

I.U.T. de Biologie Appliquée

LA ROCHELLE

ETUDE DE DEUX EPIZOOTIES DE L'HUITRE PLATE

Ostrea edulis

Marteilia refringens - Bonamia ostreae

Histologie - Pathologie

Réalisée au laboratoire conchylicole I. S. T. P. M.

LA TRINITE SUR MER

par Sylvie GAGNERAUD

du 7 Février au 1er Avril 1983

AVANT-PROPOS

Je remercie tout le personnel de l'I.S.T.P.M. de LA TRINITE SUR MER et plus particulièrement Mademoiselle BACHERE Evelyne, Monsieur TIGE Gilbert de m'avoir conseillée durant ce stage.

Je n'oublie pas tous les membres de la section "histologie-pathologie" pour leur participation et l'accueil qu'ils m'ont réservé dans leur laboratoire.

+--+--+--+--+--+--+--+--+--+

PLAN

	page
<u>-Première partie</u>	6
A) Caractères généraux des deux épizooties de l'huître plate, <i>Ostreae edulis</i>	7
I) Maladie de la glande digestive de l'huître plate, <i>Ostreae edulis</i> due au parasite <u><i>Marteilia refringens</i></u>	7
I') Symptômes de la maladie	8
I.1 Description du parasite	8
I.2 Cycle d'évolution du parasite	9
I.3 Conséquences pour l'élevage de l'huître plate en Bretagne	9
I.4 Etude d'un secteur atteint par cette épizootie	9
I.5 Aspect actuel de la parasitose due à <u><i>Marteilia refringens</i></u> dans les différents secteurs de Bretagne	14
II) Maladie hémocytaire de l'huître plate, <i>Ostreae edulis</i> due au parasite <u><i>Bonamia ostreae</i></u>	17
II.1 Symptômes de la maladie	17
II.2 Description du parasite	17
II.3 Cycle d'évolution du parasite	18
II.4 Situation épidémiologique	22
II.5 Etude de l'évolution de la parasitose dans le secteur de la baie de Kerdelan (Golfe du Morbihan)	22
<u>Chapitre</u> : Description des différentes parties des méthodes histologiques	27
A) Méthodes d'inclusion	28
I) Inclusion à la paraffine	28
I.1 Fixation	28
I.2 Déshydratation	29
I.3 Inclusion	30
I.4 Coupes à la paraffine	30
I.5 Déparaffinage sans collodionnage	31
I.6 Différents types de coloration	31
<u>Chapitre</u> : Culture d'algues	34
<u>-Deuxième partie</u>	37 b
A) Recherche d'une méthode de diagnostic	38
B) Essais d'infestation	39
C) Rappels sur l'ozonation de l'eau de mer	40
I Législation pour l'application pratique de ce traitement	41
II Description des différentes réactions chimiques entre l'ozone et quelques éléments de l'eau de mer	41
III Principe de fonctionnement de l'ozoneur	43
IV Description des différentes parties du dosage de l'ozone	45
a) Dosage de l'ozone dans l'air	45
b) Dosage de l'ozone résiduel dans l'eau	46
c) Préparation des suspensions de parasite et traitements	48
d) Discussion des essais	49

L'I.S.T.P.M. et l'aquaculture

La conchyliculture, activité traditionnelle, représente un secteur économique important qui situe la France dans les tous premiers rangs mondiaux.

Sur le plan scientifique, l'I.S.T.P.M. a l'entière responsabilité de cette activité économique. Il y consacre donc la majeure partie des moyens de son Département "Cultures Marines", ses programmes se répartissant dans trois thèmes de recherche :

- préservation et amélioration du cheptel (épidémiologie, pathologie, parasitologie, sélection, génétique)
- utilisation optimale des sites déjà exploités (étude des facteurs influençant la production et détermination des charges optimales des champs de culture)
- recherche des possibilités d'extension et de diversification des élevages (mise en exploitation de nouveaux sites et culture de nouvelles espèces)

Ces thèmes de recherche répondent, d'une part aux problèmes prioritaires posés par les maladies épizootiques qui touchent gravement l'ostréiculture, d'autre part aux décisions gouvernementales visant le développement de la production conchylicole.

*

*

*

Résumé

Durant les quinze dernières années, deux parasites encore inconnus en France ont causé successivement des mortalités anormales dans les élevages d'huitres plates, Ostrea edulis.

Vu l'enjeu économique pour l'ostréiculteur qui pratique une monoculture, des recherches et examens épizootiologiques ont été effectués à l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes de La Trinité Sur Mer afin de trouver des traitements appropriés.

Ces deux parasites pathogènes sont, Marteilia refringens observé pour la première fois en 1968 dans l'Aber Wrach et Bonamia ostreae apparu en 1979 à l'Ile Tudy en Bretagne Sud.

Introduction

L'ostréiculture ou culture de l'huître s'est développée réellement au milieu du siècle dernier après que des essais de captage de l'huître indigène Ostrea edulis soient effectués par Costes.

A la suite de l'incident du "Morlaisson" en 1867, l'huître creuse, Crassostrea angulata fut implantée en France. Sa prosterité fut interrompue en 1970, par une épidémie d'origine virale. L'huître du Pacifique Crassostrea gigas a permis le relancement en France de cette culture, en remplaçant l'huître portugaise sur les parcs où son acclimatation fut rapide (Marteil, 1974).

Les différents stades de l'ostréiculture sont :

- le captage qui consiste en la fixation des larves d'huître sur des collecteurs qui leur sont destinés. Les collecteurs les plus employés en Bretagne sont

- + les tuiles chaulées constituant des bouquets (pour faciliter le détroquage du naissain)
- + les coquilles de moules, soit semées directement sur le fond, soit mises en pochons, disposés sur des tringles ou enfilés sur des fils de fer
- + les supports en plastique de différentes formes

Les collecteurs doivent offrir une surface absolument propre pour la fixation des larves.

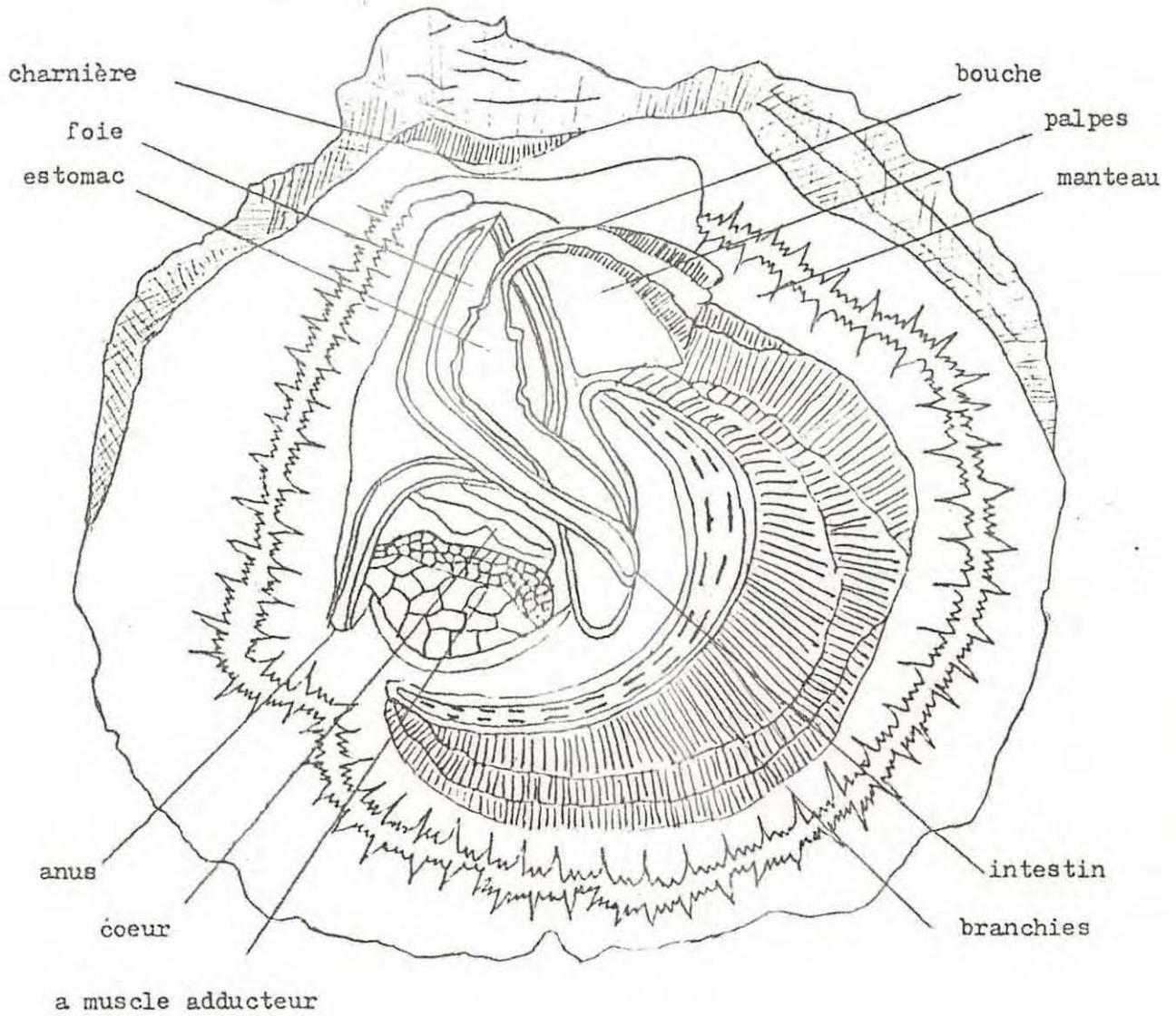
- élevage

Les larves, une fois fixées prennent le nom de naissain. Au bout de 8 à 10 mois, celui-ci est détroqué et placé soit en poches disposées sur des tables soit à même le sol sur les parcs d'élevage ; durant 18 mois ou 2 ans il s'agit du "demi-élevage".

- affinage

Après trois ans d'élevage, les huîtres sont placées dans les parcs où l'eau est un peu moins salée et plus riche en plancton.

Actuellement, l'huître plate, essentiellement cultivée en Bretagne (Morbihan étant le plus important centre de captage de l'espèce) subit de graves mortalités dues à deux épizooties nouvelles.



Anatomie de l'huître plate ostrea edulis

PREMIERE PARTIE

Description des deux parasites
Epidemiologie

A) Caractères généraux des deux épizooties de l'huître plate, *Ostrea edulis*

Dès 1919-1921, l'hypothèse d'une maladie bactérienne, avait été considérée pour expliquer les mortalités importantes de l'huître plate en Europe ; mais le caractère pathogène des bactéries isolées n'avait pas été prouvé (Orton 1924).

Durant, les dernières années, deux parasites ont essentiellement causé des mortalités chez l'huître plate.

L'une de ces deux parasitoses est due à *Marteilia refringens* (Grizel et al., 1974) considérée comme la maladie de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis*. Depuis son apparition sur les côtes de Bretagne, en 1968, elle s'est étendue aux différents bassins ostréicoles, causant chez cette espèce, une mortalité massive.

