ou couteau
4. Gants
5. Pinces à dissection
6. Papier absorbant
7. Crayon de bois
8. Eprouvettes graduées ou distributeurs de volume
9. Piluliers de 100ml pour la fixation des échantillons en histologie
10. Falcon de 50 ml DNASE free, VWR Ref 252-1085 pour la biologie moléculaire

Environnement

1. Pièce bien ventilée
2. Hotte aspirante sur paillasse pour le traitement des échantillons en histologie

Produits

Produits utilisés

1. Ethanol absolu (Réf VWR 20821.365)
2. Ethanol absolu de qualité biologie moléculaire
3. Ethanol 70%
4. Formaldéhyde à 30-36% (Réf VWR 20910.363)
5. Eau de mer filtrée

Préparation des solutions de réactifs

Différents fixateurs peuvent être utilisés pour la réalisation d'analyses histologiques chez les invertébrés marins. Nous présentons dans ce document uniquement le fixateur formol 10% en eau de mer.

Les fixateurs doivent être préparés et utilisés sous hotte aspirante.

Fixateur formol 10%

Mélanger 10% de formaldéhyde dans 90% d'eau de mer filtrée

Ethanol 70%

Mélanger 3600 ml d'éthanol 95-96 % (C_2H_5OH) et 1400 ml d'eau distillée ou 3400 ml d'éthanol absolu (C_2H_5OH) et 1600 ml d'eau distillée

Pour le formol, il faut vérifier l'absence de cristaux. Si des cristaux sont présents dans la solution, il faut filtrer la solution avant utilisation.

Observation macroscopique externe

Chaque oursin est identifié individuellement, mesuré, pesé et examiné afin de noter la présence éventuelle de signe macroscopique.

Si l'individu a perdu une partie de ses épines, préciser l'ampleur de cette perte.

Si possible prendre une photo (avec le code de l'oursin)

Ces informations sont enregistrées dans un tableau (Tableau 1)

Découpe des oursins et observation macroscopique interne

Il a été convenu qu'un échantillonnage de 30 individus soit réalisé. Donc au total 30 oursins par zone (une saine et une contaminée)

Les individus doivent être traités individuellement afin de pouvoir faire la correspondance entre les observations macroscopiques, les portions utilisées en histologie et celles utilisées pour la biologie moléculaire.

Après avoir ouvert les oursins en deux (voir Figure 1), la présence éventuelle de signes macroscopiques internes comme la présence de pustule, d'abcès, de couleur particulière... est relevée (Tableau 1) et des photos sont prises.

Les tissus mous sont détachés du teste avec un scalpel ou couteau en prenant soin de ne pas léser les tissus : une moitié de tissus mous est fixée dans un falcon contenant de l'éthanol absolu de qualité biologie moléculaire (Rnase et Dnase free) et l'autre moitié

dans un pilulier contenant du formol 10%. Chaque pilulier est identifié de façon à pouvoir faire la correspondance entre les deux par la suite.

Prélever deux morceaux de test (au moins 1 cm² chacun correspondant si possible aux zones perdant les épines). Un morceau est ajouté aux tissus mous dans le falcon contenant de l'éthanol absolu de qualité biologie moléculaire et l'autre morceau dans le pilulier contenant du formol 10%.

Après 48h, les tissus et le morceau de test fixés en formol 10% doivent être transvasés dans un nouveau pilulier contenant de l'éthanol 70%. Les prélèvements peuvent alors être conservés à température ambiante jusqu'à ce qu'ils soient inclus en paraffine. Cette étape doit être réalisée sous hotte aspirante.

Par ailleurs il est recommandé de changer l'éthanol absolu de l'échantillon pour analyse en biologie moléculaire après 24h pour éliminer notamment des pigments ou autres substances pouvant dégrader l'ADN après centrifugation (300 g x 10mn).

Remarque : il faut que tous les tissus soient immergés complètement dans le fixateur.

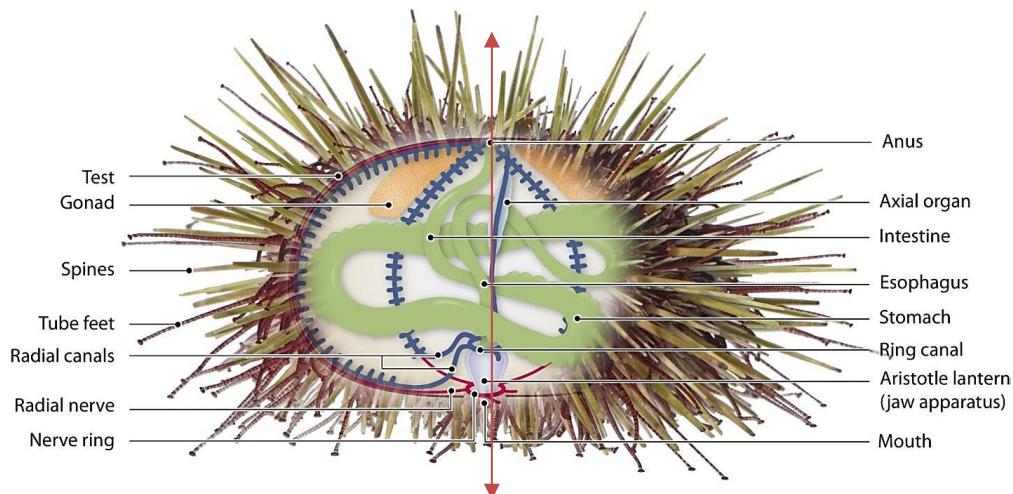


Figure 1- Anatomie de l'oursin et plan de coupe proposé pour la fixation des tissus pour l'histologie et la biologie moléculaire