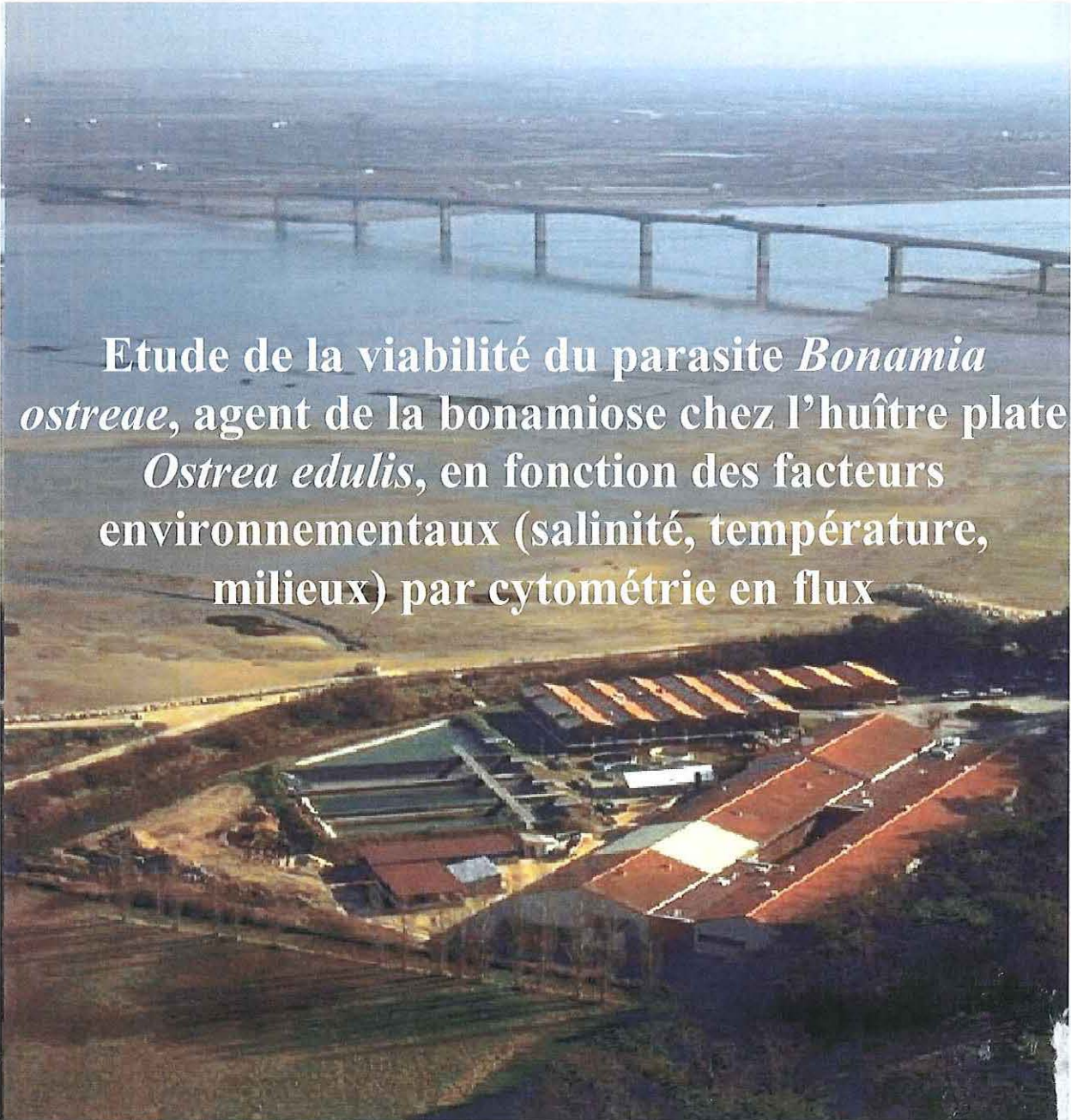


Ifremer

Ésitpa  
Ecole d'Ingénieurs en Agriculture

Bond Céline  
Promotion 102

3783.  
E630.BON.E



Etude de la viabilité du parasite *Bonamia ostreae*, agent de la bonamiose chez l'huître plate *Ostrea edulis*, en fonction des facteurs environnementaux (salinité, température, milieux) par cytométrie en flux

Maître de stage : Arzul Isabelle

Juillet 2006

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03259

# Table des matières

1	Introduction.....	1
2	Présentation et situation du sujet.....	2
2.1	Présentation de la structure de stage.....	2
2.2	Présentation du sujet.....	3
2.3	Contexte de l'étude.....	3
2.3.1	L'histoire de l'huître plate en France.....	3
2.3.2	Elevage et commercialisation de l'huître plate en France.....	4
2.3.2.1	L'obtention de naissain d'huître plate.....	4
2.3.2.2	Les flux dus à l'élevage.....	5
2.3.2.3	La commercialisation d'huître plate.....	6
2.3.3	La bonamiose, maladie due au parasite <i>Bonamia ostreae</i> .....	7
2.3.3.1	Evolution spatio-temporelle de la maladie.....	7
2.3.3.2	Présentation de l'agent parasitaire.....	7
2.3.3.3	Cycle de développement et transmission.....	8
2.3.3.4	Détermination de la période d'infection.....	8
2.3.3.5	Influence des facteurs biotiques.....	9
2.3.3.5.1	L'âge des huîtres.....	9
2.3.3.5.2	Le poids et la taille.....	9
2.3.3.5.3	Le genre, l'espèce et la race des huîtres.....	9
2.3.3.5.4	Le sexe.....	9
2.3.3.6	Influence des facteurs abiotiques.....	10
2.3.3.6.1	La température.....	10
2.3.3.6.2	La salinité.....	10
2.3.3.6.3	Les pratiques culturales.....	11
2.3.3.7	Diagnostic.....	11
2.3.3.8	Les solutions pour limiter cette maladie.....	11
3	Matériel et méthodes.....	12
3.1	Matériel.....	12
3.1.1	Les huîtres plates.....	12
3.2	Méthodes.....	12
3.2.1	Purification de <i>Bonamia ostreae</i> .....	12
3.2.2	Présentation des plans d'expériences.....	13
3.2.3	La cytométrie en flux.....	14
3.2.3.1	Principe.....	14
3.2.3.2	Méthode d'analyse des histogrammes.....	15
3.2.3.3	Les paramètres étudiés.....	15
3.2.3.3.1	Taille/complexité.....	16
3.2.3.3.2	Mortalité cellulaire.....	16
3.2.3.3.3	Activité de type estérase.....	16
3.2.3.3.4	Présence de lysosomes.....	17
3.2.3.4	Analyses statistiques.....	17
4	Résultats.....	18
4.1	Purification du parasite.....	18

4.2	Analyse des résultats sur les facteurs températures, milieux et temps .....	18
4.3	Analyse des résultats sur les facteurs salinité et temps au sein du milieu eau de forage à 15°C.....	23
5	<i>Discussion</i> .....	26
6	<i>Conclusion</i> .....	28
7	<i>Liste des figures et tableaux</i> .....	29
8	<i>Liste des abréviations</i> .....	30
9	<i>Bibliographie</i> .....	31
ANNEXE 1: Classification phylogénétique de <i>Bonamia ostreae</i> sur la base de la séquence de la petite sous unité ribosomale de l'ADN.....		34
ANNEXE 2 : Méthode histologique d'identification du taux d'infection des huîtres (D'après Morga 2006).....		35
ANNEXE 3 : Protocole de purification du parasite <i>Bonamia ostreae</i> .....		36
ANNEXE 4: Principe schématique du fonctionnement d'un cytomètre en flux et Composition du cytomètre de flux Beckman Coulter EPICS XL4 utilisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie (Ifremer La Tremblade).....		39
ANNEXE 5 : Résultat des purifications.....		40
ANNEXE 6 : Données brutes des tests Température-Milieux-Temps.....		41
ANNEXE 7: Données brutes des tests Salinité-Temps par cytométrie en flux.....		43

# ***1 Introduction***

L'ostréiculture est une activité qui se pratique particulièrement dans des zones estuariennes. L'environnement y est propice du fait des interactions entre le milieu marin et le milieu dulçaquicole.

Les deux espèces d'huître cultivées en France métropolitaine sont l'huître creuse ou huître japonaise, *Crassostrea gigas*, et dans une moindre mesure l'huître plate, *Ostrea edulis*.

La production d'huître plate en France et sa commercialisation ont essentiellement lieu en Bretagne. Les deux principaux sites de captage de naissain sont à Quiberon et en rade de Brest. Le grossissement de ces huîtres plates se fait en grande majorité à Cancale.

Les huîtres plates ont vu leur population diminuer en raison de deux épizooties, la marteiliose en 1968 due à *Marteilia refringens* ainsi que la bonamiose en 1979 due à l'agent parasitaire *Bonamia ostreae*.

La bonamiose est une maladie infectieuse inscrite dans la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'office internationale des épizooties (OIE), ce qui implique une surveillance des stocks et des restrictions de transfert afin d'éviter la contamination des zones encore indemnes. Cette maladie touche l'ensemble des sites ostréicoles européens et français à l'exception de deux sites de la rive droite de la Seine à la frontière belge et le gisement de Granville en Normandie. L'obtention de parasites purifiés a permis d'entreprendre la reproduction et la modélisation de la bonamiose au laboratoire.

Aujourd'hui, le cycle complet d'infection du parasite *Bonamia ostreae* reste encore inconnu. Cependant, l'infection peut être transmise directement par cohabitation entre des huîtres saines et infectées sans nécessiter d'un hôte intermédiaire.

Les méthodes de lutttes reposent d'avantage sur la prévention par des mesures prophylactiques que curatives. La recherche de souches résistantes par sélection génétique est aussi en pleine expansion. En effet, l'élevage en milieu ouvert ne permet pas d'utiliser des traitements anti-parasitaires et la vaccination est impossible car les mollusques ne présentent pas d'anticorps.

Dans ce contexte, mon stage avait pour objectif l'étude de la survie du parasite *Bonamia ostreae* en fonction des paramètres environnementaux en utilisant la cytométrie de flux afin de définir les conditions optimales de conservation du parasite purifié.

Les résultats attendus présentent un intérêt pratique en définissant les conditions optimales de conservation du parasite une fois purifié dans le cadre par exemple des infections expérimentales. Par ailleurs, les résultats obtenus devraient également permettre d'améliorer la compréhension du cycle de développement de *Bonamia ostreae*.

## ***2 Présentation et situation du sujet***

### **2.1 Présentation de la structure de stage**

Les huîtres affinées de Marennes sont une image forte de la Charente Maritime. Elles offrent à la région des centaines d'emplois et représentent un attrait touristique reconnu.

Le bassin de Marennes Oléron, situé en région Poitou-Charentes au sein du département de la Charente-Maritime est la première région pour son nombre d'entreprises ostréicoles avec 4 650 hectares de surface exploitée. C'est également le premier lieu pour l'affinage en France. La Charente-Maritime assure la majorité des ventes nationales d'huîtres creuses (46 820 tonnes soit 43% de la production nationale).

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station IFREMER de la Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Mon stage s'est déroulé pendant 3 mois au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) à la station IFREMER de la Tremblade et plus particulièrement au sein de l'unité de pathologie.

En effet, deux laboratoires sont regroupés au sein de la station IFREMER de la Tremblade .

➤ **Le LERPC**: Laboratoire Environnement et Ressources de Poitou-Charentes qui s'occupe de la surveillance de l'environnement littoral. Sa compétence géographique pour l'environnement s'étend de la rive gauche de la Charente à la Gironde. Dans le domaine conchylicole, ses compétences s'étendent sur l'ensemble des pertuis charentais, depuis le sud de la Vendée jusqu'à l'estuaire de la Gironde.

➤ **Le LGP**: Laboratoire de Génétique et de Pathologie des invertébrés marins et plus particulièrement des mollusques bivalves.

Les travaux du laboratoire LGP s'inscrivent dans deux thèmes : l'observation et la surveillance de la mer côtière (suivi des maladies des mollusques) et l'optimisation et le développement des productions aquacoles (santé des populations d'élevage, amélioration génétique des espèces aquacoles)

En tant que laboratoire thématique, le LGP anime les programmes de recherche en génétique et pathologie au sein de la direction des ressources vivantes ainsi que le réseau de surveillance en pathologie des mollusques (REPAMO). Le LGP est également laboratoire communautaire de référence (LCR) pour l'Union Européenne et pour l'OIE (Office Internationale des Epizooties).

## 2.2 Présentation du sujet

L'utilisation de modèles prédictifs de l'évolution de la bonamiose permettrait une gestion avisée des stocks d'huîtres plates afin de réduire l'impact de la maladie.

Cependant, l'élaboration de modèles prédictifs nécessite une bonne connaissance de la maladie et des interactions hôte-pathogène. La maladie peut être reproduite en laboratoire notamment en injectant des parasites purifiés à partir d'huîtres infectées. Cette possibilité offre de nombreux avantages pour le développement de travaux de recherche.

Néanmoins, des données concernant les conditions les plus propices au maintien et à la viabilité de ces cellules purifiées (durée, température et fixateurs) sont nécessaires pour approfondir les travaux de recherche.

Dans ce contexte, mon travail a consisté à étudier la viabilité du parasite en fonction des différents paramètres (milieux, durée, température, salinité) afin de définir les conditions optimales de conservation des particules purifiées en utilisant la cytométrie en flux.

Les huîtres fortement infectées ont été retenues pour purifier le parasite. Les mesures de mortalité, d'activité enzymatique de type estérase, le nombre de lysosomes ont été testées sur le parasite au cours du temps par cytométrie en flux pour l'ensemble des milieux de conservation retenus.

Différentes salinités et températures ont également été testées après avoir identifié le meilleur milieu de conservation.

## 2.3 Contexte de l'étude

### 2.3.1 L'histoire de l'huître plate en France

Les gisements naturels d'huîtres plates ont été exploités pendant des siècles par simple ramassage à marée basse ou par pêche à partir de bateaux dans des eaux plus profondes.

A partir du 18ème siècle, un début de pénurie s'est fait ressentir. Ce dernier est lié à la double action du climat (gelées) et de la surpêche. Pour pallier ce début de pénurie des biologistes cherchèrent les moyens de repeupler le littoral français.

Au 19ème siècle, les premières cultures d'huîtres se sont développées dans des réservoirs de marais salants puis dans des bassins spécialement aménagés. C'était la naissance de l'ostréiculture moderne grâce aux travaux de Coste et de De Bon en 1853 et 1859 qui ont expérimenté les premiers collecteurs français pour capter les naissains dans le milieu naturel. Désormais les hommes pouvaient s'affranchir de la pêche pour obtenir du naissain en quantité abondante et régulière.

A cette époque, l'huître plate était la seule espèce d'huître sur le littoral français. Aussi, le gouvernement autorisa l'importation depuis le Portugal vers le bassin d'Arcachon d'huîtres creuses dites « Portugaises », *Crassostrea angulata*. Au cours d'un de ces transports, en 1868, le bateau « Le Morlaisien » fut obligé, en pleine tempête, de se réfugier pendant plusieurs jours dans l'estuaire de la Gironde. Il fut contraint de jeter sa cargaison d'huîtres par dessus bord. Les huîtres les plus résistantes s'acclimatèrent et se reproduisirent.

L'huître portugaise s'implanta largement sur nos côtes et la production des deux espèces fut équilibrée jusque vers 1920 où un épisode de mortalité inexpliqué diminua considérablement la production d'huîtres plates.



Dans les années 67-70 se fut au tour de l'huître creuse portugaise d'être décimée par la « maladie des branchies » attribuée à un iridovirus. Progressivement, l'introduction de l'huître Japonaise, *Crassostrea gigas* remplaça le cheptel d'huîtres portugaises.

La production de l'huître plate, alors limitée aux côtes bretonnes, connut dans les mêmes années 60-70 l'explosion de deux maladies, la marteiliose ou maladie des Abers, en 1968, due au parasite *Marteilia refringens* (Comps 1970, Herbash 1971, Grizel *et al.* 1974) et la Bonamiose, en 1979, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.* 1979, Comps *et al.* 1980, Comps 1983). Ces deux maladies ont considérablement affecté la production qui est passée de 20 000 tonnes dans les années 1970 à 2300 tonnes en 1985 et 1650 tonnes en 2002 (Fig 1).

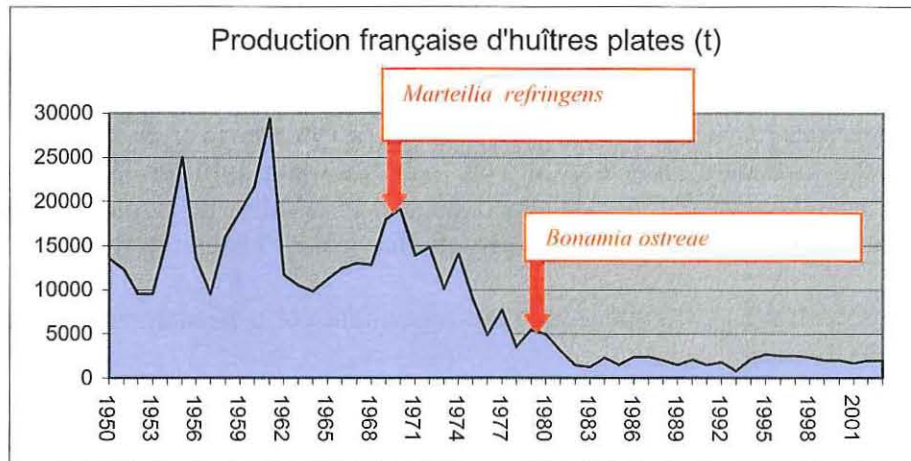


Fig 1 : Evolution de la production française d'huîtres plates entre 1950 et 2003 (source ifremer)

## 2.3.2 Elevage et commercialisation de l'huître plate en France

### 2.3.2.1 *L'obtention de naissain d'huître plate*

L'huître plate, *Ostreae edulis*, est hermaphrodite. Elle est au début de sa vie mâle, puis elle change de sexe en fonction de facteurs environnementaux tel que la température ou l'alimentation. La fécondation des ovocytes, contrairement à celle de l'huître creuse a lieu dans la cavité palléale de l'huître mère par fécondation de sperme venant de l'extérieur. Les larves y restent quelques jours, puis sont expulsées dans le milieu, ou elles mènent une vie pélagique d'environ trois semaines. Après une nouvelle transformation, la larve se fixe sur un support : ces jeunes huîtres sont appelées naissain. Le naissain est essentiellement capté en milieu naturel mais peut aussi être produit en éclosérie. L'ostréiculteur place des collecteurs (tuiles ou poches de coquilles suspendues sous cadres) dans le milieu marin au moment de la fixation. Vient ensuite l'étape de détroquage qui consiste à séparer les huîtres du collecteur pendant la première année de vie de l'huître, vers l'âge de 9 mois. Le détroquage peut être manuel. Il est alors pratiqué à l'aide d'un couteau de forme spéciale.