A la suite de la parasitose causée par *Marteilia refringens*, un autre parasite de l'huître plate, encore inconnu en France, a été mis en évidence sur des huîtres malades provenant des parcs de l'Île Tudy (Bretagne). Cette nouvelle épizootie fut découverte en 1979, depuis, elle s'est développée sur les côtes bretonnes (Nord et Sud) et en Manche.

Cette maladie a été attribuée à un protozoaire nouveau : *Bonamia ostreae*.

Actuellement, à l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes de La Trinité Sur Mer, le laboratoire de pathologie recherche sur des lots d'huîtres l'éventuelle présence de ces deux parasites qui entraînent la mort de l'huître plate (parasites pathogènes).

1) Maladie de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* due au parasite *Marteilia refringens*

A partir de 1968, année de son apparition dans les élevages d'huîtres plates de l'Aber Wrach (Finistère) (Herrbach, 1971) et dans le bassin de Marennes (Comps, 1970), cette épizootie s'est étendue aux différents bassins ostréicoles.

En 1974, on notait sa présence en Bretagne Sud, épargnant quelques secteurs d'élevage en eau profonde, comme la Baie de Quiberon, le gisement naturel de Belle Ile et la Baie de Saint Brieuc en Bretagne Nord.

1^b) Symptômes de la maladie

Les huîtres atteintes par le parasite présentent :

- un arrêt de la croissance
- une dépigmentation de la masse digestive
- un amaigrissement considérable de l'huître qui a un aspect glaireux (dû à une perte en glycogène)

Il est à noter que ces différentes caractéristiques ne sont pas spécifiques de la maladie. On peut ainsi rencontrer des huîtres malades, d'apparence saine.

1.1 Description du parasite

En raison des dégâts causés par ce parasite, des études histopathologiques des huîtres malades ont permis de mettre en évidence les différents stades du parasite. Ainsi, au début du cycle, on observe une cellule de 10 à 35 μ de diamètre (Fig. 1 a), appelée "cellule primaire", comportant dans son cytoplasme, une cellule de 4 à 5 μ de diamètre, appelée "cellule secondaire" (Grizel et al. 1974). Cet ensemble qui serait la phase infestante, évolue au niveau de l'épithélium stomacal puis au niveau de celui des canaux et des diverticules digestifs.

Par la suite, on obtient, lors de l'évolution de ces formes, une cellule dite primaire contenant huit cellules secondaires obtenues par multiplication.

Dans la cellule infestée, chacune des huit cellules secondaires contiennent quatre "cellules tertiaires" (Fig. 1 d). Chaque cellule secondaire présente ultérieurement (Fig. 1 e) de grosses inclusions basophiles dans le cytoplasme résiduel ; ces inclusions sont très réfringentes.

La cellule primaire libère dans la lumière des diverticules digestifs, les cellules secondaires. Celles-ci renfermant des inclusions protéiniques et quatre cellules tertiaires sont dénommées sporanges.

Elles sont émises dans le milieu avec les fécès, soit ingérées par les prédateurs de l'huître.

C'est la microscopie électronique qui a permis d'observer la structure de ces différentes cellules (cf. Fig. 2 et 3).

Toutefois, le cycle n'est pas complet, l'intervalle entre le sporange et la cellule primaire n'est pas encore connu (partie du cycle extérieure à l'huître).

1.2 Cycle d'évolution du parasite

Ce parasite est trouvé en hiver à l'état de jeune stade dans l'épithélium stomacal "cellule primaire", il contient une à deux cellules infestantes. Dès le printemps, on observe en plus sur les coupes des stades plus évolués que l'on rencontre dans les diverticules digestifs (Fig. 1).

Ce cycle d'évolution paraît donc en relation avec la température de l'eau, mais des expériences ont démontré que d'autres facteurs physiques interviennent.

1.3 Conséquences pour l'élevage de l'huître plate en Bretagne

Depuis l'apparition de cette épizootie (1969), la production d'huître plate n'a cessé de décroître (cf. Fig. 4).

Confrontés à cette mortalité massive de l'huître plate, les ostréiculteurs ont entrepris à partir de 1974, la culture de l'huître creuse du Pacifique Crassostrea gigas qui ne présente pas de signe de la maladie et aucune trace du parasite.

Remarque

Le déclin de la production de Crassostrea angulata a été dû à un virus (groupe des iridovirus) provoque des lésions au niveau des branchies et entraînant la mort de populations d'huîtres.

1.4 Etude d'un secteur atteint par cette épizootie (Golfe - Pénerf - Penvins)

On ne peut considérer significative l'évolution du parasite au sein de ce secteur pour chaque type d'âge. On retiendra donc les valeurs obtenues pour la classe de tous âges (Fig. 5).

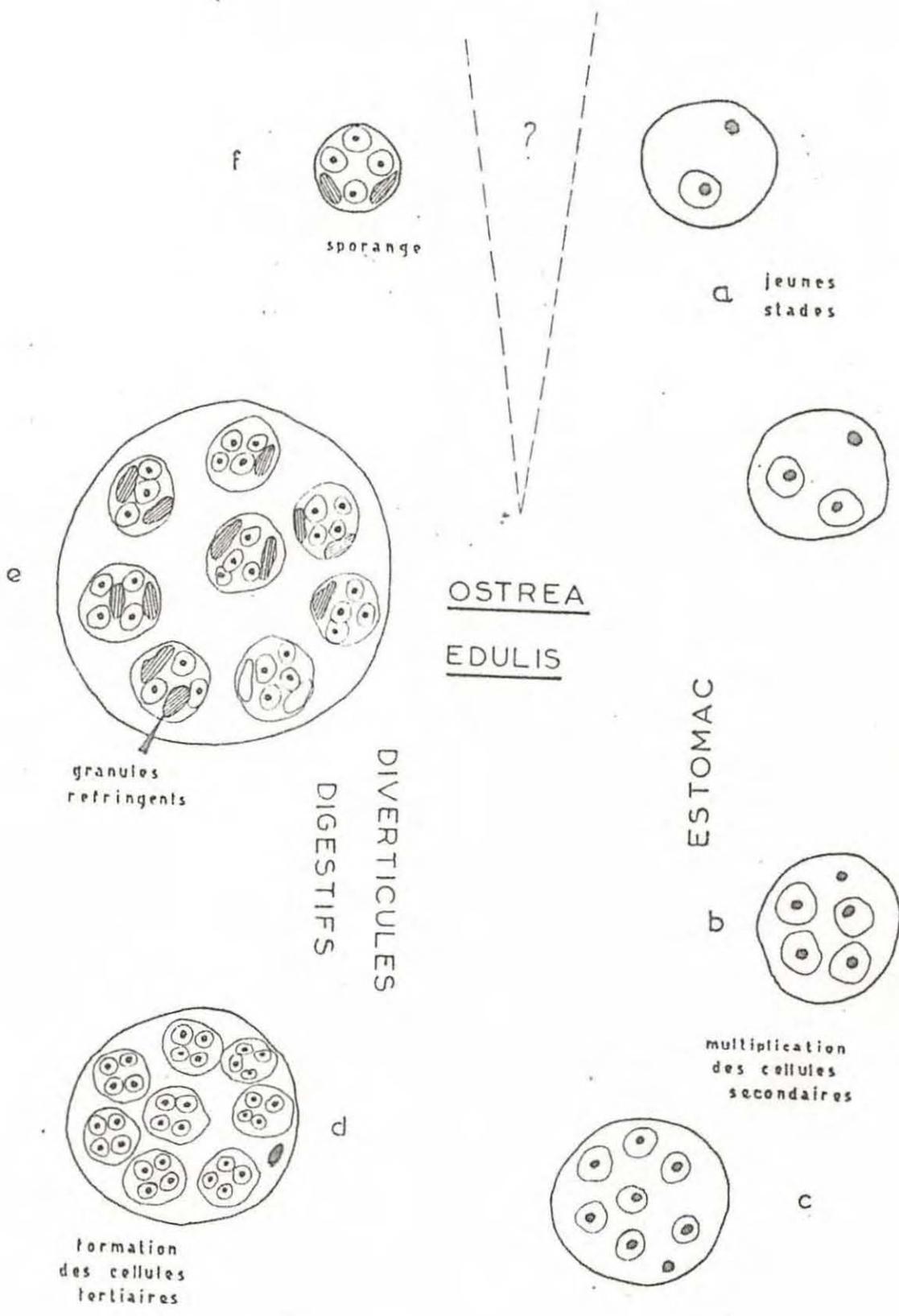


Fig. 1 Schéma du cycle de Marteilia refringens

Photo : Cytoplasme dense, riche en ribosomes et en reticulum endoplasmique, contenant des inclusions de structure paracristalline caractéristique (IP) et des ensembles vacuolaires (EV).
On distingue également le noyau (N).

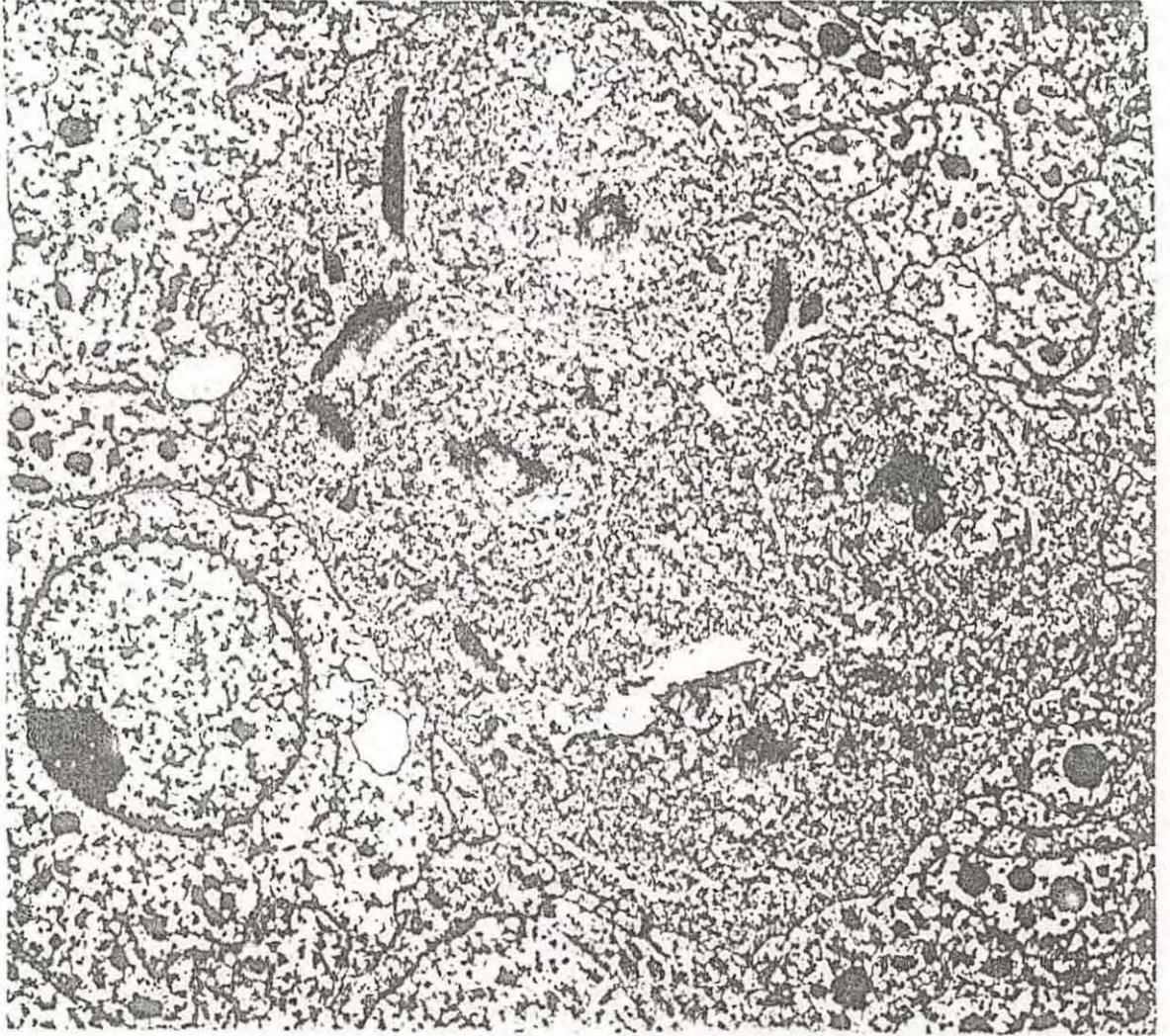


Fig. 2 : Cellule primaire de Marteilia refringens en microscopie électronique

- 11 -

Photo : on observe une paroi (P) qui double la membrane des cellules secondaires et des cellules tertiaires.
On distingue très facilement les inclusions refringentes zones (opaques aux élections)
cytoplasme contenant des ribosomes et un noyau

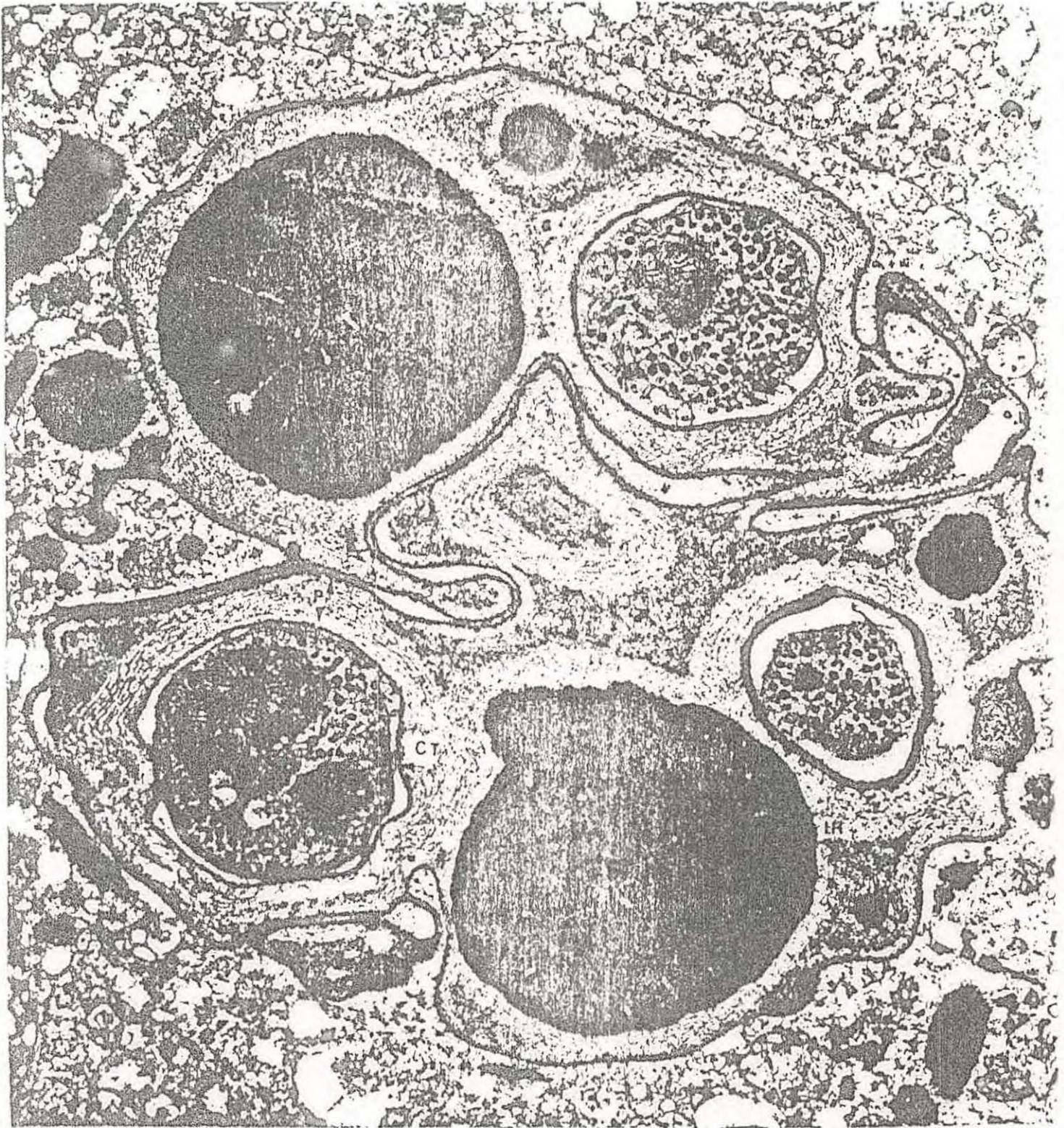
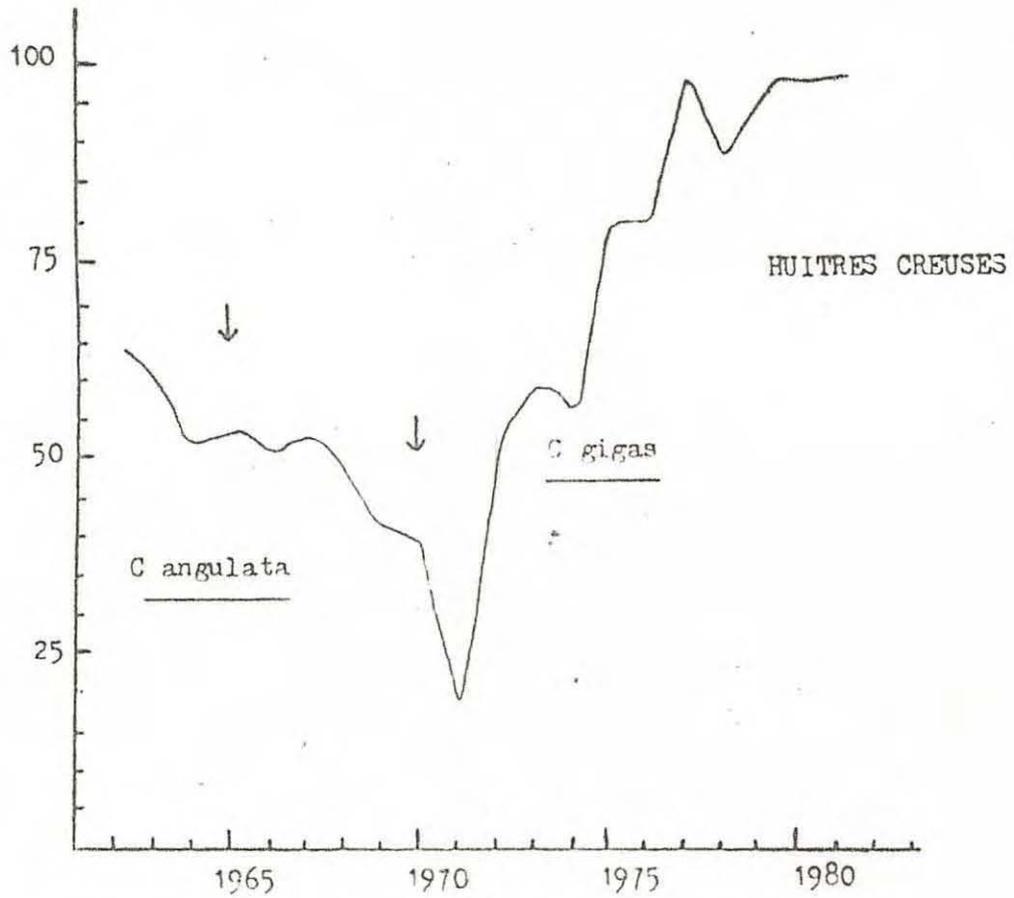


Fig. 3 : Cellules tertiaires de Marteilia refringens en microscopie électronique

en milliers de tonnes



en milliers de tonnes

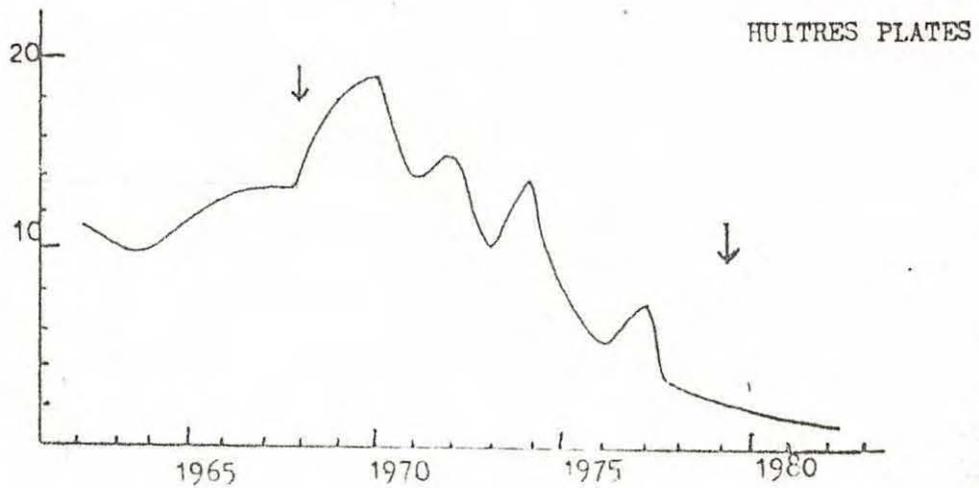


Fig. 4 : Déclin du stock par épizooties successives décelées en 1968 (*Marteilia refringens*) et en 1979 (*Bonamia ostreae*)

On note d'abord, l'évolution régulière de cette parasitose de 1974 (début des recherches de Marteilia refringens sur différents lots d'huîtres) jusqu'en 1979, la courbe obtenue est similaire à celle de Gauss.

Les années 1980-1981 sont caractérisées par un déclin de la parasitose.