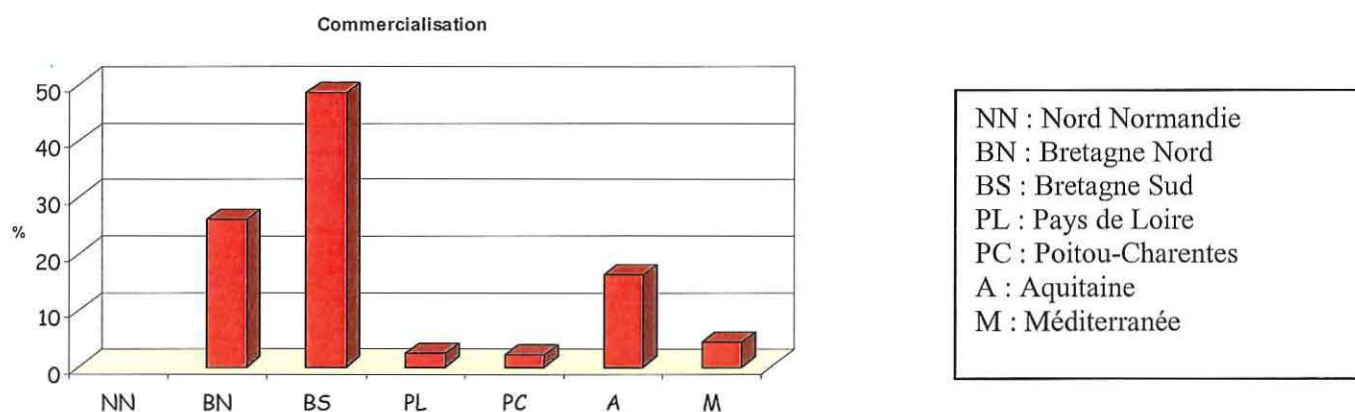
Du fait de l'incubation des larves dans la cavité palléale chez l'huître plate, il est plus difficile d'obtenir des huîtres plates en éclosérie que des huîtres creuses.

### 2.3.2.2 Les flux dus à l'élevage

Les transferts et mouvements de mollusques font parties intégrantes de la culture de l'huître plate. Sur le territoire français, la production d'huîtres plates est répartie selon les particularités du milieu.

Aujourd'hui, les deux principaux sites de captage sont à Quiberon (56) et en rade de Brest (29). En 2000, 373 millions de naissain d'huîtres plates ont été capté pour l'essentiel en baie de Quiberon (Girard *et al.* 2005).

Vers l'âge de 9 mois, le naissain est transféré vers des zones plus propices au grossissement notamment à Cancale qui est le principal site d'élevage. Les adultes sont également transférés et généralement ré immergés dans les parcs lors de commercialisation éloignée du site de production. 83 % des huîtres plates adultes changent d'entreprises avant d'être commercialisées principalement en Bretagne Sud (49 %) et Nord (26 %) mais aussi en Aquitaine (16 %), Méditerranée (4 %), Pays de Loire (2%) et Poitou-Charentes (2 %) (Girard *et al.* 2005 ; Fig 2).



Source : recensement agreste 2001

Fig 2 : Commercialisation de l'huître plate en France et par région

Il existe également des transferts intra entreprises : en 2001, 500 tonnes d'huîtres plates adultes, soit un quart des ventes françaises, élevées en Bretagne Nord ont été transférées en Bretagne Sud pour le marquage sanitaire et la commercialisation sous l'appellation « Belon » (Fig 3).

Les sites ostréicoles se sont spécialisés en fonction de leurs caractéristiques et grâce à la modernisation de l'ostréiculture.



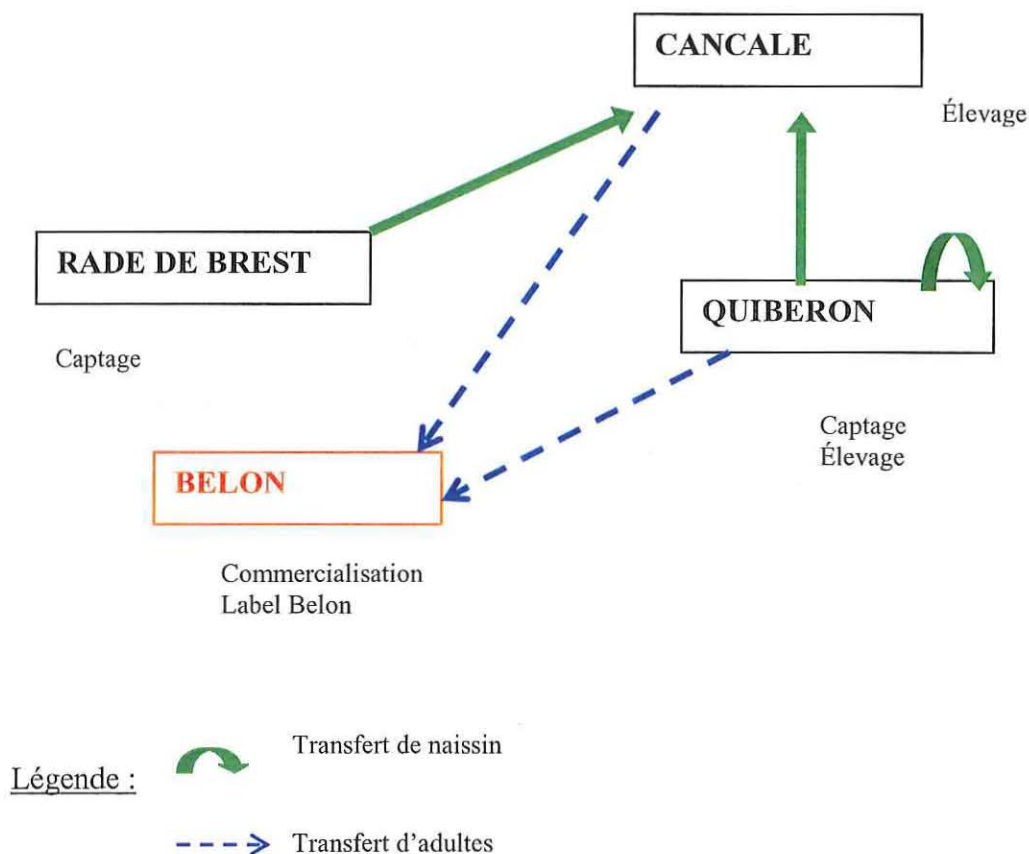


Fig 3 : Les flux d'huîtres plates dus à l'élevage en Bretagne (Blanchet, 2005)

Les échanges et les transferts sont nécessaires pour amener les lots aux différents sites selon le stade de culture (Fig 3). Cependant, les risques zoo sanitaires associés sont d'autant plus importants. Ainsi la transmission de pathogène représente un des risques majeurs liés à ce mode de culture.

### 2.3.2.3 La commercialisation d'huître plate

Les entreprises de Bretagne sud commercialisent la moitié des huîtres plates (Belon) pour la consommation. Elles s'approvisionnent auprès d'éleveurs de Bretagne nord. En 2001, près de 350 entreprises vendent 1650 tonnes d'huîtres plates sous marquage sanitaire. Cette espèce indigène a survécu à différentes crises, notamment parasitaires. Sa production semble se stabiliser. La vente directe aux consommateurs représente près d'un tiers des ventes, soit plus que pour les huîtres creuses. Les poissonniers et restaurateurs achètent 21 % des quantités d'huîtres plates. Les ventes à des grandes et moyennes surfaces, portent sur 20 % des volumes expédiés, cependant, elles sont peu fréquentes en dehors des régions bretonnes. L'exportation d'huître plate ainsi que les intermédiaires traditionnels (grossistes et revendeurs) écoulent respectivement 7 % et 15 % de la production mise sur le marché (Girard *et al.* 2005).

### 2.3.3 La bonamiose, maladie due au parasite *Bonamia ostreae*

La bonamiose est autrement connue sous les noms de maladie hémocytaire de l'huître plate et de parasitose hémocytaire. Le parasitisme par *Bonamia ostreae* n'entraîne aucune altération organoleptique et la consommation d'huîtres parasitées n'entraîne aucun méfait chez l'homme.

#### 2.3.3.1 *Evolution spatio-temporelle de la maladie*

L'apparition de ce parasite sur le littoral français aurait pour origine une importation de naissain d'huître provenant de Californie (Grizel 1985, Balouet 1983). En effet de 1969 à 1986, l'importation de naissain de Californie a été réalisée sur le territoire français notamment pour diversifier l'origine des huîtres plates. Cette importation était « frauduleuse » puisque aucun agrément entre la France et les Etats-Unis n'avait été signé. Les naissains étaient infectés par des microcells, organismes non spores, de la taille des bactéries, habituellement ronds et avec un noyau circulaire. Ces organismes étaient considérés comme peu pathogènes et donc n'étaient pas un critère de refus d'importation. Le parasite, associé au groupe des microcells (Grizel 1997, Grizel 1985), a été observé pour la première fois sur l'île Tudy en Bretagne en association à de fortes mortalités d'huîtres plates (Pichot *et al.* 1979). Cette maladie s'est ensuite très vite répandue sur le littoral français et européen par le biais de transferts de coquillage. En 1987, la bonamiose a atteint la méditerranée dans l'étang de Thau.

Aujourd'hui, la bonamiose due à *Bonamia ostreae* est présente en Europe, en Amérique du nord et au Maroc.

#### 2.3.3.2 *Présentation de l'agent parasitaire*

Le parasite *Bonamia ostreae*, agent de la bonamiose est un protiste, les particules denses structurales (Besnard-Cochennec 2001, Pichot *et al.* 1979) permettent de l'apparenter à l'ordre des Haplosporidia. Cette hypothèse a été confirmée par le séquençage du gène codant l'ARN 18S. La comparaison des séquences homologues chez d'autres protozoaires renforce l'hypothèse que *Bonamia ostreae* appartiendrait à l'ordre des Haplosporidia (Annexe 1) (Carnegie *et al.* 2000, Cochennec *et al.* 2000, Reece *et al.* 2004).

Le parasite est le plus souvent observé à l'intérieur des cellules circulantes des huîtres, les hémocytes (Fig 4), mais il peut également être observé en position extracellulaire. La taille de la cellule du parasite est comprise entre 2 et 4 µm de diamètre. Une fois phagocyté par les hémocytes, le parasite est entouré d'une membrane endocytaire formant la vacuole phagocytaire.

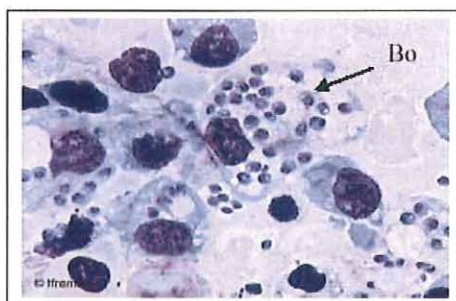


Fig 4: *Bonamia ostreae* (Bo) intrahémocytaire (x 100),  
Apposition cardiaque, coloration Hémacolor® (source ifremer)

Deux formes du parasite ont été décrites en microscopie électronique à transmission : une forme claire et une forme dense (Pichot *et al.* 1979). Les formes denses sont les plus répandues, ces cellules possèdent un noyau limité par une double membrane, des ribosomes, des mitochondries, et des corps denses sans structure apparente (Fig 5, Comps 1983).

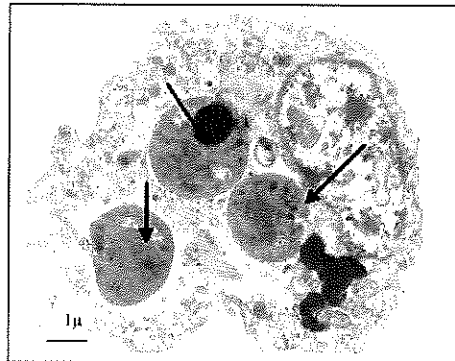


Fig 5 : *Bonamia ostreae* intrahémocytaire observé en microscopie électronique à transmission (source ifremer)

Les formes claires présentent des différences, le noyau peut posséder un volumineux nucléole localisé en périphérie. Les mitochondries possèdent des crêtes plus nettes et plus nombreuses. Un autre type d'organe est représenté par des formes membranaires renfermées en saccules similaires à un appareil de Golgi. Les formes denses souvent détectées dans les tissus très parasités, et les formes claires décrites dans des tissus faiblement parasités, ont été respectivement interprétées comme des formes de résistance et des formes végétatives du parasite (Pichot *et al.* 1979).

### ***2.3.3.3 Cycle de développement et transmission***

De nombreuses études microscopiques ont été réalisées pour décrire le développement et la transmission du parasite. Cependant, le cycle complet de *Bonamia ostreae* reste aujourd'hui inconnu avec toutefois une constante : aucune spore n'a jamais été décrite. En outre, la possibilité pour le parasite de se transmettre à des huîtres saines par simple contact (cohabitation) avec des huîtres infectées a été démontrée expérimentalement, prouvant la non nécessité d'un hôte intermédiaire.

L'obtention de parasites purifiés permet d'entreprendre la reproduction et la modélisation de la bonamiose en laboratoire (Mialhe *et al.* 1988 et Hervio 1992). La dose infectieuse définie pour infecter 50 % des huîtres (DI 50 %) selon la méthode de Reed et Meunch (1938) est de 94 560 parasites purifiés en injection péricardique d'huîtres âgées de 3 ans et maintenues 6 mois en laboratoire (Hervio 1992). L'auteur remarque que cette dose est relativement élevée et que la question se pose de savoir si dans le milieu naturel des huîtres sont susceptibles d'être atteintes par de telles concentrations parasitaires, ou si en dépit d'une viabilité parfaite après purification, les parasites perdent leur infectiosité.

### ***2.3.3.4 Détermination de la période d'infection***

Les premiers stades d'infection sont détectés 3 à 5 mois après immersion d'huîtres saines en milieu contaminé (Tigé et Grizel 1984, Grizel 1985). Les contaminations peuvent être obtenues toute l'année indépendamment des variations thermiques. La température et la saison ne semblent

pas prépondérantes pour la bonamiose. Toutefois, la prévalence et les taux d'infection sont plus importants lorsque la maladie débute en été (Grizel 1985).

### 2.3.3.5 *Influence des facteurs biotiques*

#### 2.3.3.5.1 L'âge des huîtres

Les nombreux suivis épidémiologiques reposant sur l'utilisation avec les outils classiques de cytologie, ont montré que la bonamiose peut être décelée chez des huîtres de tout âge, mais que le naissain (< 12 mois) est toujours peu parasité (< 3 %). Cependant, le développement d'outils moléculaires telle que la PCR permet d'obtenir des résultats différents. En effet, les résultats de l'étude réalisée en PCR par Lynch *et al.* (2005) montrent que les jeunes huîtres (2.9 cm) peuvent devenir infectées peu de temps après avoir été exposées à la maladie et présentent une forte prévalence et une intensité d'infection modérée (12% d'individus positifs en PCR contre 4% en apposition cardiaque).

Les classes d'âge de 2, 3, 4 ans sont classiquement les plus fortement infectés. Cela correspond à des huîtres en âge de se reproduire. Les huîtres malades peuvent, malgré l'infection, murer et émettre des gamètes viables.

#### 2.3.3.5.2 Le poids et la taille

Aujourd'hui, il apparaît que la bonamiose soit une maladie taille-dépendante. Des études ont démontré que des huîtres de petites tailles restent immatures plus longtemps que les autres et seraient moins infectées que des huîtres plus grandes. La présence du parasite dépendrait donc bien de la taille et non de l'âge (Caceres-Martinez *et al.* 1995). Selon (Figueras 1991) la mortalité atteint surtout les huîtres de grande taille. Cependant des travaux ont présenté que les huîtres de poids supérieurs présenteraient une prévalence plus faible (Culloty *et al.* 1996).

Le caractère taille- dépendant n'est donc pas encore prouvé.

#### 2.3.3.5.3 Le genre, l'espèce et la race des huîtres

En France et en Europe, l'huître plate *Ostrea edulis* est la seule espèce naturellement sensible à *Bonamia ostreae*.

Les tests effectués avec des huîtres plates *Ostrea edulis* provenant de différentes origines géographiques (St Brieux, Mt St Michel, Méditerranée, étang d'Urbino) ont montré qu'elles étaient toutes sensibles à *Bonamia ostreae*. Cependant, les différences de réceptivité entre race n'ont pas été démontrées.

D'autres espèces d'huîtres plates telles que *Ostrea chilensis*, *Ostrea puelchana* et *Ostrea arparasi* ont été immergées en zone infectée et sont également apparues sensibles à *Bonamia ostreae* (Grizel *et al.* 1983, Pascual *et al.* 1991, Bougrier *et al.* 1986). La morphologie et l'ultrastructure du parasite sont comparables chez les deux hôtes.

#### 2.3.3.5.4 Le sexe

Selon Van Banning (1990), la première phase du cycle consisterait en une infestation des ovocytes, impliquant des taux d'infestation supérieurs chez les femelles. Cependant plusieurs études réfutent cette hypothèse en démontrant un taux d'infection des femelles inférieur à celui des mâles sauf en été (Culloty *et al.* 1996) ainsi qu'aucune indication de transmission verticale (Hine 1991 et 2002).



De plus, les travaux ont révélé que la bonamiose est indépendante du stade de développement des gonades (Caceres-Martinez *et al.* 1995).

L'hypothèse d'une sensibilité supérieure des femelles à l'infection reste posée, d'autant que le stress occasionné par la ponte et la dépense d'énergie allouée à la progéniture diminueraient les défenses des femelles et la capacité des hémocytes à contenir et ou éliminer le parasite.

### **2.3.3.6 Influence des facteurs abiotiques**

#### **2.3.3.6.1 La température**

La température semble influencer directement sur l'immunocompétence et l'efficacité de réaction face aux infections parasitaires (Cheng 1987). Les capacités de défenses des huîtres plates *Ostrea edulis* ainsi que l'évolution de la bonamiose sur des lots après inoculation en fonction de quatre conditions thermiques (10°C, 20°C, 10°C puis 20°C, 20°C puis 10°C) ont été étudiées (Cochennec-Laureau *et al.* en préparation). Le pourcentage de granulocytes (hémocytes de grosses tailles qui contiennent des granules) a significativement diminué à 10°C et au passage de 20°C à 10 °C, associé à une diminution des activités enzymatiques des hémocytes. Les productions non spécifiques d'estérases sont diminuées à 10°C, de 20°C à 10°C et de 10°C à 20°C, celles des peroxydes d'hydrogène à 10°C. Il en ressort que l'immunocompétence de l'huître est affectée par une température basse ou un changement de température. Les plus faibles taux d'infection ont été relevés à 20°C : soit l'infection à cette température est plus lente, soit le mécanisme infectieux est différent. Le développement de la maladie paraît donc associé à une immunodépression, celle ci favorisant l'infection ou la virulence du parasite.

Aussi, la température seule ne semble pas être un facteur déterminant dans le développement de la bonamiose. Elston en 1988, a rapporté que le maintien expérimental des huîtres parasitées à une température inférieure à 10 °C semble permettre de limiter l'infection une fois qu'elle est déclarée.

De plus, la bonamiose semble avoir un cycle saisonnier, légèrement différent selon le lieu de production (Espagne, Irlande ou Hollande) (Culloty *et al.* 1996, Montes *et al.* 1987, Figueras 1991 Cochennec-Laureau *et al.* 2004). La prévalence la plus forte est observée à faible température.

L'infection se révèle donc plus importante lors de changement de température et à basse température. La bonamiose reste cependant détectable toute l'année et le cycle d'infestation et de mortalité est continu d'une année sur l'autre (Culloty *et al.* 1996).

#### **2.3.3.6.2 La salinité**

L'impact de la salinité sur le développement de la bonamiose due à l'agent parasite *Bonamia ostreae* qui atteint les huîtres plates *Ostrea edulis* n'est pas clairement identifié.

Le développement de l'infection chez des huîtres plates Néo-Zélandaises, *Ostrea chilensis* parasitées par un parasite proche de *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, a été étudié en fonction de certaines conditions environnementales dont la salinité (Hine 2002). Une hypersalinité de 40g/l était associée aux trois plus fortes intensités d'infection. L'hyper salinité a notamment entraîné un stress tel qu'il a pu supprimer les défenses immunitaires et ainsi favoriser le développement de la maladie. Une hyposalinité de 15g/l a induit 100% de mortalité, non reliée à l'infestation de *Bonamia exitiosa*.

L'influence des plus faibles variations de salinité n'est pas connue. Elle paraît intéressante à étudier tout en recherchant au préalable dans quelle mesure la salinité peut être modifiée en élevage.

#### 2.3.3.6.3 Les pratiques culturelles

D'après Hudson *et al.* (1991), les pertes les plus importantes dues à la bonamiose auraient lieu en zone intertidale plus qu'en zone d'eaux profondes.