Il semblerait que depuis 1981, l'épizootie se redévelopperait. Ainsi, on peut citer l'exemple du secteur de la rivière de La Trinité, qui en 1975, était entièrement infestée par Marteilia refringens, alors qu'en 1980, elle ne présentait plus aucun signe de la maladie. Depuis 1982, on constate une réapparition du parasite en particulier chez les huîtres du gisement naturel du Grazu (partie aval de la rivière).

Remarque

Il a été démontré que le naissain contractait la maladie le plus souvent seulement l'année suivant celle de sa fixation. Cette explication permet donc de comprendre les très faibles pourcentages pour les lots du naissain.

La valeur obtenue pour la classe de 2-3 ans en 1978 est faible par rapport aux autres années, elle peut être due :

- soit au transfert durant l'année d'huîtres plates provenant des secteurs contaminés,
- soit d'un échantillon insuffisant pour le secteur considéré.

1.5 Aspect actuel de la parasitose due à Marteilia refringens dans les différents secteurs de Bretagne

Après une période de deux ans, où l'on ne rencontrait presque plus d'huîtres parasitées par Marteilia refringens, il semblerait que ce parasite de l'huître plate infesterait à nouveau certains secteurs ostréicoles bretons.

La fig. 6 représente les différentes zones qui sont actuellement parasitées.

Ce parasite de l'huître plate est recherché sur différents lots. Il est mis en évidence sur des coupes histologiques de la glande digestive.

La planche (2) regroupe différentes coupes de glande digestive infestée par Marteilia refringens (Microscopie photonique).

année age	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982
naissain				0,72		1,22	1,11	0,48	0,71
18 mois	14,46	29,22	49,11	41,61	40,61	31,35	20,10	35,55	34,56
2 ans	14,10	48,56	41,40	41,72	30,74	40,08	48,24	62,23	49,72
2/3 ans	6,62	52,78	69,00	29,84	8,84	42,42	33,33	30,43	66,82
tous les ages	10,17	41,10	31,76	31,93	31,20	37,04	28,90	18,10	38,60

Fig5 . % d'huîtres parasitées par *Marteilia refringens* dans le secteur du Golfe - Penerf - Penvins

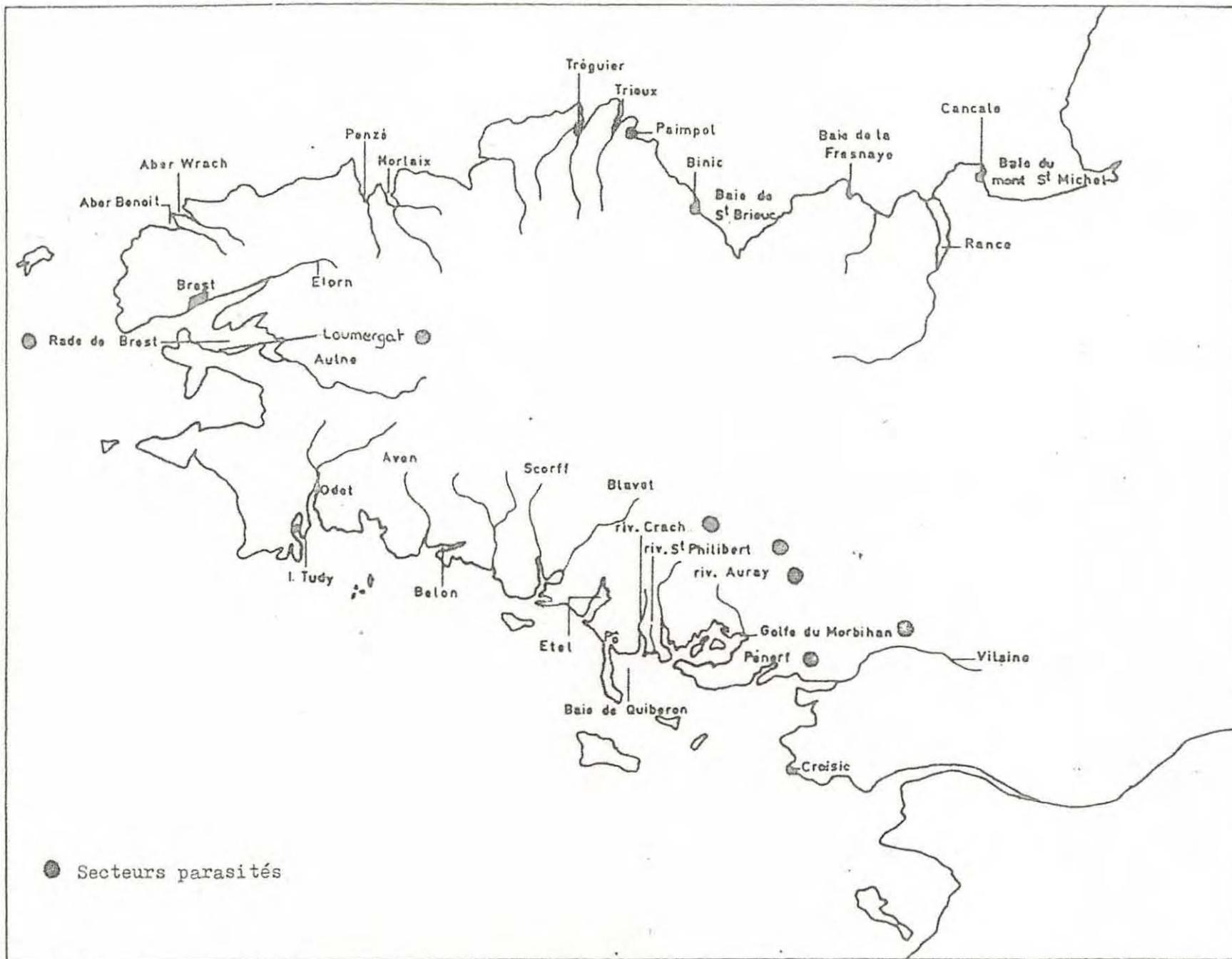


Fig.6 : Différents secteurs parasités par *Martellia refringens* en 1982

II) Maladie hémocytaire de l'huître plate, *Ostrea edulis* due au parasite *Bonamia ostreae*

A la suite de mortalités anormales de l'huître plate, on a mis en évidence une épizootie nouvelle qui fut observée pour la première fois sur certains parcs de l'île Tudy en Bretagne au mois de Juin 1979 (Comps et coll., 1980). Elle fut dénommée maladie due à *Bonamia ostreae*. Ce parasite provoquant parfois des lésions branchiales se caractérise par des cellules de 2 à 3 μ de diamètre. Il est essentiellement localisé dans le tissu conjonctif et des épithélia branchiaux et digestifs. Il présente des formes libres et des formes intracellulaires (cf. planche 4).

II.1 Symptômes de la maladie

Les huîtres atteintes par la maladie restent très souvent entre-ouvertes mais la caractéristique essentielle de la maladie se situe au niveau des branchies. On observe une ulcération des branchies entraînant l'apparition de perforations et d'indentations du feuillet branchial (Fig. 7, d'après Tigé et al., 1980). On remarque à la périphérie de ces lésions la présence de bourrelets jaunâtres clairs (planche 1) (critère qui n'est pas absolu).

Remarque

Lorsqu'une huître plate infestée par *Bonamia ostreae* est morte, elle peut présenter plusieurs signes cliniques :

- entrebaillement des deux valves dû à une distension du muscle adducteur
- diminution du liquide intervalvaire
- rétraction du manteau

II.2 Description du parasite

Grâce à la microscopie électronique, deux types de "cellules parasitées" ont été mises en évidence (Pichot et coll., 1981).

- les "formes denses" de 2 à 3 μ . Ces cellules sont caractérisées par un noyau, une ou deux mitochondries, un cytoplasme opaque comportant des particules structurées denses aux électrons (cf. Photo 1).

- les "formes claires" (cf. Photo 2) dont la taille varie de 2,4 à 4 μ sont le plus souvent parasphériques. Ces cellules, peu basophiles, présentent des différences structurales avec les cellules denses.

L'infestation du tissu par le parasite est caractérisée par une dégradation de celui-ci.

Parmi ces hémocytes, certains peuvent contenir plusieurs cellules de Bonamia ostreae (2 à 6 μ , voir plus) (Planche 4).

Ces cellules sont essentiellement concentrées au niveau des perforations et indentations branchiales. A la périphérie des lésions on peut remarquer une forte concentration de cellules sanguines qui serait due à une réaction de défense vis à vis de la parasitose. On constate par ailleurs un gonflement des filaments branchiaux dont l'épithélium est distendu et parfois rompu dans les parties les plus altérées.

11.3 Cycle d'évolution du parasite

Actuellement, il n'a pas été encore trouvé, le mode de pénétration du parasite dans l'huître.

Cependant, deux types de pénétration semblent être envisageables :

- d'une part, par voie branchiale épithélia branchiaux
- ou bien, par voie digestive bouche épithélia digestifs

L'étude en microscopie électronique a permis d'observer à l'intérieur de la cellule hôte différents stades de division cellulaire correspondant à un mode de multiplication du parasite.

Des formes plasmodiales à 2, 3, 4 ou 5 noyaux ont été observées dans les cellules infestées.

Ces plasmodes plurinuclées chez Bonamia ostreae permettraient d'expliquer le développement explosif du parasite précédant la mort du mollusque.

Il semblerait que pour le cycle de développement chez l'huître, les "formes claires" représenteraient les formes végétatives et les "formes denses" "les formes de résistance".

Les similitudes avec les modalités de division, permettent de supposer que ce parasite se rapprocherait du groupe des Haplosporidies et du groupe des Marteillias (Perkins).

Photo 1 : Noyau de la cellule hôte (nh), noyau du parasite (n)
 mitochondrie (mi)
 particules denses structurées (pds)

Suivant le plan de section, on observe un corps très dense,
 sans structure apparente (cd).

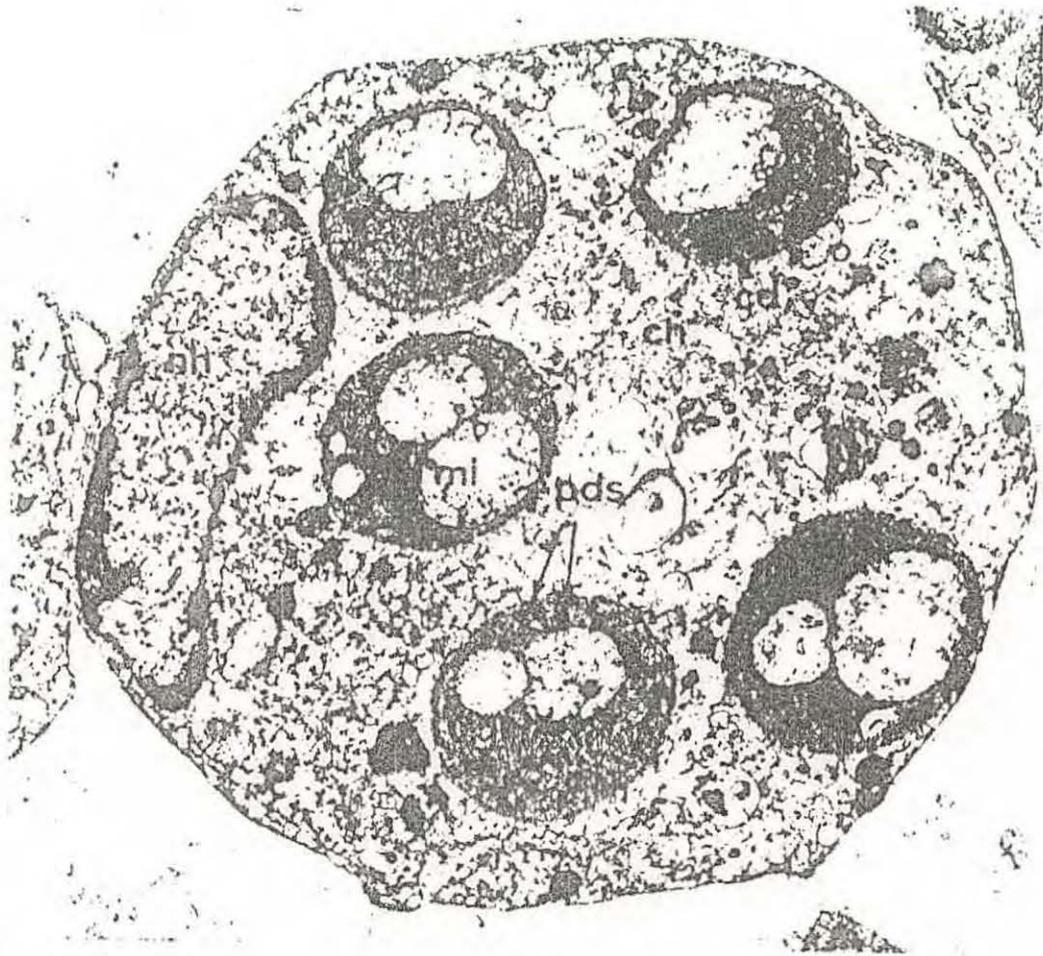


Photo 1 : Cellule infectée renfermant des "formes denses"
du parasite

Microscopie électronique G X 12 400

Photo : Cellule hôte (ch)

Noyau (n) comportant un nucléoplasme formé de petits amas granuleux denses répartis dans un espace clair

Mitochondrie (mi) avec des replis membranaires internes (crêtes)

Dans le cytoplasme présence de particules denses structurées (pds), de vésicules (v), de saccules (s).

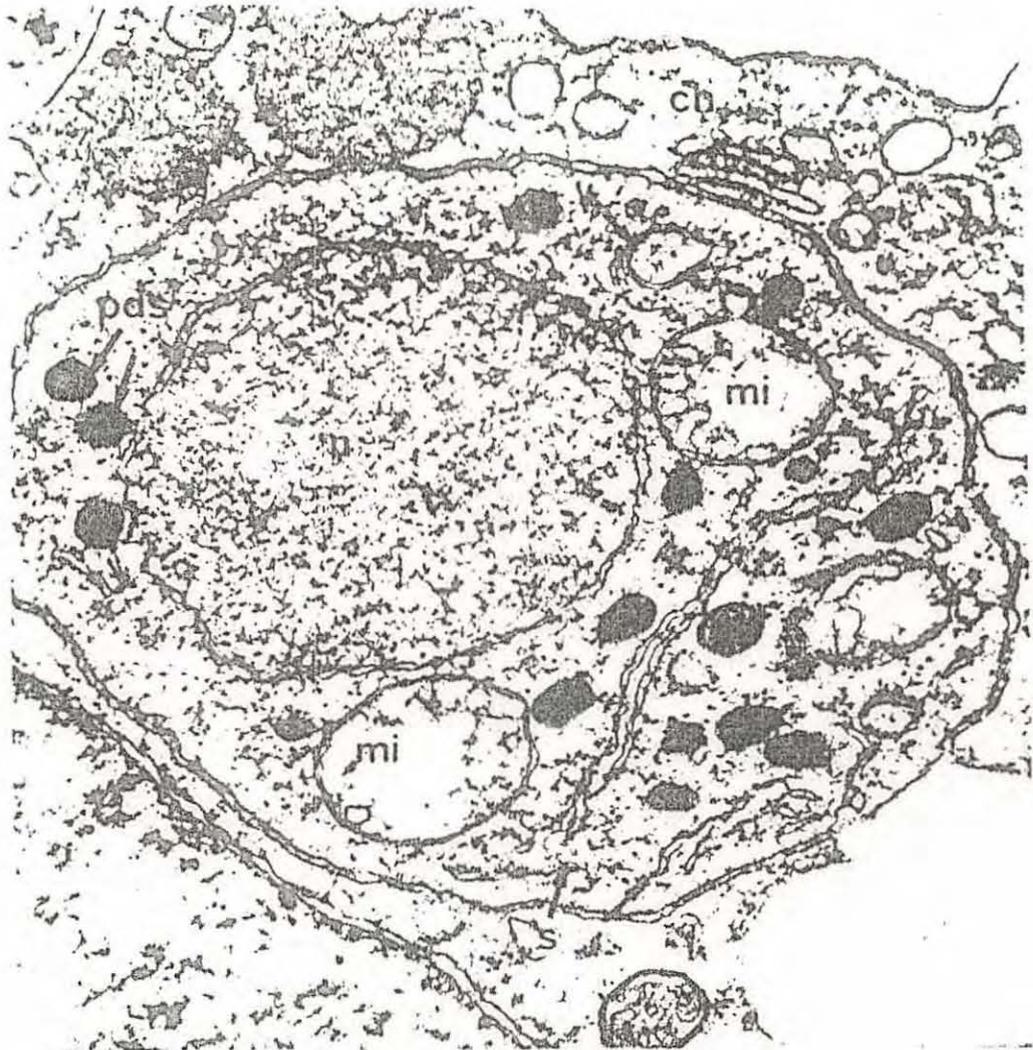
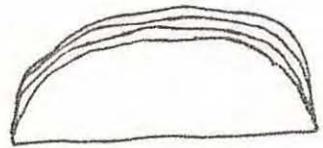
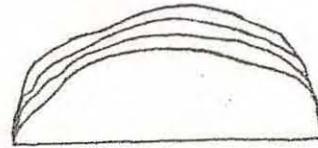


Photo 2 : Forme de "cellule claire"

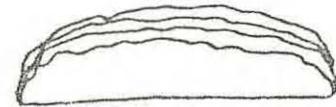
Microscopie électronique G X 47 200



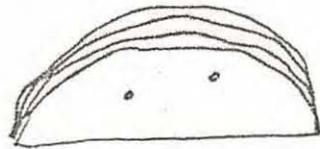
Branchies normales



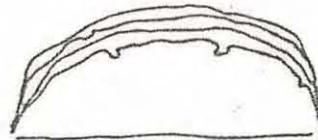
Branchies normales



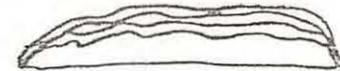
4



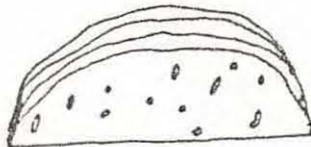
1



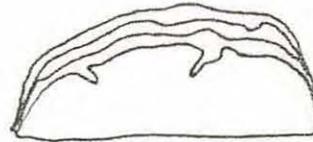
1



5

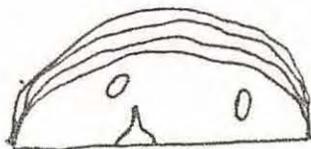


2



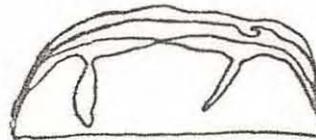
2

Différents types d'indentation



3

Différents types de perforation



3

Fig. 7 : Différents stades de lésions branchiales associées à la parasitose due à Bonamia ostreae

Toutefois, les différences avec ces divers genres ne permettent pas d'inclure Bonamia ostreae dans un groupe précis.

11.4 Situation épidémiologique

Depuis son apparition en 1979 à l'Ile Tudy (Bretagne), la parasitose s'est étendue progressivement dans les divers secteurs ostréicoles de la Bretagne Sud et Bretagne Nord (cf. Fig. 8).

Certains secteurs, indemnes de parasites en 1981, sont actuellement infestés.

11.5 Etude de l'évolution de la parasitose dans le secteur de la baie de Kerdélan (Golfe du Morbihan)

Depuis l'apparition du parasite dans ce secteur, des lots suivis d'huîtres captées naturellement sur parc ont été examinés à l'Institut.

Le tableau 9 regroupe les résultats qui concernent le nombre d'huîtres parasitées par les deux épizooties.

De ces différentes valeurs, on a calculé les pourcentages d'huîtres parasitées pour chaque mois (de Juin 1981 au mois de Février 1983).

Légende de la figure 10

- huîtres de 2-3 ans parasitées par Marteilia refringens
- huîtres de 18 mois parasitées par Marteilia refringens
- ▲—▲ huîtres de 2-3 ans parasitées par Bonamia ostreae
- ▲---▲ huîtres de 18 mois parasitées par Bonamia ostreae

Interprétation des courbes obtenues

D'une façon générale, les huîtres âgées de 2-3 ans sembleraient au cours d'une année plus parasitées que celles de 18 mois.