La diminution de la densité d'élevage pour les nouveaux semis d'huîtres permet de diminuer le stress et de limiter l'expansion de la maladie (Besnard-Cochennec 2001). Par ailleurs, l'association d'huîtres plates et creuses a permis d'obtenir de meilleurs résultats d'élevage (Bodoy *et al.* 1991, Le Bec *et al.* 1991). La suppression des manipulations et des transferts permet aussi de limiter l'affaiblissement des huîtres et leur vulnérabilité vis-à-vis du parasite. Ces recommandations du contrat de plan Etat- Région, 1984 et 1990, ont permis de maintenir une activité ostréicole des huîtres plates dans quelques sites d'eaux profondes, notamment à Quiberon et Cancale.

#### 2.3.3.7 *Diagnostic*

Les méthodes de diagnostic de référence sont l'histologie et la cytologie par apposition de tissus cardiaque (Bachère *et al.* 1982, Zabaleta and Barber 1994, O'Neill *et al.* 1994). Ces techniques permettent notamment de vérifier le taux d'infection des huîtres au parasite *Bonamia ostreae* (Annexe 2). Après ouverture des huîtres, le cœur ou un morceau de branchie est prélevé et essoré sur un papier filtre. Une série d'apposition des tissus est alors effectuée sur une lame histologique. La préparation est colorée à l'aide du kit HEMACOLOR (Merk) et examinée au microscope optique (×1000).

4 classes d'infection sont déterminées :

- (-) après 5 minutes de lecture, aucun parasite n'est observé
- (+) 1 à 2 parasites sont observés par champs d'observation
- (++) >10 parasites par champs d'observation
- (+++) > 30 parasites par champs d'observation

Aujourd'hui de nouveaux outils diagnostiques plus rapides et plus sensibles existent comme la PCR et l'Hybridation in situ (Cochennec *et al.* 2000, Carnegie *et al.* 2000).

#### 2.3.3.8 *Les solutions pour limiter cette maladie*

Pour préserver les cheptels et réduire à leur plus bas niveau les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes, les moyens de lutte reposent sur la prophylaxie zoosanitaire, la prophylaxie zootechnique et l'amélioration génétique. En effet, l'absence de réponse immunitaire « spécifique » rend la vaccination impossible.

Les huîtres ne possèdent pas de lymphocytes T et B, cellules directement impliquées chez les vertébrés dans les réponses spécifiques vis-à-vis d'un agent pathogène et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

Le contrôle zoosanitaire repose entre autre sur la fiabilité des techniques de diagnostic pour limiter les transferts d'animaux infectés et ainsi contrôler la dissémination.

L'amélioration génétique consiste à sélectionner des animaux plus résistants à la maladie mais aussi à améliorer les performances de croissance pour essayer « de prendre de vitesse » le développement de la maladie. Des souches d'huîtres plates tolérantes ont été obtenues aux Etats Unis et en France par sélection génétique et permettent de limiter le taux d'infection.

## 3 Matériel et méthodes

### 3.1 Matériel

#### 3.1.1 Les huîtres plates

Les huîtres plates utilisées pour réaliser les expériences proviennent de la baie de Quiberon (Bretagne Sud), zone endémique pour la bonamiose. Ces huîtres ont été stockées dans des raceways de 120 litres alimentés en eau enrichie en phytoplancton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracialis* et *Tetraselmis succica*) et maintenue à une température comprise entre 12 et 15 °C et circulant avec un débit de 150 litres par heure.

Certaines huîtres ont été infectées par injection. Ces dernières sont stockées dans des filets au sein du raceway et contaminent les autres huîtres plates. L'ensemble des huîtres constitue une « réserve » pour les purifications de parasites. Les huîtres sont âgées d'au moins deux ans. La mortalité est vérifiée quotidiennement et les raceways sont nettoyés une fois par semaine. Les huîtres mortes sont échantillonnées et analysées immédiatement par apposition de tissus cardiaques.

Seules les huîtres fortement infectées après observation du frottis au microscope sont conservées pour les purifications de *Bonamia ostreae*.

### 3.2 Méthodes

#### 3.2.1 Purification de *Bonamia ostreae*

La purification est la seule solution pour disposer de suspensions parasitaires (Annexe 3). Il n'existe pas à l'heure actuelle de système permettant de conserver ou cultiver, *in vitro*, ce parasite.

La purification de *Bonamia ostreae* a été une étape clé dans l'analyse de la survie du parasite. En effet, il était indispensable de pouvoir disposer d'un grand nombre de parasites, purs sans autres contaminants. Les parasites sont obtenus en suivant le protocole de Mialhe *et al.* (1988) optimisé par Cochenne *et al.* (1997).

Des huîtres fortement parasitées sont identifiées par examen cytologique d'apposition de tissus cardiaque. Le corps entier de l'animal est utilisé pour la purification, à l'exception du muscle adducteur dont la nature fibreuse empêche une homogénéisation correcte des tissus.

Les tissus infectés sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile, additionnée de détergent, Tween 80, à la concentration finale de 1% (EMFT), puis broyés dans de l'EMFT à l'aide d'un homogénéisateur de tissus, Ultra-turrax, qui permet de dissocier tissus et cellules. L'utilisation de broyats tissulaires permet de récupérer les parasites localisés dans les hémocytes. L'homogénéisat est ensuite filtré sur des toiles de porosité décroissante (100, 75, 20 µm) afin d'éliminer les débris fibreux. La suspension ainsi filtrée est centrifugée (3500 tours/min, 30 min, 8°C). Le culot est repris dans un petit volume d'EMFT, puis à nouveau broyé à l'homogénéisateur. Les parasites et les éléments particuliers présents dans les culots sont séparés par une première centrifugation différentielle dans une solution de sucrose 20 % dilué avec de l'EMFT.

Les cellules de parasites, les cellules non dissociées et les débris cellulaires sont ensuite séparés sur un gradient discontinu de sucrose (20%-40% diluée dans de l'EMFT) par centrifugation. L'étape suivante repose sur un gradient de densité avec des solutions de percoll (30-40-50-60-70 % dilué dans de l'EMFT). L'osmolarité du percoll est ajustée à celle du milieu marin, c'est-à-dire 1 100 mOsm, par addition de 4,1% de chlorure de sodium. Après centrifugation, les parasites purifiés qui sont localisés aux interfaces 50-60% et 60-70% du gradient, sont prélevés à l'aide d'une seringue. Ces derniers sont dilués dans de l'EMF sans Tween, puis déposés sur un coussin de sucrose 20% avant centrifugation. Cette dernière étape permet d'éliminer le percoll et de concentrer les cellules de parasites. La numération des parasites ainsi purifiés est réalisée au microscope sur cellules de Malassez.

### 3.2.2 Présentation des plans d'expériences

La survie du parasite a été étudiée en fonction du milieu de conservation et de deux facteurs environnementaux qui sont la température et la salinité.

Les parasites obtenus par purification ont été maintenues dans un premier temps dans différents milieux ; eau de mer filtré (EMF), eau de forage et eau de Lewis et à différentes températures ; 4°C, 15°C et 25°C, puis l'effet de la salinité a été mesuré en maintenant des parasites en eau de forage à 15°C à différentes salinités ; 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45g/l.

La mortalité cellulaire, les activités estérases ainsi que la présence de lysosomes ont été mesurée par cytométrie en flux pour les différentes suspensions parasitaires et à différents temps (12h, 24h, 48h et 1 semaine post purification).

L'eau de forage utilisée est brute, sa composition est proche de l'eau de mer mais apparaît plus riche en fer, manganèse et ammoniacque (Tableau 1). Cette eau est naturellement filtrée par les couches géologiques qui constituent le sol. Cette eau est donc dépourvue en bactérie et est enrichie en minéraux. La salinité naturelle de l'eau de forage est de 32g/l et son pH est de 7,06.

Date	Eau de forage brute				
	en mg/litre	nitrites	nitrates	fer	manga- nèse
16/02/2001	0	1,76	0,17	0,6	2,56
16/03/2001	0	1,76	0,12	0,1	2,55
18/04/2001	0	0	0,19	0,2	2,68
29/05/2001	0,02	1,32	0,22	0,9	2,9
05/07/2001	0,01	2,2	0,19	0,4	3,03

Tableau 1: Composition de l'eau de forage brute (Analyse 2001)

L'eau de mer est pompée directement au sein de la Seudre et est préalablement filtrée à 1µm par une série de filtres à sable et des poches. Dans le cadre de nos travaux, elle a été filtrée à 0,22µm afin d'éliminer les bactéries présentes. La salinité de l'eau de mer filtrée (EMF) est de 34g/l et son pH de 8,06.

L'eau de Lewis est une eau de mer reconstituée souvent utilisée en laboratoire. Sa composition est présentée dans le Tableau 2. Le pH de cette eau est de 6,5 soit légèrement plus acide que celui de l'EMF et de l'eau de forage.



Composition de l'eau de Lewis	
NaCl	23.4 g
KCl	1.5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.2g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.2g
Eau distillée	1000ml

Tableau 2: Composition de l'eau de Lewis

Les milieux de différentes salinités ont été préparés à partir d'eau de forage préalablement filtrée et conservée à 15 °C. Du sel de Guérande et de l'eau douce du robinet ont permis de confectionner les milieux salins aux concentrations de 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 45 g/l. Les parasites ont été conservés à l'étuve aux températures de 15°C et 25°C et au réfrigérateur à 4°C.

### 3.2.3 La cytométrie en flux

#### 3.2.3.1 *Principe*

La cytométrie en flux (CMF) consiste à étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules et de les quantifier : il s'agit dans notre cas de cellules de parasites *Bonamia ostreae* entraînés dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant.

Ces informations peuvent être obtenues soit directement par une autofluorescence des cellules, soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes (marqueurs cellulaires).

Un cytomètre en flux est constitué d'une composante fluidique, d'une composante optique et d'une composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique. Cette interface informatique permet de récupérer les données sous forme de cytogramme ou d'histogramme suite à l'excitation des cellules par le laser (Annexe 4).

Les paramètres mesurés sont la taille (Forward Scatter Height, FSC) et la complexité (Size Scatter Height, SSC). Ces mesures sont aussi bien réalisées sur des cellules marquées ou non marquées. Dans le cas de cellules non marquées, c'est la modification de la direction du rayonnement qui est observée et non la modification de la longueur d'onde. La mesure des rayonnements des rayons diffractés à petit angle (inférieur à 10) permet de déterminer la taille. La mesure de la lumière diffractée ou réfléchi à grand angle (inférieure à 90°) permet quant à elle d'analyser la complexité des cellules.

L'utilisation de fluorochromes (marqueurs cellulaires) permet aux cellules d'absorber une énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, puis de la réémettre à une longueur d'onde différente après excitation.

Le cytomètre EPIC XL 4 (Beckman Coulter) possède quatre lentilles permettant de recueillir quatre plages de longueurs d'ondes différentes : vert de 500-550 nm (détecteur FL1), jaune de 550-600 nm (détecteur FL2), orange et rouge de 560-670 nm (détecteur FL3), et rouge uniquement de 640-700 nm (détecteur FL4).

Les résultats ont été exprimés sous forme de cytogramme indiquant la taille (FSC), la complexité (SSC) ainsi que le canal de fluorescence correspondant à l'activité testée. La taille/complexité, la mortalité cellulaire, les activités de type estérases non spécifiques, ainsi que la

présence de lysosomes ont été testés chez les parasites purifiés en fonction des milieux de conservation et de facteurs environnementaux (salinité, température).

Au sein du laboratoire Ifremer, la Tremblade, le cytomètre EPIX XL 4 (Beckman Coulter) est fréquemment utilisé pour étudier les hémocytes chez les coquillages (Annexe 4).

La CMF se prête particulièrement bien à l'évaluation de la viabilité de cellules (cellules mortes/cellules vivantes).

### 3.2.3.2 Méthode d'analyse des histogrammes

Deux populations, une marquée par fluorescence et une non marquée ont été identifiées sur chaque histogramme par la présence de deux pics distincts (Fig 6).

Dans le cadre du test de la mortalité parasitaire, la population marquée à l'iodure de propidium (IP) correspond à la population morte contrairement aux tests de l'activité estérases et de la présence des lysosomes ou la population marquée au diacétate de fluorescéines (FDA) et à la sonde LysoTracker représente les cellules actives soit les cellules vivantes.

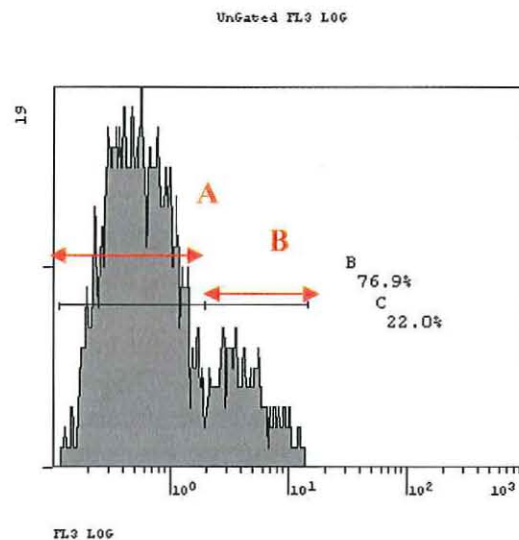


Fig 6: Histogramme de mortalité cellulaire évaluée par la population marquée à l'IP en EMF à 15°C, A= population non marquée, B= population marquée)

Les mesures en pourcentage (%) de population de cellules marquées et non marquées ont été retenues. L'intensité de fluorescence émise se situe en abscisse sur l'histogramme et est exprimée en échelle logarithmique. Le pourcentage de population se lie sur l'histogramme en créant des fenêtres de la largeur du pic. L'analyse statistique des résultats a permis de traiter l'ensemble des données répertoriées obtenues.

### 3.2.3.3 Les paramètres étudiés

Une solution de *Bonamia ostreae* à la concentration de 500 000 cellules par ml a été utilisée pour l'ensemble des tests de mortalité parasitaire, d'activité estérases et de présence des lysosomes.



### 3.2.3.3.1 Taille/complexité

La taille et la complexité des parasites étaient lues d'après le cytogramme représentant le nuage de cellules. Deux populations ont pu être identifiées sur les histogrammes de fluorescence par la présence de deux pics distincts. La taille et la complexité de ses deux populations sont observées sur le cytogramme de la population cellulaire (Fig 7).

Les cellules non viables, moins actives semblent plus petites et plus complexes (en vert sur la figure).

### 3.2.3.3.2 Mortalité cellulaire

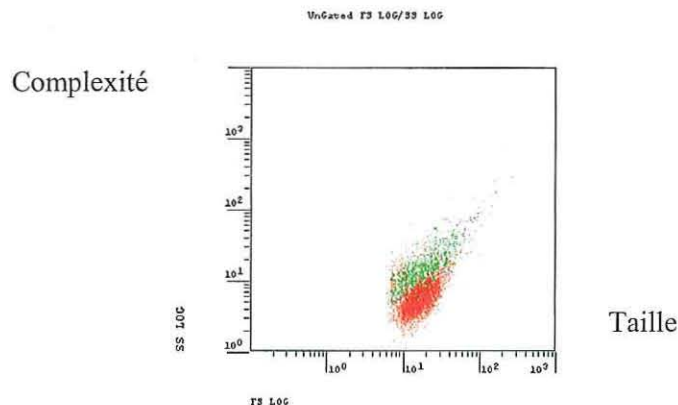


Fig 7: Cytogramme représentant deux populations de cellules parasitaires de taille et complexité différente (Mesure de mortalité cellulaire à l' IP en EMF à 15°C)

La mortalité cellulaire était mesurée suite à l'ajout d'iodure de propidium (IP) qui pénètre dans les cellules dont la membrane est lésée et se fixe sur l'ADN et l'ARN en le colorant en rouge (signal FL3). Les cellules marquées sont celles dont la membrane n'est plus intègre correspondant à des cellules mortes. Un volume de 10 µL d'iodure de propidium (IP) a été ajouté à 200µL de suspension cellulaire. Une incubation de 30 minutes dans la glace à l'obscurité a été réalisée avant l'analyse (Gagnaire *et al.* 2006).

### 3.2.3.3.3 Activité de type estérase

L'activité de type estérase était mesurée après l'ajout d'un substrat liposoluble non spécifique, le diacétate de fluorescéines (FDA). Le FDA non fluorescent diffuse dans la plupart des cellules du fait qu'il soit liposoluble, puis est hydrolysé par des estérases non spécifiques en produits fluorescents (signal vert : FL1). Un volume de 1 µL de FDA à une concentration de 400 µM (dans du DMSO diméthylsulfoxyde) a été ajouté à 200 µL de suspension cellulaire. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante à l'obscurité, la réaction était arrêtée par une mise sur glace pendant 5 minutes à l'obscurité (Gagnaire *et al.* 2006).

Les marqueurs d'activités estérasiques complètent ainsi les données obtenues avec l'iodure de propidium en donnant une information sur la fonctionnalité des cellules et l'intégrité des membranes.

#### 3.2.3.3.4 Présence de lysosomes

La présence des lysosomes nous renseigne sur le nombre de cellules contenant des lysosomes mais en aucun cas on ne peut dénombrer ces lysosomes et connaître leur état de fonctionnement. Cependant cela nous permet de savoir si la cellule parasitaire est désagrégée lorsqu'elle ne contient pas de lysosomes ou encore de savoir si la cellule est viable dans le cas où il y a présence de lysosomes. La présence de lysosomes était mesurée à l'aide du kit LysoTracker®.

Le principe de cette sonde est basé sur la nature des lysosomes. Cette sonde marque en effet les membranes des organites acides des cellules vivantes. Elle contient un fluorophore lié à une base faible qui est partiellement protonée à pH neutre (signal vert : FL1). Un volume de 1 µL de la solution LysoTracker à une concentration de 500 µM dans du DMSO était ajouté à 200 µL de suspension cellulaire. L'incubation était réalisée à l'obscurité à température ambiante pendant 2 heures, puis la réaction était arrêtée par un traitement de cinq minutes sur glace à l'obscurité.

Un protocole de mesures spécifiques à l'analyse cytométrique du parasite *Bonamia ostreae* a été mis en place par Morga (2006). Un flux de comptage rapide a été utilisé pour dénombrer les cellules marquées et pendant un temps maximum de 300 secondes. Le nombre d'évènements analysés a été fixé à 5000, les taux de fluorescence verte et rouge ont été définis à 700 et le discriminant a été fixé à 5 pour éliminer le dénombrement des bactéries.

#### 3.2.3.4 *Analyses statistiques*

Pour chaque test, les pourcentages de population de cellules vivantes et mortes ont été retenus. La moyenne des duplicats et des triplicats pour l'ensemble des tests a été effectuée, l'écart type et l'erreur standard ont été calculés.

Ensuite des tests statistiques ont été effectués et les tableaux d'ANOVA analysés.

Pour l'ensemble des tests de mortalité parasitaire, d'activité estérases et de la présence des lysosomes aucun effet d'interaction entre les facteurs n'a été observé.

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du logiciel Statgraphics ® Plus Version 5.1. après correction des mesures :

- Les pourcentages de population et les valeurs d'intensité aberrantes sur des mesures en triplicata ont été éliminés.
- Les pourcentages obtenus pour les différents paramètres étudiés (mortalité parasitaire, activité estérases et la présence de lysosomes) ont été transformés par la formule  $\arcsin(\sqrt{x})$  pour stabiliser les variances. Les valeurs ainsi obtenues suivent la loi normale.

Les conditions étaient alors requises pour mettre en œuvre une ANOVA à plusieurs facteurs :

- Le plan d'expérience a été réalisé sur une population normale.
- Les populations étaient de même variance
- Les erreurs expérimentales étaient indépendantes.

Dans le cas du rejet d'hypothèse, un test des étendues multiples : test LSD (Least Significance Difference) a été appliqué pour comparer la différence entre les moyennes et obtenir une hiérarchie entre les facteurs étudiés.