Contrairement à Marteilia refringens, l'infestation des huîtres plates

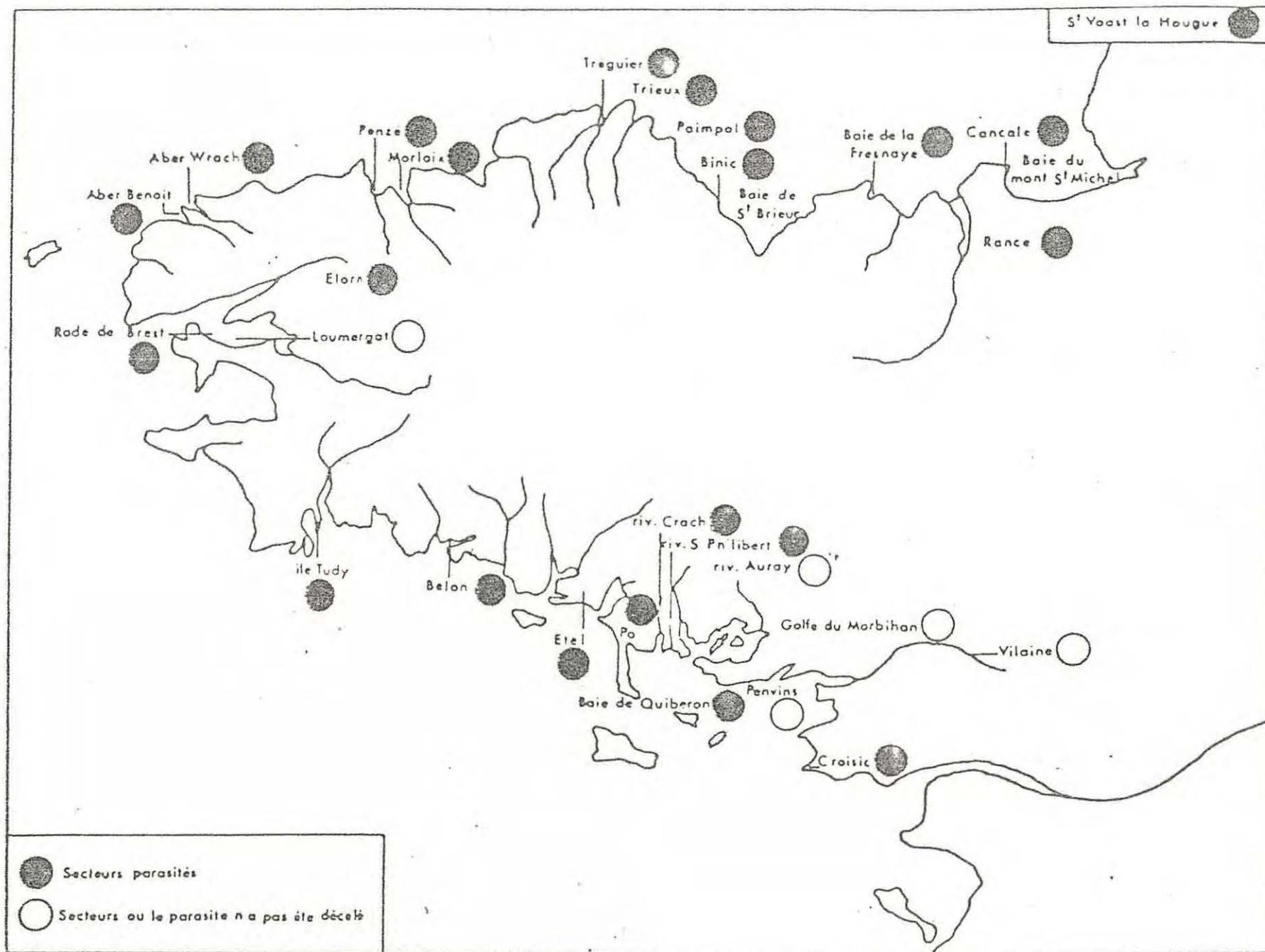


Fig. 8 : Répartition des secteurs parasités par *Monaxia ostreae* en Juillet 1981.

date	10/6/81	10/6/81	24/7/81	21/1/82	11/2/82	16/4/82	18/5/82	10/6/82
Marteitia refringens	0/50	19/34	7/25	4/30	3/30	12/30	14/30	16/29
Bonamia ostreae	0/50	0/34	0/25	0/30	4/30	2/30	6/30	1/29
date	5/7/82	11/8/82	2/9/82	12/10/82	12/11/82	9/12/82	13/1/83	9/2/83
Marteilia refringens	15/30	16/30	22/30	24/30	4/5	22/34	14/30	16/33
Bonamia ostreae	2/30	2/30	1/30	2/30	2/5	1/34	6/30	3/33

Nombres d'huîtres naturelles, parasitées, provenant de la baie de Kerdelan

Age: 2/3 ans

date	21/1/82	11/2/82	16/4/82	18/5/82	10/6/82	5/1/82	11/8/82	2/9/82
Marteilia refringens	7/30	4/24	9/30	13/30	13/30	12/30	13/30	22/30
Bonamia ostreae	1/30	1/24	2/30	1/30	2/30	1/30	1/30	1/30
date	12/10/82	12/11/82	9/12/82	13/1/83	9/2/83			
Marteilia refringens	13/30	23/31	23/35	14/30	22/42			
Bonamia ostreae	1/30	4/31	0/35	1/30	1/42			

Tableau 9 : Nombres d'huîtres naturelles, parasitées, provenant de la baie de Kerdelan

Age: 18 mois

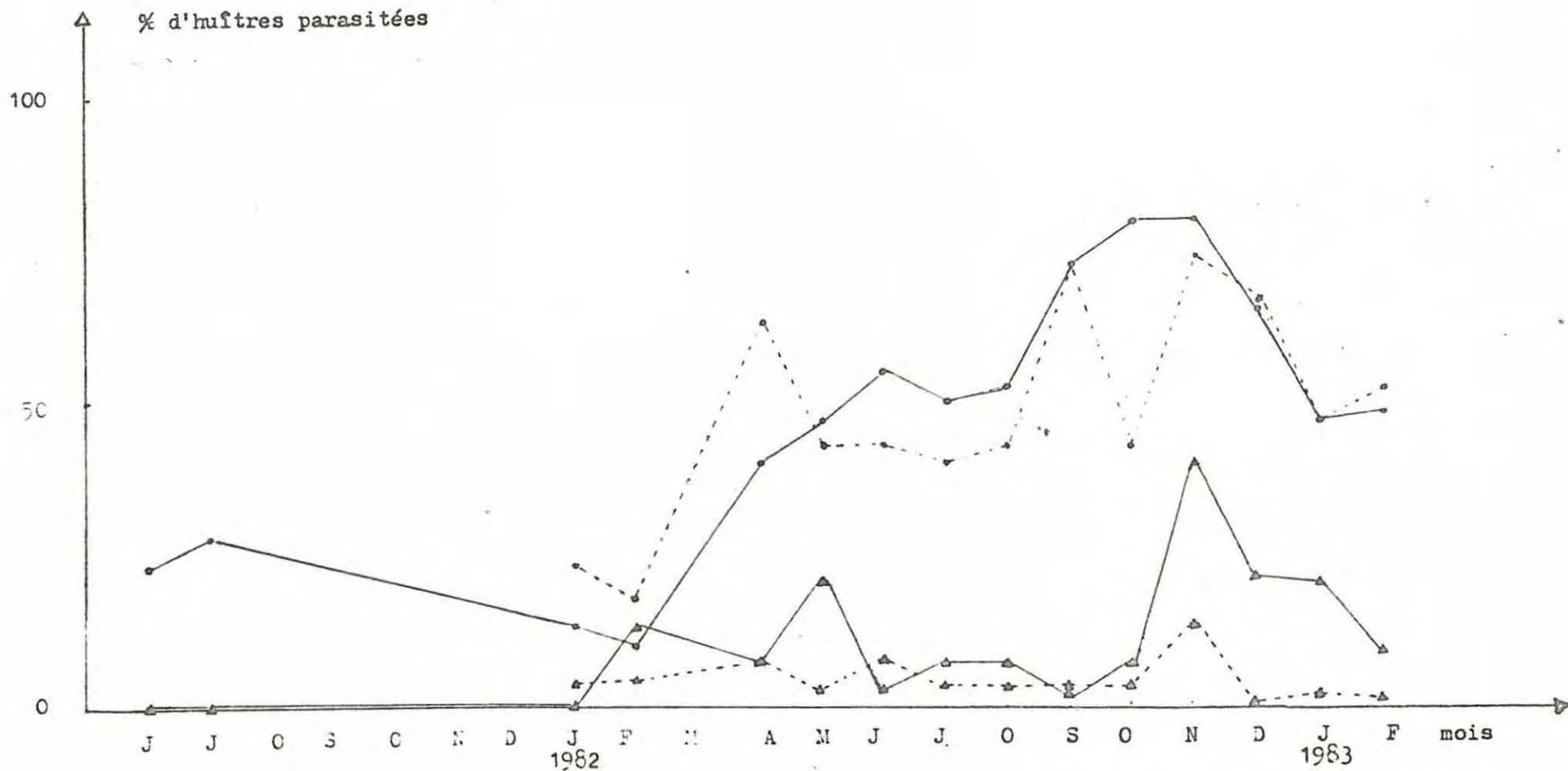


Fig. 10 Courbes représentant les différentes parasitoses dues à *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*
 huîtres naturelles provenant de la baie de Kerdelan

par Bonamia ostreae se produirait pendant toute l'année ; en fin de période estivale (Août, Septembre, Octobre), elle peut être plus importante étant donné les conditions du milieu à cette période (température de l'eau, ...).

Certaines hypothèses pourraient être envisagées pour la réapparition de Marteilia refringens :

- l'affaiblissement des huîtres atteintes par une seconde épizootie
- à une action cyclique de ce parasite due à une perte de virulence de celui-ci pendant quelques années (1977-1980).

Chapitre : DESCRIPTION DES DIFFERENTES PARTIES DES METHODES
HISTOLOGIQUES

- Fixation
- Déshydratation
- Imprégnation par la paraffine liquide
- Inclusion
- Confection des coupes au microtome
- Déparaffinage et coloration
- Lectures au microscope

A) Méthodes d'inclusion

I) Inclusion à la paraffine

I.1 Fixation

Définition : c'est un phénomène chimique qui correspond au temps nécessaire à la précipitation ou à l'insolubilisation des constituants cellulaires.

On utilise pour cette opération le liquide de Bouin comme fixateur, sa composition étant :

- 600 ml d'acide picrique
- 160 ml de Formol
- 40 ml d'acide acétique

La durée de fixation des pièces à inclure est de 24 à 48 heures.

Ce traitement a pour but de consolider le substrat morphologique et d'assurer le mordantage.

Le liquide de Bouin est un fixateur très largement utilisé. Il pénètre assez bien pour que les pièces puissent être relativement épaisses.

Ses différents constituants ont pour effet :

L'acide picrique

- précipite les protéines en formant des picrates de protéines,
- contracte fortement sans durcir,
- dépolymérise les acides nucléiques

Le Formol

- réducteur,
- ne précipite pas les protéines, mais leur ajoute des atomes,
- fixe les lipides complexes, donc les mitochondries et l'appareil de Golgi,
- ne contracte pas, mais durcit fortement

L'acide acétique (optimum de concentration, 0, 3 à 5 %)

- ne fixe pas les protéines du cytoplasme, mais précipite celles du noyau : c'est un bon fixateur des chromosomes,
- détruit le chondriome,
- gonfle les tissus et ne les durcit pas

Ce fixateur détruit donc le chondriome, l'appareil de Golgi, les lipides. La chromaline est conservée, mais les réactions nucléales sont très difficiles à ce type de traitement.

* Les coupes, de glande digestive ou de branchie, sont placées dans des piluliers en verre, dans lesquels on place une étiquette avec le numéro du lot d'huîtres.

Les pièces sont ainsi déposées dans le fixateur qui ne sera utilisé qu'une seule fois.

Une étiquette est collée à l'extérieur du récipient pour indiquer la date d'arrivée et la provenance du lot.

(On peut effectuer 2 fixations).

1.2 Déshydratation

Elle s'effectue par une succession de bains d'alcool éthylique dont le titre croît :

- alcool 70 ° pendant $\frac{1}{2}$ heure
- alcool 80 ° pendant $\frac{1}{2}$ heure
- alcool 90 ° pendant $\frac{1}{2}$ heure
- alcool 95 ° pendant $\frac{1}{2}$ heure
- alcool 100 ° pendant 1 heure
- alcool 100 ° pendant 1 heure
- alcool butylique pendant 1 heure
- alcool butylique pendant 1 heure

Traitement au Benzène (liquide intermédiaire)

Il dure 10 minutes, il permet une meilleure pénétration de la paraffine dans les pièces il est miscible à l'alcool et à la paraffine.