## 4 Résultats

### 4.1 Purification du parasite

Les résultats des 7 purifications sont présentés en annexe 5.

Les purifications permettent d'obtenir une quantité de parasites très variable (de 1 million à 160 millions de cellules parasitaires) (Fig 8). Parfois les huîtres purifiées étaient laiteuses, de ce fait l'extraction de parasite a été plus difficile.

Des mesures de mortalité et d'activité estérases ont été réalisées immédiatement après purification dans l'eau de mer filtrée. La survie (déduite de la mortalité) varie de 55 % à 78 % avec une moyenne de 70 % de cellules parasitaires vivantes. L'activité des estérases varie de 73 % à 76 % avec une moyenne de 74 %.

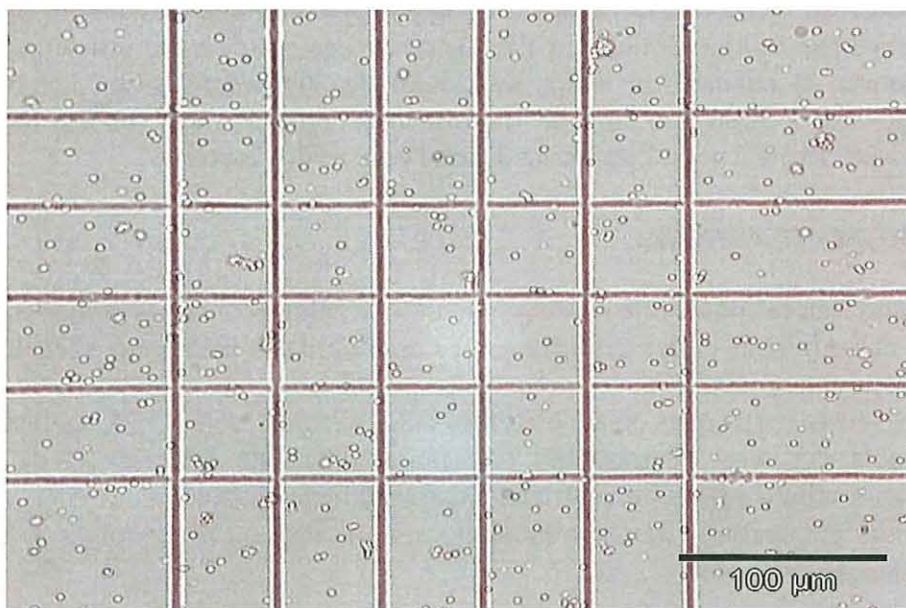


Fig 8 : *Bonamia ostreae* purifiés, observés en microscopie photonique ( $\times 100$ ), (130 millions de parasites/ml ; photo ifremer)

### 4.2 Analyse des résultats sur les facteurs températures, milieux et temps

Les données brutes des tests (températures-temps-milieus) sont présentées en annexe 6.

Les moyennes des données obtenues au cours des trois dernières purifications présentent peu de variabilité. L'analyse des résultats est donc fiable et a pu être complétée par une étude statistique. Pour chaque test, il en ressort un effet significatif du milieu de conservation ( $p > 0.5\%$ ) contrairement aux facteurs température et temps qui semblent présenter peu d'effet sur la survie.

D'après la figure 9 qui représente la survie du parasite en fonction du milieu et de la température au cours du temps, on constate que quels que soient le temps et la température, le parasite survit mieux dans l'eau de mer filtrée et dans l'eau de forage qu'au sein de l'eau de Lewis.

A 12 h et à 4 °C, 79% et 70% de la population est non marquée à l'iodure de propidium, donc vivante au sein des milieux eau de mer filtrée et eau de Forage alors qu'elle est de 23% dans l'eau de Lewis (Fig 10). De plus, on constate que dès 24 h le parasite survit moins bien à 25°C. A 25°C et en eau de forage, 89%, 20% et 22% de la population apparaît non marquée à 12 h, 24 h et 48h respectivement.

D'après le test des étendues multiples pour le facteur milieu, on constate une différence significative entre l'eau de Lewis et les deux autres milieux que sont l'eau de mer filtrée et l'eau de forage. Il y a plus de mortalité en eau de Lewis que dans les autres milieux (Fig. 11). Cependant, on ne peut pas différencier significativement le meilleur milieu de conservation entre l'eau de forage et l'eau de mer filtrée. 4°C semble être la température idéale de conservation du parasite dans l'eau de mer filtrée et celle de 15 °C semble être meilleure pour la survie du parasite dans l'eau de forage.

Lorsque l'on fixe chaque milieu de conservation, le facteur température n'a pas d'effet significatif sur la mortalité du parasite. Cependant, une tendance générale montre qu'il y a une différence significative entre 25°C et 4°C pour l'EMF (Fig 12) ainsi qu'entre 25°C et 15°C pour l'eau de forage (Fig 13).

Le temps ne présente aucune différence significative sur la mortalité parasitaire quels que soient le milieu et la température. Au temps 1 semaine, les résultats sont peu nombreux et trop hétérogènes pour effectuer une analyse statistique. Cependant, la survie du parasite au delà d'1 semaine de conservation a été identifiée. Les résultats obtenus à 1 semaine au sein de l'eau de mer filtrée à 15°C montrent une survie importante du parasite, 57 % de population de cellules est non marquée (vivante). Au sein de l'eau de forage, à 1 semaine et à 15°C, la population non marquée (vivante) est de 19 %.

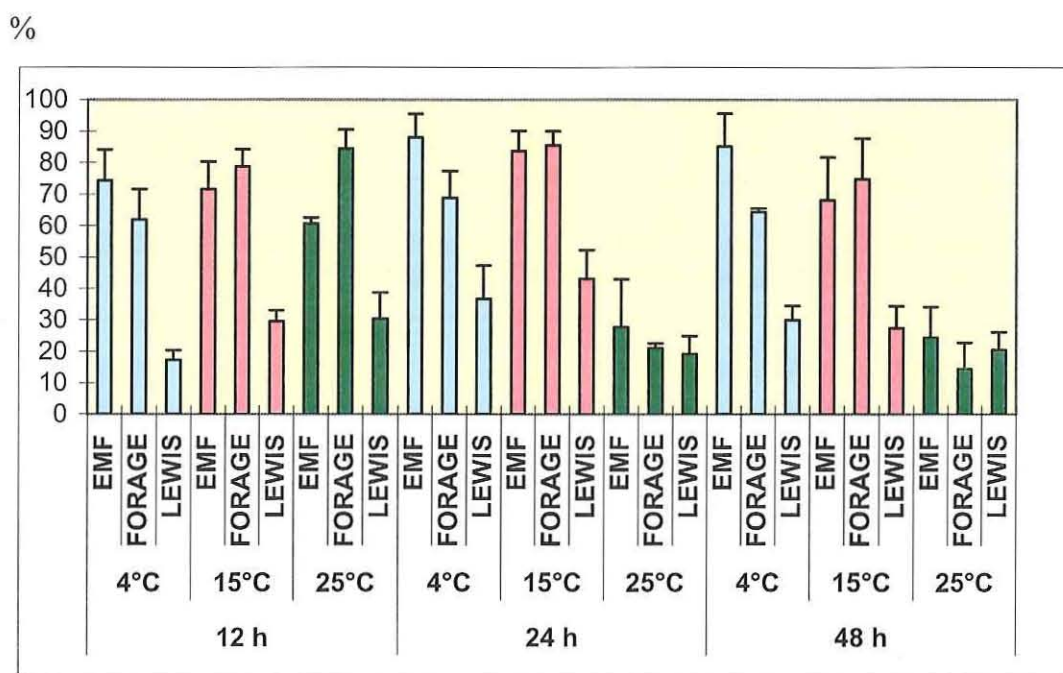


Fig 9 : Survie du parasite, en fonction du milieu et de la température au cours du temps (Mesure déduite du marquage à l'IP, barre= erreur standard)

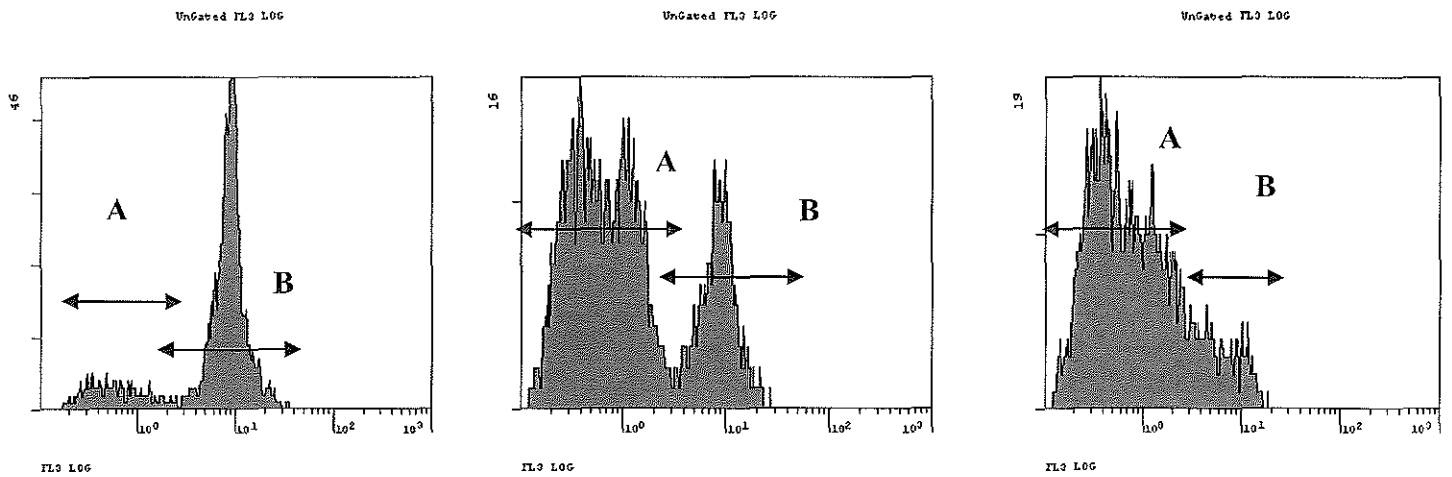


Fig 10 : Histogramme de mortalité parasitaire pour chaque milieu à 4°C et à 12 h (eau de Lewis à gauche, eau de forage au centre et EMF à droite ; A=population non marquée, B= population marquée)

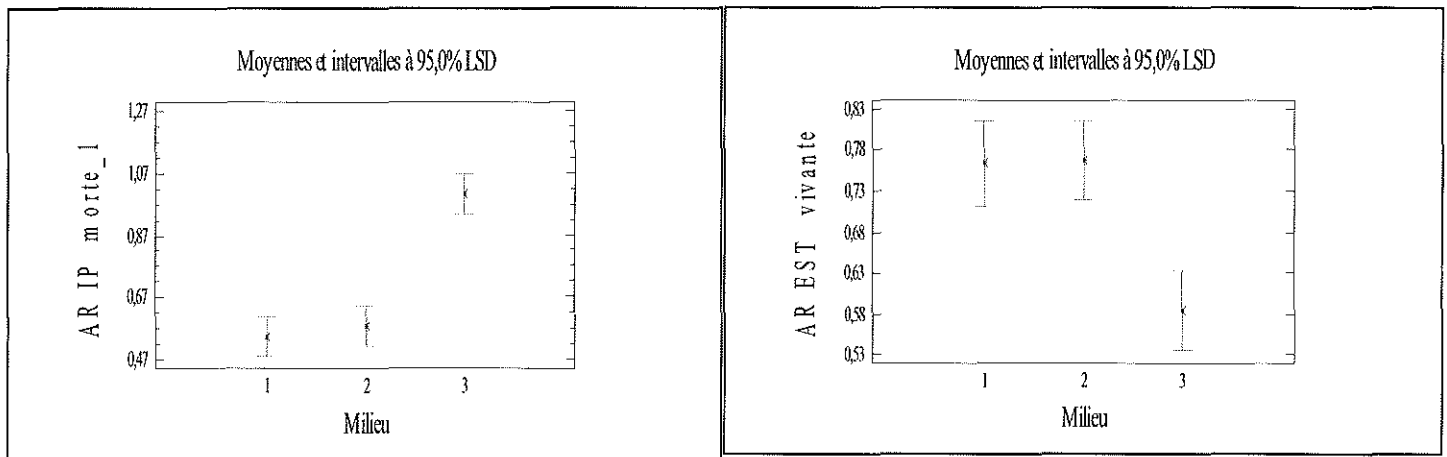


Fig 11 : Mortalité des cellules parasitaires et activité estérases non spécifique en fonction du milieu de conservation (1=EMF, 2=Forage, 3=Lewis)

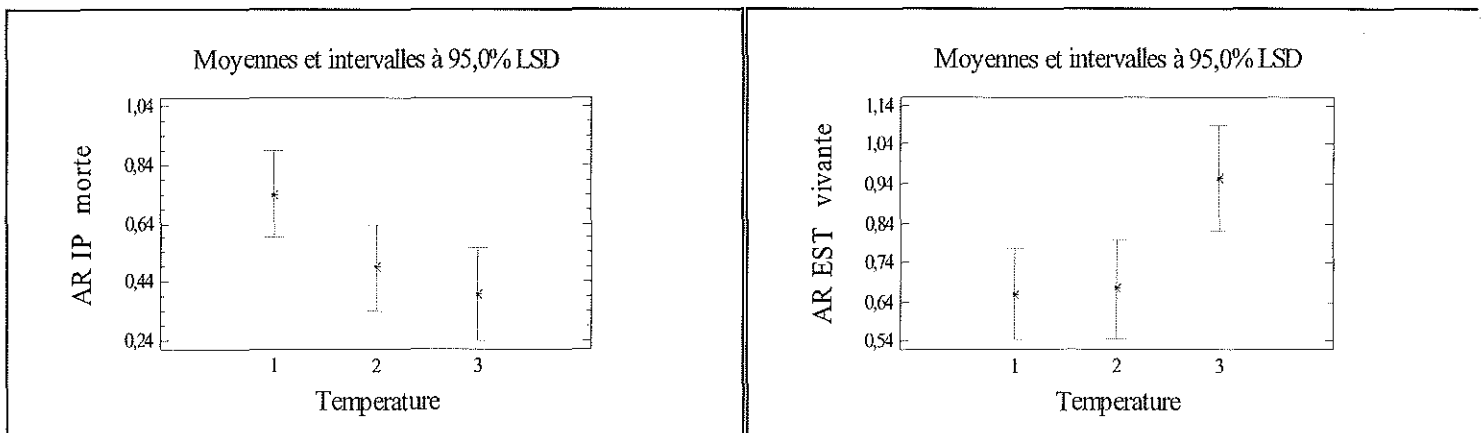


Fig 12 : Mortalité parasitaire et activité estérases non spécifique en fonction de la température dans le milieu EMF (1=25°C, 2=15°C, 3=4°C)

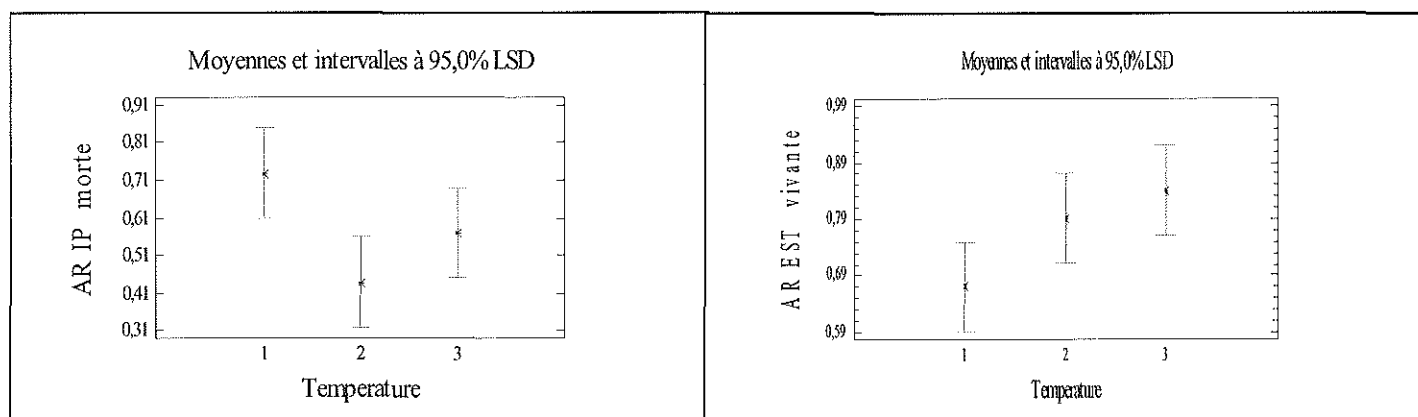


Fig 13 : Mortalité parasitaire et activité estérase non spécifique en fonction de la température dans le milieu eau de forage (1=25°C, 2=15°C, 3=4°C)

La mesure d'activité estérase non spécifique confirme certains résultats obtenus concernant la mortalité parasitaire (Fig 14).

En effet, les meilleurs milieux pour l'activité estérase sont l'eau de mer filtrée et l'eau de forage. L'eau de Lewis présente un pourcentage de cellules positives pour les estérase significativement plus faible. A 12h et 4 °C, 85%, 69% et 13% des parasites sont marqués en eau de mer filtrée, eau de forage et eau de Lewis respectivement (Fig 11).

De plus, le pourcentage de cellules positives pour les estérase diminue à 25°C à 48 h, quel que soit le milieu. En EMF à 25°C, 47% et 18% de la population est marquée à 12h et à 48h respectivement.

On retrouve également une baisse d'activité marquée à partir de 24 h et à 15°C en eau de forage. L'activité estérase va dans le même sens que les résultats obtenus avec la mortalité cellulaire pour l'EMF (Fig 12). Cependant, avec l'eau de forage, on constate une différence significative entre 25°C et 4°C alors qu'entre 25°C et 15°C ainsi qu'entre 15°C et 4°C, il n'y a pas de différences significatives (Fig 13).

A 1 semaine et 15°C, seulement 8% de la population présente une activité estérase en EMF contre 58% en eau de forage. Ces résultats semblent donc se contredire avec ceux obtenus par le marquage à l'IP mais confirment cependant la survie du parasite une semaine post purification.



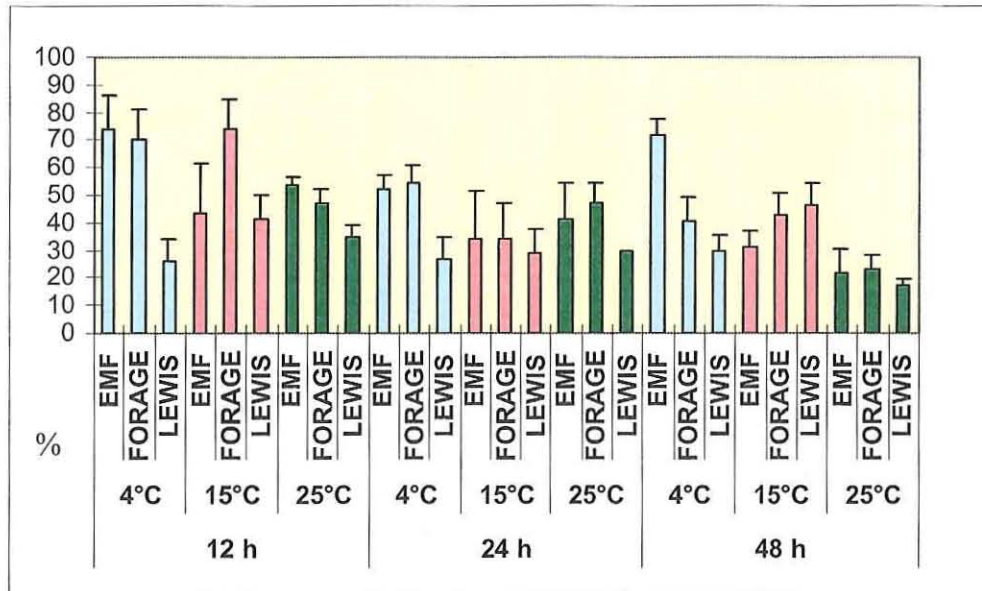


Fig 14 : Activité estérases en fonction du milieu et de la température au cours du temps (mesure de la population marquée au FDA, barre= erreur standard)

D'après la figure 15, on constate que la présence des lysosomes varie très peu en générale. En effet, elle est constante à 4°C quel que soit le milieu. A 15°C et 25°C, le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes diminue au sein de l'eau de Lewis.

Les résultats obtenus à 1 semaine en eau de mer filtrée et à 15°C montrent une présence de lysosomes encore importante, 92 % de la population de cellules est marquée contre 37% en eau de forage

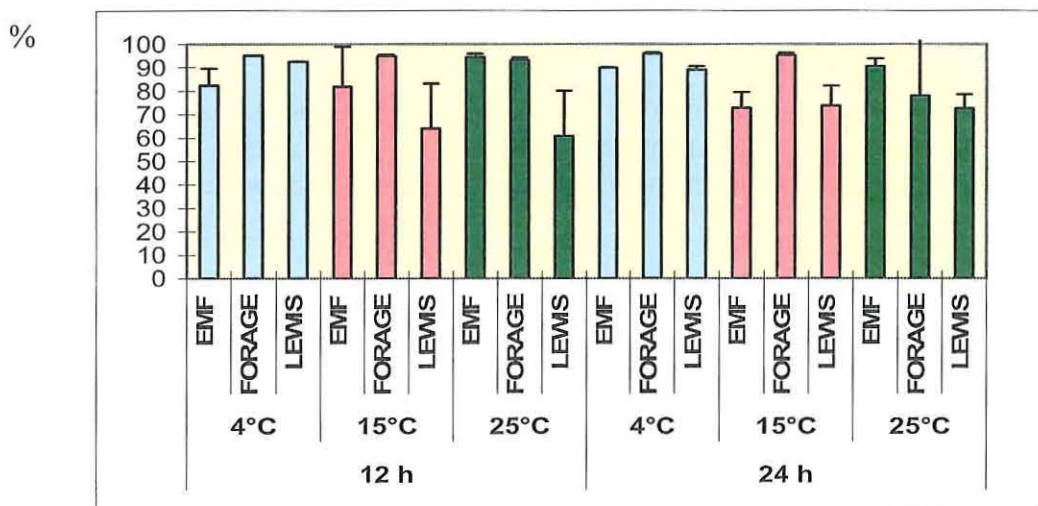


Fig 15 : Présence des lysosomes en fonction du milieu et de la température au cours du temps (barre=erreur standard)

### 4.3 Analyse des résultats sur les facteurs salinité et temps au sein du milieu eau de forage à 15°C

Les données brutes des tests (salinité- temps) de cytométrie en flux sont présentées en annexe 7.

Le milieu eau de forage à 15°C a été choisi pour préparer les solutions de différentes salinités. En effet, ce milieu est stable dans le temps et présente une conservation du parasite satisfaisante. D'après la figure 16 qui représente la mortalité parasitaire en fonction de la salinité au cours du temps, on constate que le parasite présente une meilleure survie pour une salinité supérieure ou égale à 25g/l. Cependant la distinction entre 25, 30, 35, 40, 45g/l et les différents temps est difficilement observable (Fig 17).

L'activité estérases confirme la tendance observée avec la mortalité, le pourcentage de cellules positives pour les estérases semble plus important à partir de 25g/l (Fig 18). Là encore la distinction entre 25, 30, 35, 40, 45g/l ainsi que les différents temps est difficilement observable. D'après le test des étendues multiples, les salinités de 5, 15 et 20g/l présentent le plus fort pourcentage de mortalité et une plus faible activité estérases. Les salinités de 35, 40 et 45g/l semblent les meilleures pour la survie du parasite (Fig 19). Au sein des salinités de 20 et 25g/l le parasite présente un comportement de survie intermédiaire.

De plus, la variabilité de certains résultats est assez importante. Parfois une seule valeur (en rose sur les figures 16 et 18) a été obtenue, l'erreur standard n'a donc pas pu être calculée.

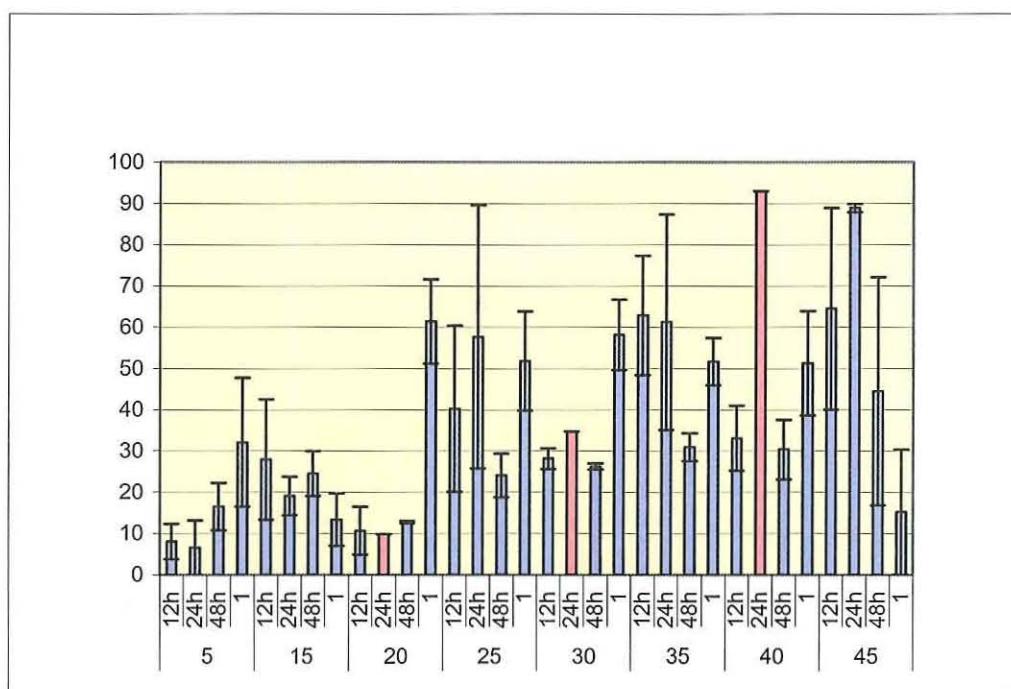


Fig 16 : Survie parasitaire en fonction de la salinité au cours du temps  
(Mesure déduite du marquage à l'IP, barre=erreur standard)

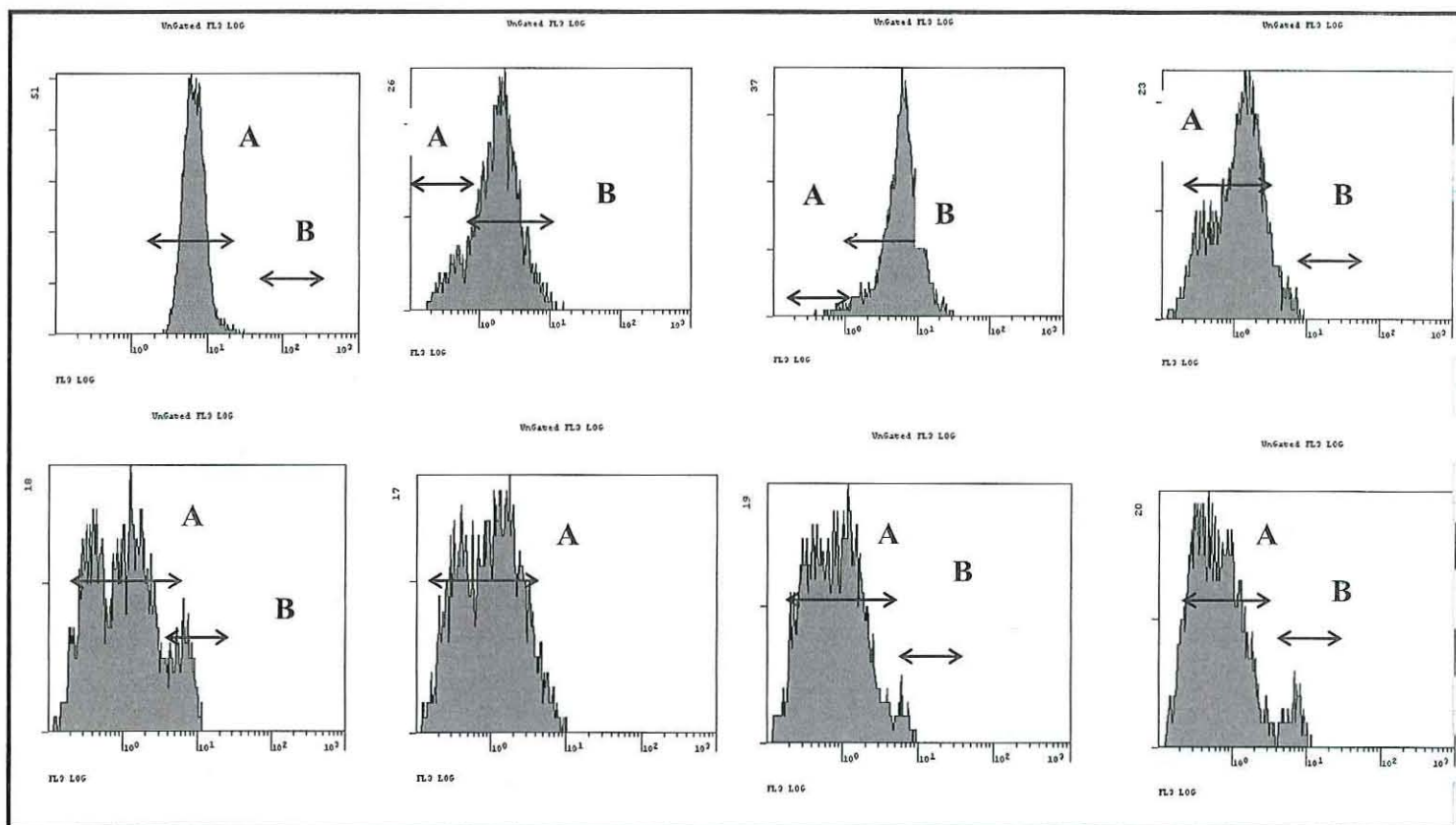


Fig 17 : Histogrammes de mortalité parasitaire en fonction de la salinité (respectivement 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 g/l en partant en haut à gauche ; A= population non marquée, B= population marquée)

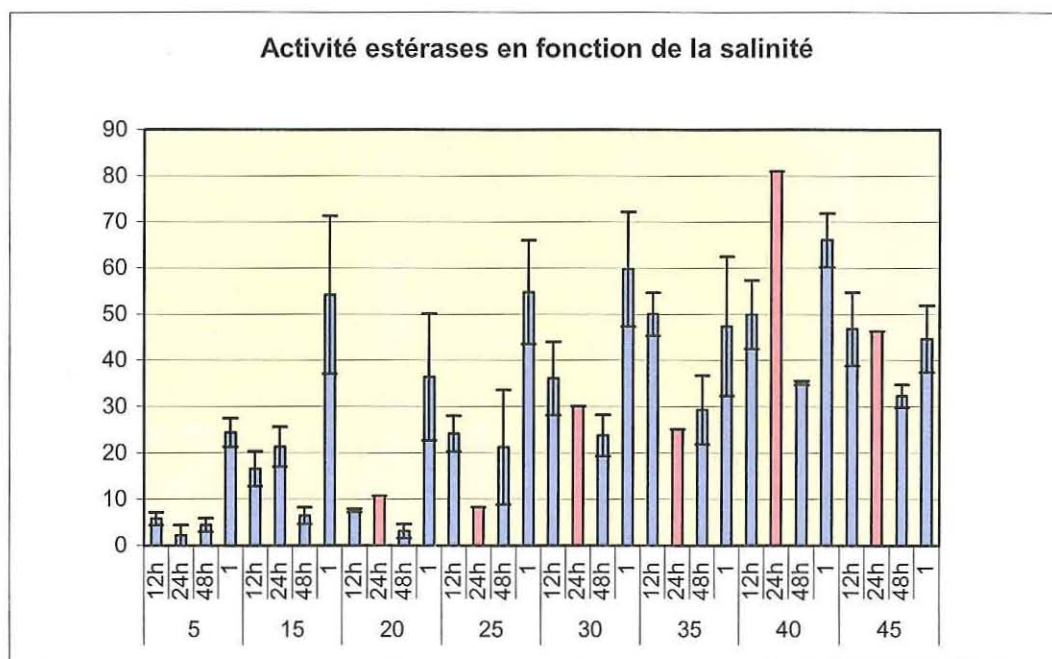


Fig 18 : Activité estérases en fonction de la salinité au cours du temps (Mesure de la population marquée au FDA, barre=erreur standard)

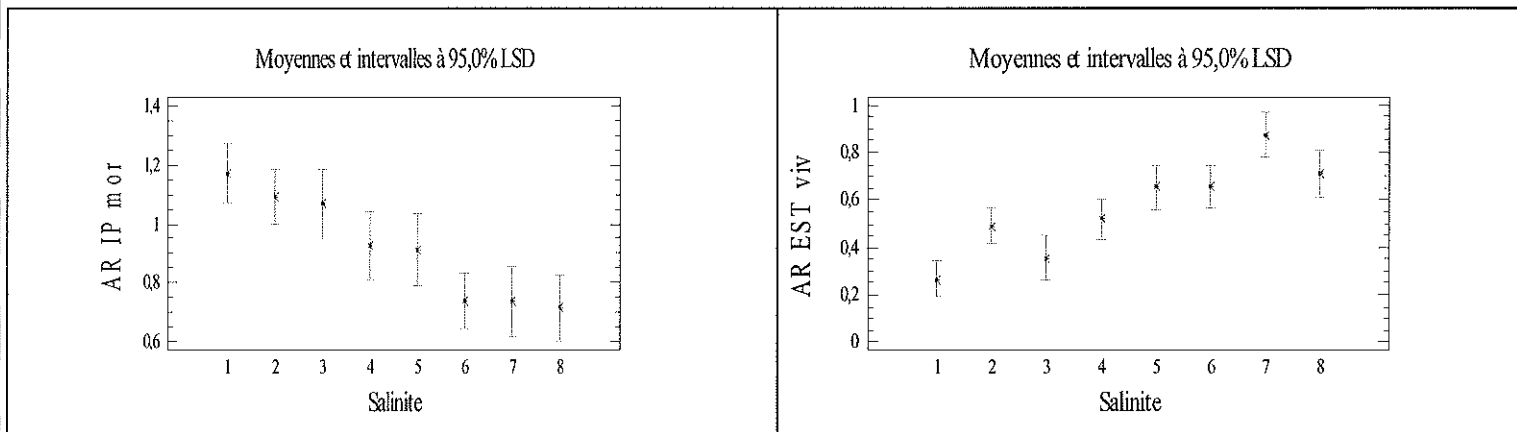


Fig 19: Mortalité parasitaire et activité estérases en fonction des différentes salinités (1=5g/l, 2=15g/l, 3=20g/l, 4= 25g/l, 5= 30g/l, 6= 35g/l, 7= 40g/l, 8= 45 g/l)

La salinité n'est pas un facteur d'influence sur la présence des lysosomes. En effet, il n'y pas de différences significatives entre chaque salinité sur le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes au sein des cellules parasitaires.

Cependant la tendance montre que le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes est supérieur pour les salinités de 30 et 35 g/l, soit celles retrouvées dans l'eau de mer (Fig 20).

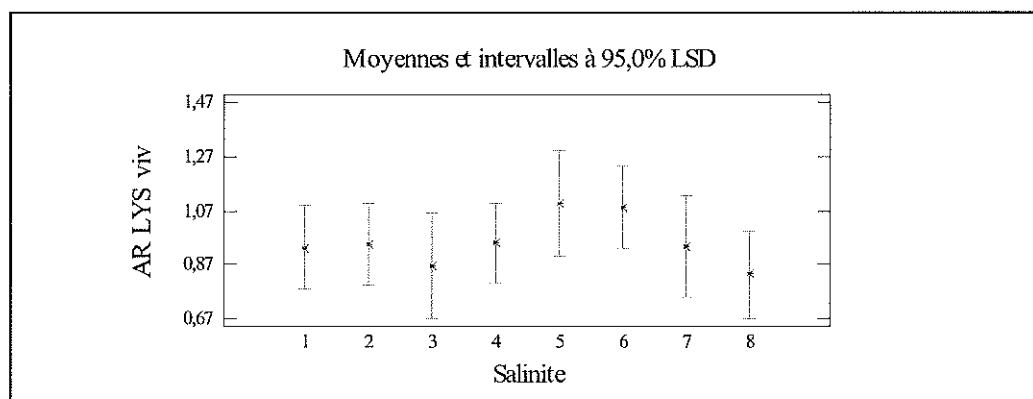


Fig 20 :Présence des lysosomes en fonction des différentes salinités (1=5g/l, 2=15g/l, 3=20g/l, 4= 25g/l, 5= 30g/l, 6= 35g/l, 7= 40g/l, 8= 45 g/l)

Le facteur temps n'a pas d'influence sur la mortalité du parasite. Les résultats sont très aléatoires et sont donc non interprétables. A 1 semaine, les mesures de survie du parasite et de l'activité estérases sont souvent plus importantes qu'à 12h, 24h et 48h.



## 5 Discussion

Sept purifications de parasite *Bonamia ostreae* ont été réalisées. La concentration de parasites utilisée pour les analyses en cytométrie en flux était de 500 000 cellules par ml. En moyenne, 70% de parasite était en vie immédiatement après purification. Les résultats obtenus par cytométrie en flux montrent une tendance nette de l'influence des facteurs milieu et salinité sur la conservation du parasite *Bonamia ostreae*. Cependant, des nuances peuvent être perçues lorsque sont pris en compte les facteurs temps et température.

Le parasite présente une meilleure survie en eau de mer filtrée (EMF) et eau de forage (en moyenne 60 à 80% de cellules sont vivantes) en comparaison avec l'eau de Lewis (moins de 40% de cellules vivantes), quels que soient le temps et la température. Il faut noter que le pH de 6,5 de l'eau de Lewis est plus acide que les pH de 8,06 et 7,06 de l'EMF et l'eau de forage respectivement. Le pH peut expliquer la mauvaise conservation du parasite au sein de l'eau de Lewis. De plus, l'eau de forage semble plus favorable à la conservation et l'activité de lysosomes que les deux autres milieux. Cette eau enrichie en fer, manganèse et azote ammoniacal peut favoriser le métabolisme des lysosomes. Cependant, le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes est élevé et varie peu quels que soient le milieu, la température et le temps. On peut émettre l'hypothèse que la membrane des lysosomes est résistante. Même lorsque la cellule parasitaire est désintégrée, si le lysosome est encore en fonctionnement, le fluorochrome peut pénétrer au sein de la membrane des lysosomes et émettre de la fluorescence. Une observation en microscopie à épi fluorescence des lysosomes permettrait de compléter ces résultats et notamment de déterminer l'état de la cellule et de ces organites intracellulaires en condition défavorable telle que l'eau de Lewis.

Concernant la température, 25 °C semble être moins propice à la conservation du parasite quels que soient le milieu et le temps. Les différences de survie du parasite entre 4 et 15 °C ne sont pas significatives. Dans le milieu naturel, l'eau de mer atteint rarement 25°C excepté en mer méditerranée l'été. Dans une zone endémique telle que la baie de Quiberon, la température estivale (août) présente une moyenne de 18,5°C variant de 16,9 à 19,6°C entre 1989 et 2003 (données REPHY). Si on fait l'hypothèse que l'été correspond à la principale période de relarguage du parasite (les mortalités d'huîtres adultes survenant majoritairement au début de l'été) alors on peut supposer qu'une température estivale plus faible soit suivie de prévalence plus importante l'hiver.