1.3 Inclusion

On essore, par la suite, les pièces à inclure sur papier Joseph. L'imprégnation des pièces s'effectue par des bains de paraffine durant une nuit. Cette imprégnation se fait à chaud, à une température légèrement supérieure (63°) à celle du point de fusion de la paraffine (59 - 60° C). Elle sera d'autant plus courte si le solvant intermédiaire est très volatil.

Après l'imprégnation à chaud, les pièces sont mises dans des moules spéciaux appelés "barres de Leuckart" posés sur des plaques de métal.

Le système permet d'obtenir des blocs de dimensions très variées à partir d'un seul jeu de barres.

La paraffine est versée dans le moule, au bout de quelques secondes la pièce est placée de telle façon à avoir la glande digestive ou l'indentation de branchie en vis à vis avec la plaque.

A l'aide d'une pince, on élimine par légère pression sur la pièce les éventuelles bulles d'air qui se trouvent entre celle-ci et la plaque.

On place une étiquette.

Après quelques minutes, on refroidit les blocs dans un cristalliseur d'eau froide.

Remarque : La paraffine utilisée, se dénomme cytoparaffine, elle est très plastique et pénètre bien dans les tissus.

1.4 Coupes à la paraffine

On taille le bloc de façon à donner à la surface de coupe la forme d'un trapèze rectangle dont au moins deux côtes sont parallèles.

On fixe le bloc, taillé au préalable, sur le porte-objet. Il est orienté ainsi que le rasoir de façon à obtenir des coupes en série.

On prépare les lames de verre, en gravant sur un angle de celle-ci avec un stylo, les caractéristiques de la pièce (date d'arrivée et numéro du lot).

On dépose sur les lames quelques gouttes d'eau distillée que l'on étale.

On place la coupe de 7μ obtenue à la surface de l'eau, ce qui a pour effet de l'étaler. L'ensemble est ensuite mis sur une platine chauffante, alors le dépliement de la coupe et de la paraffine se fait.

On égoutte, ensuite, l'eau distillée.

Lorsque l'étalement est achevé, les lames parfaitement refroidies sont essorées sur un coussinet de papier Joseph (ceci améliore le collage).

Les lames sont placées sur une planchette de Vigier pour sécher à l'étuve à paraffine.

1.5 Déparaffinage sans collodionnage

Le déparaffinage a pour but de retirer le milieu d'inclusion. On traite tout d'abord la coupe avec deux bains de Toluène de 10 minutes chacun et d'un bain de Xylène de 10 minutes. Pour une bonne dissolution de la paraffine, on place au préalable les lames sur une platine chauffante.

(Les lames sont déposées dans une batterie de borrels pour déparaffinage et coloration).

On élimine le solvant en traitant les lames par l'alcool éthylique à 100 °. On passe, ensuite, les lames dans l'alcool à 95 ° dans une cuve.

L'hydratation s'effectue dans de l'eau courante pendant 10 minutes.

1.6 Différents types de coloration

Coloration de Prenant : Variante de Gabe

Cette méthode permet de différencier les noyaux, les cytoplasmes, les sécrétions, le tissu conjonctif et ses dérivés.

Cette coloration est celle employée essentiellement pour localiser et observer les parasites sur coupe histologique.

Réactifs :

- Hématoxyline de Groat (68)
- Eosine-vert lumière (57)
- Solution aqueuse à 0,5 % d'acide acétique

Mode opératoire :

- 1°) Déparaffiner, (collodionner), hydrater
- 2°) Colorer par l'hématoxyline pendant 2 à 5 minutes
- 3°) Laver à l'eau courante pendant 5 minutes
- 4°) Colorer par le mélange d'éosine vert lumière, pendant 5 à 10 minutes
- 5°) Rincer rapidement ou mettre en attente dans l'eau acétique (rinçage rapide dans l'eau)
- 6°) Deshydrater dans 2 bains d'alcool à 100 ° et dans 1 bain de Xylène
- 7°) Monter à la résine

Résultats

Les noyaux et les cytoplasmes basophiles sont colorés en brun-noir, le collagène est vert. Les cytoplasmes, les nucléoles et les sécrétions érythrophiles sont roses, les cytoplasmes et les sécrétions cyanophiles sont verts.

Coloration à l'azocarmin - aniline ou azan

Cette méthode met en évidence une grande diversité de structures histologiques. Les images nucléaires sont extrêmement fines, la coloration du conjonctif excellente.

Elle permet de distinguer de nombreuses catégories cellulaires dans les tissus complexes.

Cette coloration est employée lorsque une lame est intéressante, on redébite le bloc pour mettre en évidence certains organites (haplosporidies).

Azan de Heidenhain

Réactifs :

- Azocarmin G (42)
- Bleu de Heidenhain dilué (45)

- Solution d'acide acétique à 1 % dans l'alcool à 95 °
- Solution aqueuse à 5 % d'acide phosphotungstique

Mode opératoire :

- 1°) Déparaffiner, collodionner, hydrater
- 2°) Quand les coupes proviennent de matériel fixé par un mélange renfermant de l'acide picrique, éliminer celui-ci par un séjour de 30 minutes dans l'alcool aniliné, laver à l'eau distillée
- 3°) Colorer pendant 1 heure à 60 ° C dans la solution d'azocarmin préalablement portée à 60 ° C
- 4°) Sans laisser refroidir, laver à l'eau distillée
- 5°) Différencier, sous le contrôle du microscope, par l'alcool aniliné jusqu'à coloration nucléaire presque pure. La vitesse de différenciation est proportionnelle à la teneur en aniline et à la teneur en eau de l'alcool
- 6°) Arrêter la différenciation par un rinçage de 30 secondes à l'alcool acétique. Le séjour des coupes peut y être prolongé
- 7°) Laver à l'eau distillée
- 8°) Traiter par l'acide phosphotungstique pendant $\frac{1}{2}$ d'heure à 1 heure

Ce mordantage prépare la coloration par le bleu de Heidenhain, mais, en outre, continue à différencier l'azocarmin. Donc, la différenciation par l'alcool aniliné sera d'autant moins poussée que le temps de mordantage choisi sera plus long

- 9°) Laver à l'eau distillée
- 10°) Colorer par le bleu de Heidenhain pendant $\frac{1}{2}$ heure à 2 heures
- 11°) Suivant le résultat désiré, éliminer du bleu en traitant par l'alcool à 95 ° ou déshydrater directement par l'alcool absolu

Résultats

Les noyaux et certains cytoplasmes sont rouges. D'autres cytoplasmes sont jaunes ou gris. Le collagène est bleu. Les sécrétions, selon leur nature, peuvent avoir une affinité pour un ou plusieurs des colorants du mélange. En général les mucopolysaccharides acides sont bleus.

Chapitre : CULTURE D'ALGUES

- *Dunaliella tertiolecta* butcher

- *Tetraselmis suecica* kylin

Les mollusques lamellibranches (larves ou adultes) s'alimentent par filtration d'animaux, d'algues ou de particules organiques.

Ils sont microphages et se nourrissent de particules en suspension dans l'eau de mer ("suspension feeders") ou déposées depuis peu de temps à la surface du substrat ("deposit feeders").

L'eau pénètre dans la cavité palléale et vient au contact des branchies. Les particules sont triées par les filaments branchiaux qui retiennent certaines dimensions particulières et rejettent les autres qui formeront les pseudo-fécès. Les particules retenues sont prises en charge par les tractus aliaires des filaments branchiaux et acheminées par des sillons jusqu'aux palpes labiaux, puis vers la bouche.

L'alimentation des huîtres en bac est constituée par la culture de 2 types d'algues, soit :

P₂ - *Dunaliella tertiolecta* butcher

B₁ - *Tetraselmis suecica* Kylin

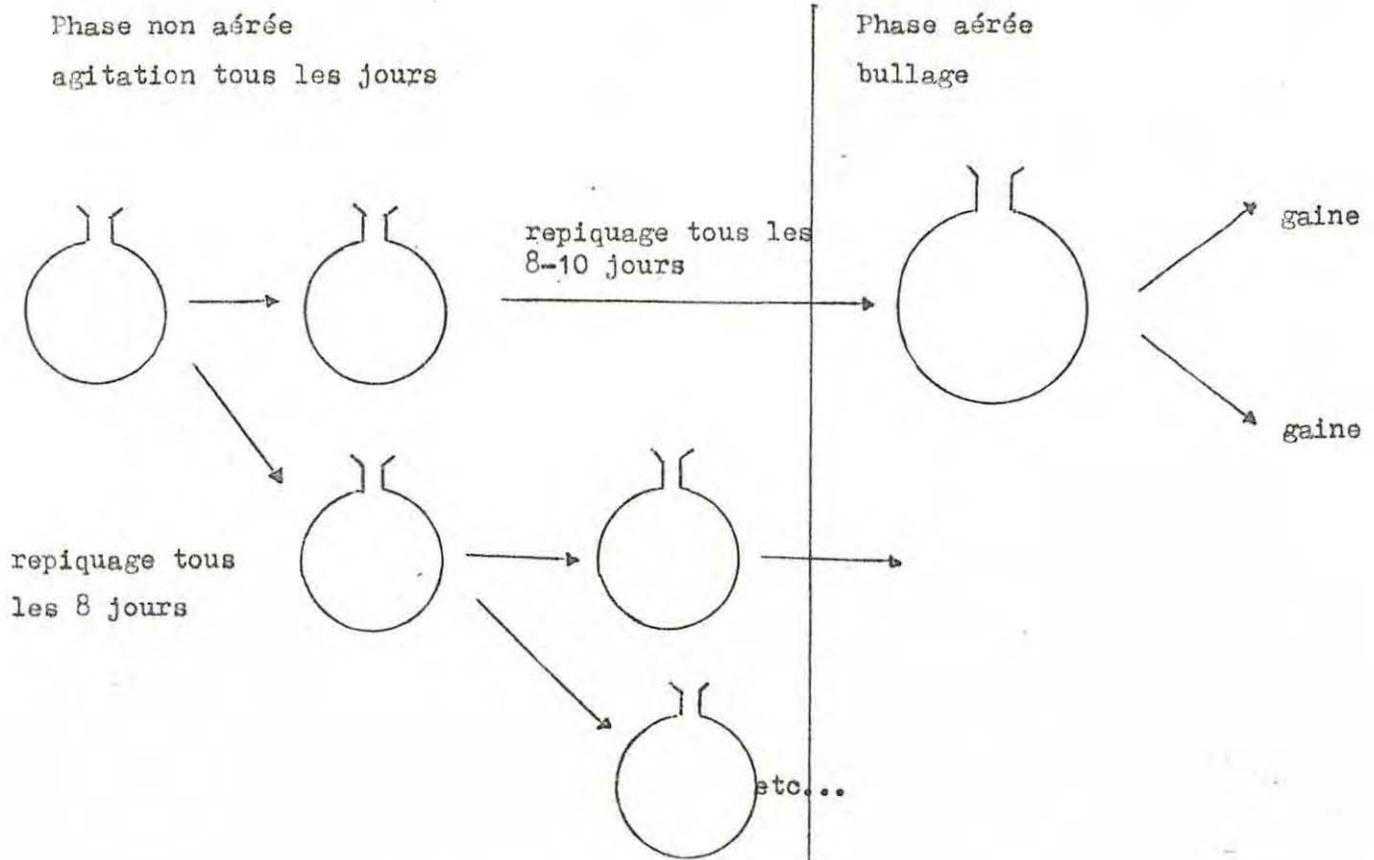
On utilise le milieu de Provasoli ESP stérile comme milieu nutritif pour ces algues.