Par ailleurs, il semble que la température agisse également sur la physiologie de l'huître et plus particulièrement sur ses capacités à se défendre. En effet, des travaux réalisés par Cochenec-Laureau *et al.* (en préparation) suggèrent que l'infection se développe d'avantage et plus rapidement à 10°C qu'à 20°C. La bonamiose semble avoir un cycle saisonnier légèrement différent selon le lieu de production (Espagne, Irlande ou Hollande) (Culloty *et al.* 1996, Montes *et al.* 1987, Figueras 1991) en fonction des conditions du milieu et notamment de la température.

En effet, en Espagne, le taux de parasitisme par *Bonamia ostreae* était maximal en août et en septembre. En Irlande, les prévalences les plus importantes ont été relevées au printemps et en hiver. En Hollande, deux pics de prévalence ont été observés au printemps et en à l'automne.

Néanmoins, le parasite survit aux températures de 4, 15 et 25°C. On peut réaffirmer que la bonamiose semble détectable toute l'année et que le cycle d'infection et de mortalité est continue d'une année sur l'autre (Culloty *et al.* 1996).

Concernant le facteur salinité, le parasite semble préférer une hyper-salinité de 35, 40 et 45g/l. Il y a en moyenne 50% de parasites vivant à 12 h. Ces résultats rejoignent les expériences réalisées *in vivo* avec des huîtres Néo-Zélandaises *Ostrea chilensis* parasitées par un parasite proche de *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa* (Hine *et al.* 2002). En effet, une hypersalinité de 40 g/l était associée aux trois plus fortes infections. De plus, les travaux (Hine *et al.* 2002) ont montré qu'une hypo-salinité de 15g/l entraînait 100% de mortalité des huîtres *Ostrea chilensis* et ceci indépendamment de l'infection par *Bonamia exitiosa*. Le parasite *Bonamia ostreae* survit moins bien au sein des milieux hypo-salins de 5, 15 et 20g/l. Cependant, il ne subit pas 100 % de mortalité. Il y a en moyenne 10% de population vivante au sein des salinité 5, 15 et 20g/l. Les salinités comprises entre 25 et 30g/l présentent une survie du parasite intermédiaire. En moyenne le parasite présente 35% de survie au sein des salinités 25 et 30g/l à 12h. Lors des tests réalisés sur les milieux, l'eau de mer filtrée de salinité comprise entre 30 à 34 g/l et l'eau de forage (32g/l) étaient d'une salinité supérieure à l'eau de Lewis (23,4g/l). La mauvaise conservation du parasite en eau de Lewis peut également s'expliquer par cette faible salinité.

L'influence du facteur temps sur la viabilité du parasite n'a pas été clairement démontrée. Cependant le parasite survit après une semaine de conservation. L'eau de mer filtrée semble assurer une meilleure conservation du parasite que l'eau de forage à long terme. Cependant, à une semaine, le pourcentage de cellules positives pour les estérases est supérieur en eau de forage que dans l'eau de mer filtrée. Cette différence peut s'expliquer par une efficacité différentielle des deux types de marqueurs utilisés. Par ailleurs, les mesures de mortalité et de l'activité estérases sont instantanées et non pas cumulées. Les cellules mortes et trop dégradées risquent en effet de ne pas être marquées au iodure de propidium ou au FDA. A chaque temps, la concentration de parasite a pu changer du fait de la mortalité. Un comptage des parasites au cytomètre avec des billes de marquage au sein de la suspension afin de déterminer la concentration parasitaire à chaque temps aurait pu être réalisé pour chaque mesure.

Le meilleur milieu de conservation à long terme reste encore à identifier. Les milieux Glycérol et DMSO (diméthylsulfoxyde) dilué avec de l'eau de mer (55,7% d'EMF pour 44,3% de DMSO ou Glycérol) ont été testés au début du stage et abandonnés car ces derniers se sont révélés toxiques à température ambiante pour la conservation du parasite. De plus, le DMSO seul (sans marquage) semble présenter une auto-fluorescence. Le DMSO et le Glycérol sont utilisables à très basses températures, ces milieux pourraient servir à conserver le parasite au congélateur en établissant un protocole de conservation (refroidissement rapide des cellules de *Bonamia ostreae* et centrifugation).

Des difficultés techniques ont été rencontrées durant le stage. En effet, la quantité de parasite obtenue à l'issue des purifications n'était pas toujours suffisante pour effectuer l'ensemble des tests de cytométrie en flux prévus. Ce protocole lourd et fastidieux a dû être répété plusieurs fois au cours d'une même semaine lorsque le résultat de la première purification était insuffisant. Parfois les résultats donnés par le cytomètre en flux n'étaient pas interprétables. Ceci était dû à une défaillance de la machine ou un mauvais nettoyage de celle ci avant de passer les tubes. Les temps d'incubation des différents réactifs utilisés ont parfois été trop longs. En outre, l'absence d'homogénéité dans certaines données répliquées a impliqué l'élimination de nombreux tests. Ainsi, les données à une semaine n'ont pas été obtenues en quantité suffisante pour pouvoir les analyser statistiquement. Enfin, les valeurs d'intensité de fluorescence n'ont pas été exploitées car elles présentaient peu d'intérêt pour déterminer les meilleures conditions de survie du parasite *Bonamia ostreae*.

## 6 Conclusion

Le travail réalisé au cours de ce stage a été entrepris dans le but de déterminer les meilleures conditions de conservation du parasite *Bonamia ostreae* purifié. Les résultats obtenus devraient permettre d'améliorer la gestion des infections expérimentales par injection de parasites purifiés et de progresser dans la compréhension du cycle de développement de *Bonamia ostreae*.

Au sein du laboratoire, la cytométrie en flux est surtout utilisée pour étudier les hémocytes de bivalves. L'étude d'agent pathogènes tel que *Bonamia ostreae* par cytométrie en flux est un travail nouveau et les résultats obtenus sont encourageants et démontrent l'intérêt de la technique pour l'étude du parasite.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'influence des facteurs environnementaux sur la survie du parasite *Bonamia ostreae* et donc indirectement sur le taux d'infection des huîtres plates. Les facteurs salinité et température influencent la conservation du parasite. Ce dernier préfère de fortes salinités 35, 40, 45g/l, des températures faibles 4 et 15 °C ainsi que l'eau de mer filtrée ou l'eau de forage qui est de l'eau de mer enrichie. De plus, le parasite survit au delà d'une semaine de conservation.

D'un point de vue pratique, les résultats obtenus démontrent donc qu'il est préférable de maintenir le parasite purifié en eau de mer filtrée ou eau de forage à 4°C ou 15°C et à une salinité ajustée à 35 g/l.

Cependant, des travaux complémentaires utilisant des milieux tels que le glycérol ou le DMSO permettraient peut être d'envisager la cryoconservation du parasite purifié et ainsi s'affranchir de l'approvisionnement en huîtres vivantes infectées.

Par ailleurs, les résultats obtenus présentent un intérêt pour la profession en terme de gestion des stocks. Effectivement, en réalisant un suivi des paramètres environnementaux tels que la température et la salinité, les huîtres pourraient être déplacées lorsque les conditions les plus propices à la survie du parasite sont atteintes. Dans ce contexte, le cycle de *Bonamia ostreae* doit être élucidé afin de déterminer la période et la forme relargué du parasite dans l'eau de mer.

## 7 Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1</b> : Evolution de la production française d'huîtres plates.....	p4
<b>Figure 2</b> : Commercialisation de l'huître plate en France et par région.....	p5
<b>Figure 3</b> : Les flux d'huîtres plates dus à l'élevage en Bretagne.....	p6
<b>Figure 4</b> : Photographie microscopique de <i>Bonamia ostreae</i> intrahémocytaire (x 100), Apposition cardiaque, coloration Hémacolor®.....	p7
<b>Figure 5</b> : <i>Bonamia ostreae</i> intrahémocytaire observé en microscopie électronique à transmission.....	p8
<b>Figure 6</b> : Histogramme de mortalité cellulaire évaluée par la population marquée à l'IP en EMF à 15°C.....	p15
<b>Figure 7</b> : Cytogramme représentant deux populations de cellules parasitaires de taille et complexité différente.....	p16
<b>Figure 8</b> : <i>Bonamia ostreae</i> purifiés, observés en microscopie photonique (× 100), (130 millions de parasites/ml).....	p18
<b>Figure 9</b> : Survie du parasite, en fonction du milieu et de la température au cours du temps.....	p19
<b>Figure 10</b> : Histogramme de mortalité parasitaire pour chaque milieu à 4°C et à 12h.....	p20
<b>Figure 11</b> : Mortalité des cellules parasitaires et activité estérases non spécifique en fonction du milieu de conservation.....	p20
<b>Figure 12</b> : Mortalité parasitaire et activité estérases non spécifique en fonction de la température dans le milieu EMF.....	p20
<b>Figure 13</b> : Mortalité parasitaire et activité estérases non spécifique en fonction de la température dans le milieu eau de forage.....	p21
<b>Figure 14</b> : Activité estérases non spécifique en fonction du milieu et de la température au cours du temps .....	p22
<b>Figure 15</b> : Présence des lysosomes en fonction du milieu et de la température au cours du temps.....	p22
<b>Figure 16</b> : Survie parasitaire en fonction de la salinité au cours du temps.....	p23
<b>Figure 17</b> : Histogrammes de mortalité parasitaire en fonction de la salinité.....	p24
<b>Figure 18</b> : Activité estérases non spécifique en fonction de la salinité au cours du temps..	p24
<b>Figure 19</b> : Mortalité parasitaire et activité estérases non spécifique en fonction des différentes salinités.....	p25
<b>Figure 20</b> : Présence des lysosomes en fonction des différentes salinités.....	p25
<b>Tableau 1</b> : Composition de l'eau de forage brute (Analyse 2001).....	p13
<b>Tableau 2</b> : Composition de l'eau de Lewis utilisée.....	p14



## ***8 Liste des abréviations***

<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>DMSO</b>	DiméthylSulfOxyde
<b>EMF</b>	Eau de Mer filtrée
<b>EMFT</b>	Eau de Mer Filtrée Tween
<b>EST</b>	Estérase
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organisation
<b>FDA</b>	Fluoresceine DiAcetate
<b>FSC</b>	Forward Scatter Height
<b>FL1</b>	Fluorescence Lens 1
<b>FL2</b>	Fluorescence Lens 2
<b>FL3</b>	Fluorescence Lens 3
<b>FL4</b>	Fluorescence Lens 4
<b>IP</b>	Iodure de Propidium
<b>LERPC</b>	Laboratoire Environnement Ressources Poitou-Charentes
<b>LGP</b>	Laboratoire Génétique et Pathologie
<b>LYS</b>	Lysosomes
<b>OIE</b>	Office Internationale des Epizooties
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>SSC</b>	Size Scatter Height

## 9 Bibliographie

Bachere E., Durand J. L. and G. Tige (1982). (*Bonamia ostreae* (Pichot et coll., 1979), the parasite of the flat oyster: Comparison of two methods of diagnosis.), International Council for the Exploitation of the Sea C.M. 1982/F: 28: 10pages

Balouet G., Poder M., and A. Cahour (1983). Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the french flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture 34, 1-14.

Besnard-Cocheneq, N. (2001). *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*: Sa position taxonomique parmi les parasites du groupe microcell, analyse des interactions hôte:parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse biologie cellulaire, Université de La Rochelle: 190 pages.

Blanchet M. (2005). La bonamiose de l'huître plate *Ostrea edulis*: Bilan des connaissances actuelles, analyse des données collectées en France de 1989 à 2004, mesures de lutte et perspectives. Thèse de docteur vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse: 143 pages.

Bodoy A., Bougrier S., Geairon P., Garnier J., Boulo V., and S. Heurtebise (1991). Does the prevalence of *Bonamia* and *Marteilia* diseases be reduced (sic) on flat oysters (*Ostrea edulis*) of Atlantic and Mediterranean origin, when they are reared together with the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in tidal ponds? International Council for the Exploitation of the Sea C.M. 1991/K: 28: 9pages

Bougrier S, Tige G., Bachere E. and Grizel H. (1986). *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture 58(1-2):151-154.

Caceres-Martinez J., Robledo J. A. F, and A. Figueras (1995). Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). Aquaculture 130(2): 15-23.

Carnegie R.B., Barber B.J., Culloty S.C., Figueras A.J. and D.L. Distel (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Diseases of Aquatic Organism: 42, 199-206.

Cheng T.C. (1987). Some cellular mechanisms governing self and nonself recognition and pathogenicity in vertebrates and invertebrates relative to protistan parasites. Aquaculture 67: 1-2.

Cochenneq N. and Auffret M. (en préparation). Experimental effects of temperature on the Bonamiosis model. 10 pages

Cochenneq N., Le Roux F., Berthe F. and A. Gerard (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. Journal of Invertebrate Pathology 76(1): 26-32.

Comps M., Tige G. and H. Grizel (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris, 290, 383-385.

Comps M. (1983). Culture *in vitro* de *Bonamia ostreae* parasite hémocytaire de l'Huître plate *Ostrea edulis* L. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. (Iii) PARIS 296.

Culloty S. C. and M. F. Mulcahy (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144(1-3): 53-63.

Elston, R.A. (1988). *Bonamia ostrea* disease of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) in North America: Occurrence, environmental effects and host range. *Journal of Shellfish Research* 7: 116-117.

Figueras A. J. (1991). *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93(3): 225-233.

Gagnaire B (2006). Etude des effets de polluants sur les paramètres hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*-Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses, Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle: 377 pages.

Girard S., Pérez agundez J.A., Miossec L., and N. Czerwinski (2005). Recensement de la conchyliculture 2001. Agreste Cahiers Conchyliculture, IFREMER.

Grizel H., Comps M., Raguene D., Leborgne Y., Tige G. and A.G. Martin, (1983). Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les cotes de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes Nantes* 46(3): 209-225.

Grizel H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linne et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de docteur, Université des Sciences Techniques du Languedoc, Montpellier: 122 pages.

Grizel H. (1997). Les maladies des mollusques bivalves: risques et prévention. *Revue Sciences Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 16: 161-171.

Herrbach B. (1971). Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35: 79-87.

Hervio D., Chagot D., Godin P., Grizel H. and Mialhe E. (1991). Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Asctospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 67-70

Hine P. M. (1991). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture* 93(3): 241-251.

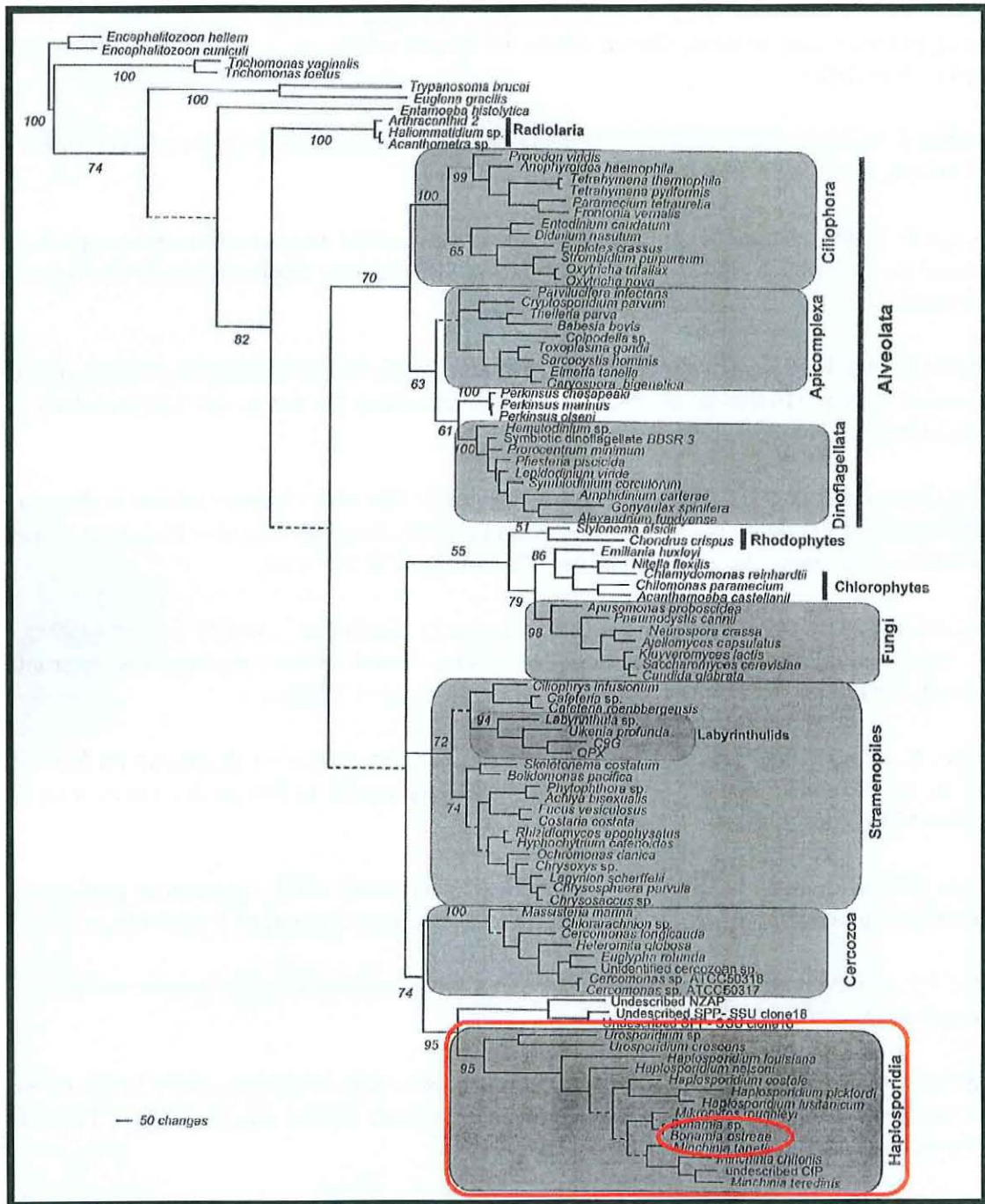
Hine P. M. (2002). Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a possible predisposing factor in bonamiosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 51(1): 49-60.

Hudson E.B. and B.J. Hill (1991). Impact and spread of bonamiasis in the UK. *Aquaculture* 93: 279-285.

- Le Bec C., Mazurie J., Cochenec N. and Le Coguic J.(1991). Influence of *Crassostrea gigas* mixed with *Ostrea edulis* on the incidence of *Bonamia* disease. *Aquaculture*, 93, 263-271.
- Lynch S.A., A. D. V., Wylde S., Mulcahy M.F. and S. C. Culloty (2005). The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *Journal of Shellfish Research* 24(4): 1019-1025.
- Montes J. and M.I. Melendez (1987). Data on the parasitism of *Bonamia ostreae* in the flat oyster of Galicia, north-west coast of Spain. *Aquaculture*: 67.
- Morga B. (2006). Etude des interactions entre l'huître plate *Ostrea edulis* et le parasite *Bonamia ostreae* en cytométrie en flux et en Hybridation Soustractive Suppressive (SSH). Rapport Master2 Recherche GILE Université de Corse: 33 pages.
- Mialhe E., Bachere E., Chagot D. and H. Grizel (1988). Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.* 1979), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71(4): 293-299.
- O'Neill G., Culloty S.C., and M.F. Mulcahy (1998). The effectiveness of two routine diagnostic techniques for the detection of the protozoan parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.* 1980). *Bulletin of European Association of Fish Pathology*. 18: 117-120.
- Pascual M., Martin A. G., Zampatti E., Coatanea D., Defossez J. and R. Robert (1991). Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *International Council for the Exploration of the Sea C.M.* 1991/K:30: 17 pages.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H. and M.A Rabouin (1979). Research on *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., a new parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 43(1): 131-140.
- Reece K.S., Siddall M.E., Stokes N.A. and E.M. Burreson (2004). Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *Journal of Parasitology* 90: 1111-1122.
- Reed J.L. and Muench H.(1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27:493-497.
- Tige G. and H. Grizel (1984). Experimental contamination of *Ostrea edulis* Linne by *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1979) in Crach River (Morbihan)). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes Nantes* 46(4): 307-314.
- Van Banning P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 84: 189-192.
- Zabaleta A. and B.J. Barber (1995). Prevalence of *Bonamia ostreae* in European oysters in the Damariscotta River, Maine, *Journal of Shellfish Research* 15 (2) : 395-400.



ANNEXE 1 : Classification phylogénétique de *Bonamia ostreae* sur la base de la séquence du gène codant la petite sous unité ribosomale de l'ARNr 18S.

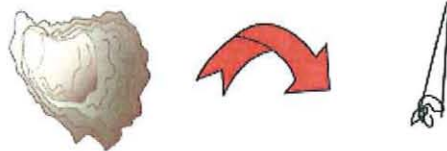


(Reece et al. 2004)

**ANNEXE 2 : Méthode histologique d'identification du taux d'infection des huîtres  
(Cochennec et al. 1997, d'après Morga 2006)**

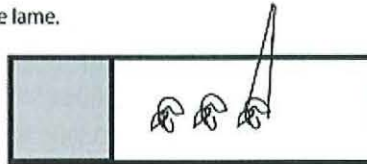
## Apposition de tissus cardiaques

-Prélever à l'aide d'une pince le coeur ou une partie des branchie si l'huître est dégradée.



-Sécher les tissus sur du papier.

-Réaliser les appositions sur une lame.



-Laisser sécher quelques secondes.

## Coloration à HEMACOLOR

- Fixer les cellules dans un bain d'alcool pendant 2 minutes.
- Coloration à hémacolor 2 pendant 2 minutes 30.
- Coloration à hémacolor 3 pendant 2 minutes 30.
- Rincer la lame jusqu'à ce l'eau de rinçage soit transparente.

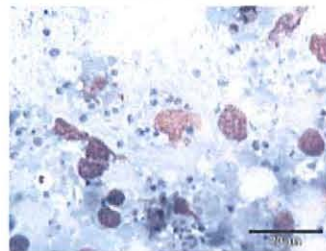
-Sécher la lame.

-Observer la lame au microscope grossissement x100 avec de l'huile à immersion.

-Compter les cellules de Bonamia présente dans le champs. Détermination du degré d'infection de l'huître.

-échelle du degrés d'infection

- 0 parasite huître négative -
- 1 à 10 parasite(s) huître faiblement infectée +
- 10 à 50 parasites huître moyennement infectée ++
- >50 parasites huître fortement infectée +++



## ANNEXE 3 : Protocole de purification du parasite *Bonamia ostreae*

### Protocole de Purification

- 1) Rincer l'intérieur de l'huître avec EMFT
- 2) Mettre le corps de l'huître sans le muscle dans le Potter ajouté de quelques ml d'EMFT et broyer à l'ultra turax (rincer la tige de l'ultra turax avec EMFT)
- 3) Passer le bouillon sur un tamis de 250  $\mu\text{m}$ , puis de 75  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$  (rincer chaque tamis)
- 4) Placer le bouillon dans 5 tubes Falcon de 50 ml (déposer 30-40 ml de solution par tube) .

⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours/min.

- 5) Vider les tubes par retournement
- 6) Remettre le culot en suspension dans 1 ml d'EMFT
- 7) Regrouper tout les culots dans 1 seul tube (2 tubes si 2 huîtres)
- 8) Rincer les tubes avec 1 ml d'EMFT et remettre le tout dans le tube contenant l'ensemble des culots
- 9) Repasser ce tube à l'Ultra turax vitesse très lente (rincer la tige de l'ultra turax avec EMFT)
- 10) Compléter le tube avec de l'EMFT de manière à déposer 10 ml de suspension par tube sur 25 ml de sucrose 20 %.  
(5 tubes par huître)
- 11) Déposer la solution à la pipette de manière à ne pas émulsionner les deux phases.

⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours/min.

- 12) Vider les tubes par retournement
- 13) Remettre le culot en suspension dans 1 ml d'EMFT
- 14) Regrouper tout les culots dans 1 seul tube (2 tubes si 2 huîtres)
- 15) Rincer les tubes avec 1 ml d'EMFT et remettre le tout dans le tube contenant l'ensemble des culots
- 16) Repasser ce tube à l'Ultra turax vitesse très lente (rincer la tige de l'ultra turax avec EMFT)
- 17) Réaliser 2 phases de 25 ml de sucrose 40% et 12 ml de sucrose 20% avec la pompe périsaltique.
- 18) Déposer 5 ml de suspension par tube sur le gradient de sucrose

*Attention : déposer la solution lentement à la micropipette et sur la paroi du tube de manière à ne pas mélanger les phases*

⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours.

- 19) Prélever l'interface 20-40 et rincer volume à volume dans un tube à fond rond.(homogénéiser la solution doucement)



⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours.

20) Préparer les gradients de percoll, à l'aide de la pompe périsaltique déposer 2,5 ml de solution par tube (tubes coniques falcon 15 ml)

21) Vider les tubes préalablement centrifugés par retournement, reprendre les culots dans 1 ml d'EMFT, regrouper dans un seul tube rajouter le volume d'EMFT nécessaire de manière à déposer 1 ml de solution sur les gradient de percoll après avoir homogénéisé la solution à déposer.

⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours.

22) Prélever les interfaces 50-60 et 60-70 à l'aide d'une seringue et rincer avec de l'EMF sans tween volume à volume (13 ml volume maximum).

23) Déposer la solution sur un coussin de sucrose 20% sans tween de 1 ml (tubes coniques falcon de 15 ml)

⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours.

24) Vider les tubes avec une pipette en laissant un peu de liquide au fond reprendre les culots dans 1 ml d'EMF sans tween et regrouper dans un seul tube

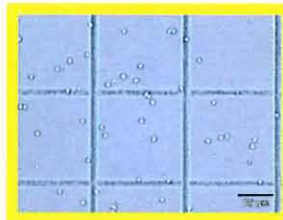
⇒ Equilibrer et centrifuger à 8 °C pendant 30 min et 3500 tours.

25) Vider le tube avec une pipette et diluer le culot dans 500µl d'EMF sans tween

26) Rincer le tube avec le même volume d'EMF sans tween afin d'avoir un volume finale de 1 ml.

27) Faire une dilution au 10<sup>ème</sup> (10 µl de solution de Bonamia + 90 µl d'EMF sans tween)

28) Compter cette dilution sur cellules de Malassez (Compter 3 rectangles de 20 petits carrés et faire la moyenne pour obtenir la concentration de la solution en tenant compte de la dilution)





### *Solutions à préparer avant la réalisation de la purification*

Eau de Mer Filtrée Tween (EMFT) : Eau de mer filtrée à 20  $\mu\text{m}$  + 1% de tween 80%  
*Remarque : prévoir 1.5 litre par purification*

Sucrose 20 % : 20 g de sucrose dans 80 ml EMFT  
*Remarque : pour le dernier coussin, utiliser EMF sans tween*

Sucrose 40 % : 40g de sucrose dans 60 ml EMFT

Solution de percoll : Pour 8 tubes : 60 ml de Percoll (frigo) + 2.46 g de NaCl

Gradients de Percoll pour 8 tubes :

	<b>Percoll (ml)</b>	<b>EMFT (ml)</b>
30 %	6.75	15.75
40%	9	13.5
50%	11.25	11.25
60%	13.5	9
70%	15.75	6.75

### *Matériel nécessaire*

**Une centrifugeuse (3500 tours/min)**

**Pompe péristaltique**

**Ultra turax** (qui permet de broyer l'huître en régulant la vitesse)

**Potter** (verrerie adapter à l'utilisation de l'ultra turax)

**Tamis de 250 $\mu\text{m}$ , 75 $\mu\text{m}$ , 20 $\mu\text{m}$**

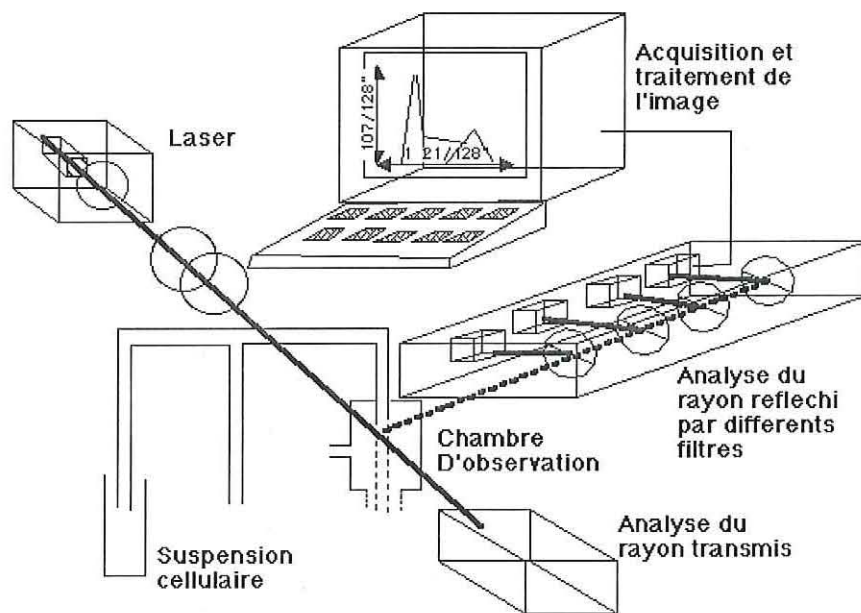
**Béchers**

**Tubes de 50ml à fond rond** (utilisables à 3500 tours/min)

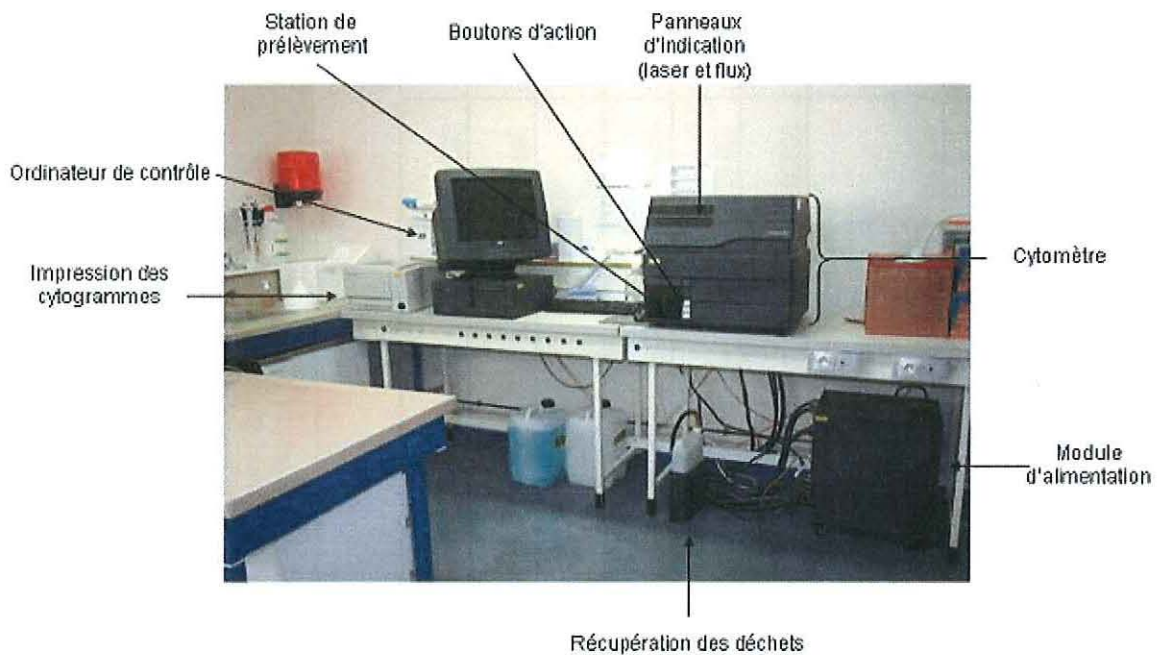
**Tubes de 25ml à fond conique** (utilisables à 3500 tours/min)

**Tubes de 25 ml à fond rond** (utilisables à 3500 tours/min)

**ANNEXE 4: Principe schématique du fonctionnement d'un cytomètre en flux**



**Composition du cytomètre de flux Beckman Coulter EPICS XL4 utilisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie (IFREMER La Tremblade)**



Dates	Nombre de cellules obtenues	Nombres de cellules utilisées	Densité	Nombre d'huîtres utilisées	Paramètres cytométriques suivis	Milieux utilisés	Facteurs environnementaux étudiés	% pop.immédiate après purification			
	(millions)	(millions)	(cellules / ml)					cellules vivantes	cellules mortes	cellules actives	cellules non actives
16/05/06	5	5	500 000	1	MORT EST	EMF, Storgigas, DMSO, Glycérol					
22/05/06	90	90	500 000	2	MORT EST LYS MIT	EMF ,Lewis, Forage	T°C				
30/05/06	160	50	500 000	2	MORT EST LYS	EMF ,Lewis Forage	T°C SAL	27,3	71,8	98,6	0,5
07/06/06	73	45	1 million	2	MORT EST LYS	EMF ,Lewis, Forage	T°C SAL	43,8	55,53	26,65	73,1
20/06/06	1.35	0	0	2							
21/06/06	10	10	500 000	2	MORT EST LYS	EMF , Forage	SAL				
04/07/06	5	5	500 000	3	MORT EST LYS	EMF , Forage	SAL	20,1	78,5	22,8	76,2

MORT= mortalité parasitaire  
EST= activité estérases  
LYS= présence des lysosomes



ANNEXE 6 : Données brutes des tests Température-Milieu-Temps par cytométrie en flux

Milieu	Températures			25°C			15°C			4°C										
	débits	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3									
1 semaine	IP pop marquée	42,33	38,80	35,70	38,94	3,32	3,32	1,92	33,60	20,30	27,71	15,06	8,70	10,08	19,50	43,20	24,26	17,07	9,58	
	IP pop non marquée	57,21	60,90	64,00	60,74	3,35	1,93	60,74	89,00	65,20	77,30	71,65	15,19	0,77	88,54	79,40	55,30	74,41	17,17	9,91
	EST pop non marquée	44,40	61,30	47,30	45,57	5,25	3,03	45,57	90,80	30,20	55,52	31,50	18,19	12,54	37,40	29,97	17,58	12,43	11,68	12,43
	EST pop marquée	54,75	47,30	57,80	53,28	5,40	3,12	53,28	8,70	69,20	43,73	31,35	18,11	85,35	62,00	73,68	16,51	11,68	11,68	11,68
	LVS pop non marquée	60,93	2,60	93,00	4,05	2,05	1,45	5,00	6,00	47,12	5,50	24,03	16,99	8,53	30,24	15,80	12,50	7,22	7,22	7,22
	LVS pop marquée	28,03	98,00	93,00	94,50	2,12	1,50	91,70	48,82	20,70	81,90	21,47	15,18	89,53	89,60	68,10	82,41	12,39	7,16	7,16
	IP pop marquée	55,60	3,80	86,00	70,80	21,50	15,20	22,10	20,70	15,10	10,93	6,31	6,50	0,00	24,70	10,40	12,80	7,39	7,39	7,39
	IP pop non marquée	43,40	95,10	12,20	27,80	22,05	15,60	76,70	78,60	83,80	10,69	6,17	92,44	97,80	74,00	88,08	12,48	7,21	7,21	7,21
	EST pop non marquée	29,50	64,30	71,14	54,90	22,33	12,89	42,70	50,80	98,90	64,13	30,38	17,54	48,83	52,80	36,80	46,14	8,33	4,81	4,81
	EST pop marquée	63,10	32,60	28,20	41,30	19,01	10,97	54,50	47,10	0,00	33,87	29,56	17,07	49,27	62,90	52,49	9,23	5,33	5,33	5,33
	LVS pop non marquée	4,70	11,20	7,95	4,60	3,25	0,00	13,50	13,50	6,75	9,55	6,75	6,75	7,60	7,15	7,38	0,32	0,22	0,22	0,22
	LVS pop marquée	94,30	3,60	99,42	52,00	10,00	99,40	2,08	39,10	31,27	27,94	16,13	7,10	9,90	99,14	86,90	2,40	5,35	5,35	5,35
IP pop marquée	91,40	20,50	78,50	91,10	61,50	57,20	8,50	36,70	57,20	8,50	11,50	86,40	11,50	86,40	11,50	86,40	11,50	86,40	11,50	
IP pop non marquée	53,80	67,70	53,80	73,40	49,90	90,50	90,50	80,50	80,50	68,17	23,17	34,00	94,30	85,27	17,77	10,26	10,26	10,26	10,26	
EST pop non marquée	45,80	30,08	45,80	26,60	49,60	8,00	8,00	8,00	54,00	9,73	5,62	21,10	32,00	26,55	7,71	5,45	5,45	5,45	5,45	
EST pop marquée	45,02	3,00	45,02	36,08	55,62	0,00	0,00	0,00	22,83	15,65	11,77	13,60	89,10	90,60	89,85	1,05	0,75	0,75	0,75	
LVS pop non marquée	49,30	96,74	89,44	61,70	43,72	94,38	92,50	39,10	31,27	27,94	16,13	7,10	9,90	99,14	86,90	2,40	5,35	5,35	5,35	
LVS pop marquée	45,02	3,00	45,02	36,08	55,62	0,00	0,00	0,00	22,83	15,65	11,77	13,60	89,10	90,60	89,85	1,05	0,75	0,75	0,75	

Milieu	Températures			25°C			15°C			4°C									
	débits	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3								
1 semaine	IP pop marquée	7,80	10,44	27,02	15,09	10,42	6,02	13,76	33,60	18,00	19,77	9,44	5,45	25,99	28,70	56,30	37,00	16,77	9,68
	IP pop non marquée	91,65	89,60	72,40	89,60	10,55	6,09	85,72	85,20	80,00	79,16	9,69	5,59	72,64	70,70	42,70	62,01	16,75	9,67
	EST pop non marquée	43,15	53,50	61,20	52,62	9,05	5,23	7,70	27,80	45,80	30,03	16,60	9,59	10,17	30,40	46,20	28,92	18,06	10,43
	EST pop marquée	56,28	46,20	38,10	46,95	9,11	5,26	90,85	71,10	60,40	68,91	16,35	9,44	89,05	69,10	53,50	70,55	17,82	10,29
	LVS pop non marquée	5,07	0,50	1,60	2,52	1,29	2,77	3,30	0,72	2,26	1,36	0,79	2,03	3,00	2,68	0,55	0,32	0,32	0,32
	LVS pop marquée	91,21	92,10	96,00	93,10	2,55	1,47	92,51	95,20	96,70	94,80	2,12	1,22	94,15	95,50	95,45	95,03	0,76	0,44
	IP pop marquée	12,40	79,80	76,80	78,30	2,12	1,50	7,90	9,60	21,80	13,10	7,58	4,38	19,30	23,70	46,70	29,90	14,71	8,50
	IP pop non marquée	65,50	19,80	22,40	21,10	1,84	1,30	90,50	89,30	77,20	65,67	7,36	4,25	79,20	75,30	52,30	68,93	14,54	8,39
	EST pop non marquée	48,80	64,00	39,30	50,70	12,45	7,19	47,40	57,30	89,30	64,67	21,90	12,64	59,10	38,50	37,70	45,10	12,13	7,00
	EST pop marquée	47,70	34,80	59,20	47,23	12,21	7,05	51,60	41,10	10,40	34,37	21,41	12,36	40,10	60,20	61,70	54,00	12,06	6,56
	LVS pop non marquée	1,20	50,18	25,69	34,63	24,49	1,40	3,00	3,00	2,20	1,13	0,80	1,20	2,00	1,60	0,57	0,40	0,40	0,40
	LVS pop marquée	95,50	60,40	77,95	24,82	17,55	95,50	95,12	95,31	95,31	0,27	0,19	0,19	96,04	95,80	95,92	0,17	0,12	0,12
IP pop marquée	91,80	25,40	75,10	83,45	11,81	8,35	6,90	16,58	49,70	24,39	22,44	12,96	30,60	28,30	29,45	1,63	1,15	1,15	
IP pop non marquée	80,20	65,50	80,40	75,37	8,55	4,93	41,70	57,10	68,10	55,63	13,26	7,66	73,90	57,60	44,50	58,67	14,73	8,50	
EST pop non marquée	19,00	33,52	18,10	23,54	8,65	5,00	57,00	30,40	30,40	43,00	13,36	7,71	24,70	41,90	54,70	40,43	15,05	8,69	
EST pop marquée	95,20	88,50	95,20	99,54	4,20	99,22	5,60	4,20	5,60	4,60	1,20	4,60	97,58	95,40	97,58	15,05	8,69	8,69	
LVS pop non marquée	2,00	88,50	2,00	91,60	94,00	5,20	91,60	94,00	5,20	93,70	93,70	93,70	95,40	95,40	2,30	2,30	2,30	2,30	
LVS pop marquée	36,80	15,10	10,00	86,10	10,00	86,10	10,00	79,30	79,30	76,70	73,70	73,70	76,70	73,70	76,70	73,70	76,70	73,70	
IP pop marquée	62,20	83,20	83,20	83,20	12,70	19,70	83,20	12,70	19,70	12,70	19,70	12,70	19,70	12,70	19,70	12,70	19,70	12,70	
IP pop non marquée	70,10	58,70	70,10	63,50	15,60	40,70	63,50	15,60	40,70	58,30	40,70	15,60	81,50	79,30	17,80	20,02	42,48	42,48	
EST pop non marquée	30,10	40,50	30,10	26,50	82,20	0,00	26,50	82,20	0,00	56,60	0,00	0,00	56,60	0,00	0,00	56,60	0,00	0,00	
EST pop marquée	25,40	45,02	25,40	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	3,00	45,02	
LVS pop non marquée	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	0,00	91,25	
LVS pop marquée	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	73,00	



Mieux		LEWS																	
Températures		25°C						15°C						4°C					
Répétés		1	2	3				1	2	3				1	2	3			
Temps					moyenne	ecart type	erreur standard				moyenne	ecart type	erreur standard				moyenne	ecart type	erreur standard
	12 h	IP pop marquée	54,15	68,20	83,10	68,48	14,48	8,36	68,95	63,90	75,70	69,52	5,92	3,42	82,80	75,90	86,10	81,60	5,20
IP pop non marquée		45,53	30,20	15,70	30,48	14,91	8,61	30,00	35,80	23,10	29,63	6,36	3,67	16,10	23,40	12,50	17,33	5,55	3,21
EST pop non marquée		56,05	72,30	63,70	64,02	8,13	4,69	42,40	71,50	57,40	57,10	14,55	8,40	58,05	85,80	76,10	73,32	14,08	8,13
EST pop marquée		43,21	26,10	34,20	34,50	8,56	4,94	56,95	26,50	40,70	41,38	15,24	8,80	41,45	13,70	22,40	25,85	14,19	8,19
LYS pop non marquée		54,59	17,80	16,06	35,33	27,25	19,27	51,53	15,10	13,30	32,42	27,04	19,12	5,05	66,52	5,00	5,03	0,04	0,02
LYS pop marquée		39,26	81,00	82,34	60,80	30,46	21,54	43,34	81,20	84,80	64,07	29,32	20,73	93,78	24,30	91,40	92,59	1,68	1,19
24h	IP pop marquée	68,00	84,60	85,40	79,33	9,82	5,67	46,70		64,90	55,80	12,87	9,10	42,60	65,60	78,80	62,33	18,32	10,58
	IP pop non marquée	30,80	13,60	13,40	19,27	9,99	5,77	52,40		34,00	43,20	13,01	9,20	56,90	33,70	19,80	36,80	18,74	10,82
	EST pop non marquée	62,30	62,70	80,70	68,57	10,51	6,07	62,10	87,00	60,70	69,93	14,80	8,54	63,10	87,00	65,40	71,83	13,18	7,61
	EST pop marquée	36,40	35,20	17,30	29,63	10,70	6,18	37,10	12,50	37,50	29,03	14,32	8,27	36,40	11,70	33,30	27,13	13,46	7,77
	LYS pop non marquée		19,80	31,80	25,80	8,49	6,00		31,24	14,40	22,82	11,91	8,42		7,02	10,00	8,51	2,11	1,49
	LYS pop marquée		78,80	66,50	72,65	8,70	6,15		67,50	80,00	73,75	8,84	6,25		91,20	87,00	89,10	2,97	2,10
48h	IP pop marquée	89,80	65,70	79,70	78,40	12,10	6,99	57,10	74,60	80,40	70,70	12,13	7,00	77,50	66,00	62,80	68,77	7,73	4,46
	IP pop non marquée	9,10	33,50	18,90	20,50	12,28	7,09	42,20	22,70	17,50	27,47	13,02	7,52	20,50	33,24	36,40	30,05	8,42	4,86
	EST pop non marquée	84,20	81,80	76,50	80,83	3,94	2,27	44,00	60,30		52,15	11,53	8,15	73,90	73,80	57,30	68,33	9,56	5,52
	EST pop marquée	14,20	16,60	20,60	17,13	3,23	1,87	54,10	38,60		46,35	10,96	7,75	24,70	24,50	41,00	30,07	9,47	5,47
	LYS pop non marquée	39,20	38,00	96,60				45,80	34,90	76,38				2,90	7,00	84,05			
	LYS pop marquée	59,72	60,80	3,00				47,80	63,90	23,04				94,40	91,20	15,62			
1 semaine	IP pop marquée	38,30	36,50					0,50	85,30					76,70	19,00				
	IP pop non marquée	60,50	62,90					98,00	12,40					22,00	79,70				
	EST pop non marquée	83,70	56,30					47,90	26,60					81,50	82,30				
	EST pop marquée	15,90	43,00					52,10	71,02					17,80	13,50				
	LYS pop non marquée	59,40	47,90	34,20				20,94	0,70	2,30				31,50	25,60	22,30			
	LYS pop marquée	38,40	49,90	59,90				77,60	95,90	94,60				66,80	73,00	72,90			



## ANNEXE 7: Données brutes des tests Salinité-Temps par cytométrie en flux

		Salinité		5g/l					15g/l											
		Réplicats		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5					
temps									moyenne	ecart type	erreur standard						moyenne	ecart type	erreur standard	
12 h	IP pop marquée	90,54	95,98					83,90	90,14	6,05	3,49	29,32	94,10			70,40	86,30	70,03	28,88	14,44
	IP pop non marquée	9,50	0,00					14,60	8,03	7,41	4,28	69,84	4,60		25,20	12,20	27,96	29,19	14,59	
	EST pop non marquée	90,30	93,30					91,80	91,80	1,50	0,87	89,80	79,90		72,10	83,40	81,30	7,38	3,69	
	EST pop marquée	8,50	4,00					4,90	5,80	2,38	1,37	8,90	18,80		26,00	12,50	16,55	7,51	3,76	
	LYS pop non marquée	34,54	18,42					13,40	22,12	11,05	6,38	51,60	5,60			47,90	35,03	25,56	14,76	
	LYS pop marquée	63,90	80,00					84,40	76,10	10,79	6,23	46,60	93,50			44,80	61,63	27,61	15,94	
24 h	IP pop marquée	85,60	98,20					91,90	8,91	6,30	74,80	84,80				79,80	7,07	5,00		
	IP pop non marquée	13,10	0,00					6,55	9,26	6,55	23,70	14,40				19,05	6,58	4,65		
	EST pop non marquée	90,50	97,40					93,95	4,88	3,45	72,30	81,60				76,95	6,58	4,65		
	EST pop marquée	4,40	0,00					2,20	3,11	2,20	25,60	17,00				21,30	6,08	4,30		
	LYS pop non marquée	46,00	27,40					36,70	13,15	9,30	5,60	5,86				5,73	0,18	0,13		
	LYS pop marquée	51,00	70,70					60,85	13,93	9,85	91,54	91,80					91,67	0,18	0,13	
48 h	IP pop marquée	70,90	87,70	85,80				81,47	9,20	5,31	62,70	77,60	80,70			73,67	9,62	5,56		
	IP pop non marquée	27,90	10,30	11,00				16,40	9,97	5,75	35,10	21,00	17,30			24,47	9,39	5,42		
	EST pop non marquée	90,70	93,60	94,00				92,77	1,80	1,04	89,40	88,80	95,10			91,10	3,48	2,01		
	EST pop marquée	7,20	3,90	2,20				4,43	2,54	1,47	7,40	8,90	2,90			6,40	3,12	1,80		
	LYS pop non marquée	13,50	99,32	15,50				42,77	48,98	28,28	27,50	99,06	32,80			53,12	39,87	23,02		
	LYS pop marquée	84,24	2,00	81,80				56,01	46,79	27,02	70,10	2,00	62,50			44,87	37,32	21,55		
1 semaine	IP pop marquée	69,30		91,70				38,80	66,60	26,55	15,33	81,00		91,80	95,52	70,00	84,58	11,51	5,75	
	IP pop non marquée	30,30		6,00				60,00	32,10	27,04	15,61	17,50		7,00	0,00	28,90	13,35	12,62	6,31	
	EST pop non marquée	68,30		75,70				75,80	73,27	4,30	2,48	52,10		12,10	89,50	24,40	44,53	34,33	17,17	
	EST pop marquée	30,50		21,64				20,90	24,35	5,34	3,08	47,30		86,40	8,90	74,20	54,20	34,33	17,17	
	LYS pop non marquée	41,90		30,00				13,70	28,53	14,16	8,17	91,10		59,85	11,00	7,30	11,04	36,06	37,67	16,85
	LYS pop marquée	59,30		64,00				77,20	65,83	10,57	6,10	22,90	37,50	84,00	82,40	68,50	59,06	27,51	12,30	

		Salinité		20g/l					25g/l												
		Réplicats		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5						
temps									moyenne	ecart type	erreur standard						moyenne	ecart type	erreur standard		
12 h	IP pop marquée	93,94						77,50	87,30	86,25	8,27	4,77			19,05	73,10	83,50	58,55	34,60	19,98	
	IP pop non marquée	0,50						20,50	10,90	10,63	10,00	5,78			80,10		25,40	15,10	40,20	34,94	20,17
	EST pop non marquée	91,40						91,50	89,30	90,73	1,24	0,72	67,90	82,30		80,80	69,70	75,18	7,42	3,71	
	EST pop marquée	7,10						7,20	8,40	7,57	0,72	0,42	31,90	17,40		17,60	29,70	24,15	7,73	3,87	
	LYS pop non marquée	7,00							58,60	32,80	36,49	21,07	36,12	4,78		31,90	24,27	17,01	9,82		
	LYS pop marquée	91,10							38,60	64,85	37,12	21,43	62,30	94,50			63,40	73,40	18,28	10,55	
24 h	IP pop marquée	87,90							87,90								41,10	46,10	32,60		
	IP pop non marquée	9,80							9,80								57,65	45,18	31,95		
	EST pop non marquée	87,90							87,90								91,10				
	EST pop marquée	10,70							10,70								8,30				
	LYS pop non marquée	2,00							2,00								38,03	50,95	36,03		
	LYS pop marquée	95,70							95,70								17,40	96,40		58,90	55,86
48 h	IP pop marquée	87,00		86,00					86,50	0,71	0,50	70,10	70,60	84,40			75,03	8,12	4,69		
	IP pop non marquée	12,50		13,00					12,75	0,35	0,25	30,10	28,40	13,50			24,00	9,13	5,27		
	EST pop non marquée	94,10		96,50					95,30	1,70	1,20	52,90	81,20	95,70			76,60	21,77	12,57		
	EST pop marquée	4,60		1,60					3,10	2,12	1,50	44,60	16,70	2,40			21,23	21,46	12,39		
	LYS pop non marquée	99,20		93,50					96,35	4,03	2,85	24,40	99,42	0,00			41,27	51,81	29,91		
	LYS pop marquée	4,60		0,00					2,30	3,25	2,30	74,50	0,30	92,60			55,80	48,91	28,24		
1 semaine	IP pop marquée			55,70	35,10	21,60			37,47	17,17	9,91	81,40		34,90	26,40	36,70	44,85	24,78	12,39		
	IP pop non marquée			42,50	64,08	77,70			61,43	17,75	10,25	17,30		62,80	72,70	54,70	51,88	24,20	12,10		
	EST pop non marquée			36,00	81,18	69,00			62,06	23,38	13,50	57,50		29,30	68,80	21,54	44,29	22,49	11,25		
	EST pop marquée			63,00	17,34	28,80			36,38	23,76	13,71	41,50		69,40	30,30	77,90	54,78	22,54	11,27		
	LYS pop non marquée			11,00	11,05	31,56			17,87	11,86	6,85	18,50	29,58	15,00	14,20	16,90	18,84	6,24	2,79		
	LYS pop marquée			75,00	77,15	65,00			72,38	6,48	3,74	79,52	67,20	73,00	70,60	79,70	74,00	5,52	2,47		

		Salinité	30g/l							35g/l									
		Réplicats	1	2	3	4	5				1	2	3	4	5				
temps								moyenne	ecart type	erreur standard						moyenne	ecart type	erreur standard	
	12 h	IP pop marquée	72,70				66,00	72,70	70,47	3,87	2,23	5,14	16,54			58,70	63,10	35,87	29,33
IP pop non marquée		25,14				33,00	26,10	28,08	4,29	2,48	94,00	81,20			40,60	36,10	62,98	28,97	14,48
EST pop non marquée		50,20				75,00	61,40	62,20	12,42	7,17	37,30	58,70			53,50	46,30	48,95	9,28	4,64
EST pop marquée		49,50				22,00	36,70	36,07	13,76	7,94	62,20	40,70			45,20	52,00	50,03	9,35	4,68
LYS pop non marquée		5,00				5,00	5,00	5,00	0,00	0,00	0,50	5,30			3,00	2,93	2,40	1,39	
LYS pop marquée		93,40				93,60	93,50	93,50	0,14	0,10	95,20	93,34			93,40	93,98	1,06	0,61	
24h	IP pop marquée	64,30					64,30				10,24	64,10				37,17	38,08	26,93	
	IP pop non marquée	34,80					34,80				87,40	35,10				61,25	36,98	26,15	
	EST pop non marquée	69,00					69,00					73,80				73,80			
	EST pop marquée	30,10					30,10					25,10				25,10			
	LYS pop non marquée	2,98					2,98				19,60	4,12				11,86	10,95	7,74	
	LYS pop marquée	95,45					95,45				78,80	94,40				86,60	11,03	7,80	
48h	IP pop marquée	74,00		72,20			73,10	1,27	0,90		61,50	71,50	71,10			68,03	5,66	3,27	
	IP pop non marquée	25,40		26,90			26,15	1,06	0,75		37,70	28,10	26,90			30,90	5,92	3,42	
	EST pop non marquée	79,00		70,80			74,90	5,80	4,10		54,80	79,90	73,50			69,40	13,04	7,53	
	EST pop marquée	19,30		28,20			23,75	6,29	4,45		43,90	19,70	24,20			29,27	12,87	7,43	
	LYS pop non marquée	99,52		0,00			49,76	70,37	49,76		23,50	99,54	0,00			41,01	52,03	30,04	
	LYS pop marquée	3,00		94,20			48,60	64,49	45,60		75,58	2,00	95,50			57,69	49,25	28,43	
1 semaine	IP pop marquée			43,40	24,75	53,20	40,45	14,45	8,34		33,40		45,40	48,90	54,30	45,50	8,86	4,43	
	IP pop non marquée			55,20	74,30	45,10	58,20	14,83	8,56		65,00		54,60	49,60	37,40	51,65	11,46	5,73	
	EST pop non marquée			24,00	62,90	27,24	38,05	21,58	12,46		84,80		35,90	67,74	16,20	51,16	30,88	15,44	
	EST pop marquée			74,30	35,02	70,12	59,81	21,57	12,46		14,30		61,80	31,52	81,80	47,36	30,21	15,11	
	LYS pop non marquée			26,00	10,70	30,70	22,47	10,46	6,04		39,08	34,54	23,00	8,60	41,00	29,24	13,49	6,03	
	LYS pop marquée			63,00	75,60	59,90	66,17	8,32	4,80		59,40	63,45	69,70	75,40	55,15	64,62	8,07	3,61	



Salinité		40g/l							45g/l								
Réplicats		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5				
temps							moyenne	ecart type	erreur standard					moyenne	ecart type	erreur standard	
	12h	IP pop marquée	77,30			68,90	50,50	65,57	13,71	7,91	6,60	14,02			82,90	34,51	42,07
IP pop non marquée		21,45			29,60	48,20	33,08	13,71	7,92	92,80	84,90			15,80	64,50	42,36	24,46
EST pop non marquée		35,20			59,70	51,70	48,87	12,49	7,21	40,40	50,40			67,30	52,70	13,60	7,85
EST pop marquée		64,00			38,60	47,20	49,93	12,92	7,46	59,20	49,20			31,90	46,77	13,81	7,97
LYS pop non marquée		5,32				84,50	44,91	55,99	39,59	28,18	5,18			74,00	35,79	35,03	20,23
LYS pop marquée		91,60				10,20	50,90	57,56	40,70	69,10	92,80			18,40	60,10	38,01	21,94
24h	IP pop marquée	6,80					6,80			8,80	9,40			9,10	0,42	0,30	
	IP pop non marquée	93,04					93,04			87,90	89,90			88,90	1,41	1,00	
	EST pop non marquée	18,90					18,90				52,30			52,30			
	EST pop marquée	81,00					81,00				46,30			46,30			
	LYS pop non marquée	4,30					4,30			52,35	2,00			27,18	35,60	25,18	
	LYS pop marquée	94,50					94,50			45,80	94,90			70,35	34,72	24,55	
48h	IP pop marquée	62,00		75,30			68,65	9,40	6,65		26,90	80,00		53,45	37,55	26,55	
	IP pop non marquée	37,60		23,10			30,35	10,25	7,25		72,20	16,80		44,50	39,17	27,70	
	EST pop non marquée	64,90		63,30			64,10	1,13	0,80		63,50	67,70		65,60	2,97	2,10	
	EST pop marquée	34,70		35,50			35,10	0,57	0,40		34,72	29,80		32,28	3,48	2,46	
	LYS pop non marquée	99,50		30,40			64,95	48,86	34,55	54,90	95,30	29,70		59,97	33,09	19,11	
	LYS pop marquée	2,30		82,40			32,35	42,50	30,05	43,90	2,30	60,40		35,53	29,94	17,29	
1 semaine	IP pop marquée			24,70	47,80	69,10	47,20	22,21	12,82			92,20		67,50	79,85	17,47	12,35
	IP pop non marquée			73,80	50,10	30,10	51,33	21,88	12,63			0,00		30,30	15,15	21,43	15,15
	EST pop non marquée			19,90	37,30	39,00	32,07	10,57	6,10			45,50		59,70	52,60	10,04	7,10
	EST pop marquée			77,70	61,40	59,10	66,07	10,14	5,85			51,90		37,40	44,65	10,25	7,25
	LYS pop non marquée	9,15		4,10	4,20	46,30	15,94	20,38	10,19			36,00		50,50	43,25	10,25	7,25
	LYS pop marquée	89,98		84,30	82,90	50,60	76,95	17,83	8,91			56,00		46,30	51,15	6,66	4,85