- 1 ballon de 1 litre ou de 500 ml pour chaque espèce que l'on remplit de 600 ml ou de 300 ml d'eau de mer filtrée

- 1 ballon de 10 litres pour chaque espèce que l'on remplit de 6 l d'eau de mer filtrée

Les ballons sont remplis au 3/4 d'eau de mer filtrée, bouchés par du coton cardé et du papier d'aluminium, ils sont autoclavés 30 minutes à 120° C.

Principe



ajouté à l'eau de mer filtrée à raison de 2 ml/1 d'eau.

Milieu ES de Provasoli adapté

Le milieu original est concentré 10 fois ; de cette façon, il suffit d'ajouter 2 ml de solution définitive (sol III) par litre d'eau de mer.

De plus, un enrichissement en silice a été effectué au niveau de la solution III.

L'eau de mer enrichie ainsi obtenue par addition de cette solution III est autoclavée à 120° C pendant 30 mn pour les volumes importants (25 l) et 10 mn pour les faibles volumes (250 à 1 000 ml).

Après autoclavage de l'eau de mer enrichie, il peut se former un léger précipité signalé par de nombreux auteurs (Provasoli et Mac Laughlin, 1957 ; Berland, 1966). De plus, le liquide prend une coloration jaunâtre.

Le milieu comporte la préparation de 3 solutions composées comme suit :

Solution I

-37-

Ammonium-fer-sulfate $\text{Fe} (\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2, 6 \text{H}_2 \text{O}$	35,1 g
Ethylène diamine tetraacetic $\text{Na}_2 \text{EDTA}$	33,0 g
H_2O qsp	5 l

Solution II

Acide borique H_3BO_3	57,0 g
Fer chlorure $\text{Fe} \text{Cl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$	2,45 g
Sulfate de manganese II $\text{Mn} \text{SO}_4, \text{H}_2\text{O}$	8,2 g
Sulfate de zing $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	1,1 g
Sulfate de cobalt II $\text{Co} \text{SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,24 g
Ethylène diamine Tetraacetic $\text{Na}_2 \text{EDTA}$	50,0 g
H_2O qsp	5 l

Solution III

$\text{Na} \text{NO}_3$	700,0 G
Na_2 glycenophosphate	100,0 g
Solution I	5 l
Solution II	5 l
Vitamine B_{12}	0,02 g
Thiamine	1,0 g
Biotine	0,01 g
TRIS	1 000 g
H_2O qsp	20 l

On ajuste à pH : 7 ou 8 avec HCl fumant. C'est la solution III qui sert à enrichir l'eau de mer (2 ml de solution par litre d'eau de mer).

DEUXIEME PARTIE

Recherche d'une méthode de
diagnostic

Essais d'infestation

Incidence de l'ozone sur le
parasite Bonamia ostreae

-dosage de l'ozone dans
l'eau de mer

-essais d'infestation par
du parasite traité à l'ozone

A) - Recherche d'une méthode de diagnostic

Des recherches sur le parasite, Bonamia ostreae, deux méthodes de diagnostic ont été comparées pour connaître laquelle était la plus performante. Il s'agit de :

- empreintes de filaments branchiaux colorées au May Grunwald Giemsa
- coupes histologiques des glandes digestives correspondantes

La comparaison des résultats obtenus sur différents lots d'huîtres plates parasitées, a permis de mettre en évidence les avantages que présente la technique d'empreintes de tissu branchial pour la recherche du parasite, Bonamia ostreae.

D'une part, cette méthode permet :

- un dépistage des stades de début d'infestation du parasite qui peut être dû :
 - . à l'observation d'un plus grand nombre d'hémocytes recueillis sur la lame
 - . à un meilleur étalement des cellules mettant en évidence leurs structures (le parasite d'une taille de 2 à 3 μ est plus difficilement décelé sur des coupes de 7 μ d'épaisseur)
- une lecture rapide
(pour la méthode des coupes, il faut compter plusieurs jours, par contre il faut dix minutes pour faire un frottis)
- la vérification des observations faites sur la présence de lésions branchiales comme indicateur de la parasitose (TIGÉ et coll., 1980)

De ces deux méthodes, celle qui a été retenue pour les recherches du parasite est la coloration d'empreintes de filaments branchiaux. Elle permet un diagnostic rapide.

Remarque

Des observations ont permis de mettre en évidence une relation entre le degré d'infestation et l'importance des lésions branchiales (indentations, perforations).

B) - Essais d'infestation

Plusieurs types d'expériences ont été réalisés pour les essais d'infestation.

. La première méthode employée fut la proximité (proximity method). Des huîtres saines et parasitées sont placées dans un même bac d'élevage.

Les premiers résultats d'infestation sont obtenus au bout de trois mois à 17°C (20 % des huîtres se sont parasitées).

La contamination se fait donc d'huître à huître par passage du parasite dans l'eau.

. Une autre méthode consiste à placer des huîtres plates parasitées dans des bacs pendant un certain temps, puis elles sont retirées pour être remplacées par des huîtres saines.

Dans ce cas, la réponse est très faible (1 huître sur 500), ce qui pourrait être dû :

- soit à la perte de virulence du parasite dans l'eau de mer,
- soit à une concentration trop faible de Bonamia ostreae dans l'eau

. La troisième méthode pour les essais d'infestation est celle qui consiste à injecter un culot de parasite dans des huîtres saines.

(Méthode employée pour l'étude de l'incidence de l'ozone sur Bonamia ostreae).

Des infestations ont pu être obtenues en 15 jours, mais en général elles apparaissent au bout de un mois et demi à deux mois (l'influence de la température n'a pas été mise en évidence).

Lorsqu'il y a réponse à une injection, 20 à 50 % des huîtres présentent une contamination.

C'est donc cette méthode qui est utilisée en laboratoire pour les essais de traitement du parasite Bonamia ostreae.

Incidence de l'ozone sur le parasite Bonamia ostreae

Plusieurs types de traitement de l'eau de mer sont testés au laboratoire de recherche afin de connaître leur action sur le parasite, Bonamia ostreae.

Cette étude a pour but de déterminer les "doses" minimales actives à employer pour le traitement des effluents, de bassins de stockage d'huîtres plates et de coquillages.

c) Rappels sur l'ozonation de l'eau de mer

Face aux problèmes engendrés par la pollution des eaux du littoral, des techniques de traitement ont été envisagées pour éliminer les germes ou parasites indésirables.

Les coquillages contaminés ne pouvant être commercialisés, des stations d'épuration ont été créées en France pour permettre la continuité de certaines cultures.

Le principe de cette technique, est de placer les coquillages, mollusques filtreurs contaminés dans des bassins remplis d'eau rendue stérile. La durée de séjour de ces coquillages dépend du type de produit utilisé pour la désinfection de l'eau (chlore, ozone...).

L'un de ces traitements, l'ozonation, a tendance à se développer, vu ses avantages.

- Les coquillages traités à l'ozone paraissent avoir une vitalité plus grande que ceux épurés en eau préalablement chlorée.

- L'ozonation ne modifie pas le bon état physiologique des coquillages soumis à l'épuration.

- Elle est sans effet sur le plancton marin.

- La rapidité d'épuration en cas de forte pollution est plus grande que celle par le procédé chloré.

- Elle n'entraîne la formation d'aucune substance nocive pour les coquillages.

- Elle n'entraîne aucune altération de la saveur des coquillages.

Ce type de traitement comportant de nombreux avantages, il a été envisagé de traiter les huîtres plates parasitées par Bonamia ostreae.

I Législation pour l'application pratique de ce traitement

Il est dit dans l'article 16 du décret du 31 Juillet 1923 sur la salubrité des huîtres et autres coquillages, que les coquillages contaminés doivent être saisis ou détruits. Ils ne peuvent être livrés à la consommation qu'après un séjour d'un mois dans un parc ou un établissement reconnu salubre.

L'article 14 du même décret, décrit la possibilité d'un entreposage pour une durée de 24 à 48 heures dans une "station d'épuration" avec des bassins de quarantaine qui seraient alimentés par l'eau de mer ozonée. Elle assurerait l'épuration rapide de ces coquillages.

Ces stations pourraient délivrer, après traitement, le certificat de salubrité ou étiquette sanitaire.

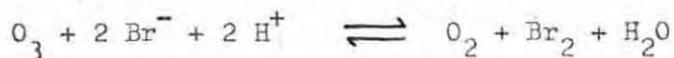
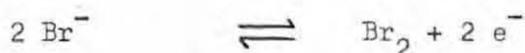
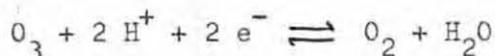
L'article 3 du décret du 12 Juin 1969 prévoit la liste de ces établissements d'épuration.

L'arrêté du 6 Janvier 1977 décrit dans l'article 12 l'étiquette de salubrité à utiliser dans ce cas.

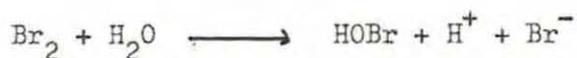
11 Description des différentes réactions chimiques entre l'ozone et quelques éléments de l'eau de mer

. Avec les bromures

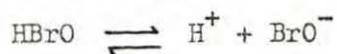
L'ozone étant un oxydant puissant, il va permettre la libération du brome des bromures selon les réactions suivantes :



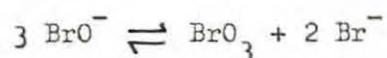
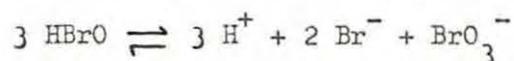
Le brome s'hydrolyse dans l'eau



L'acide hypobromeux se dissocie selon la réaction :

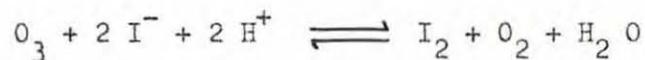
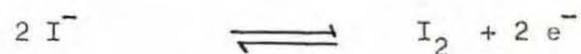
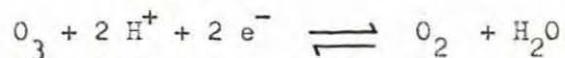


La formation de bromates peut s'effectuer

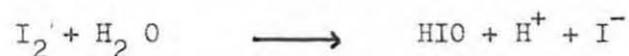


Donc, après ozonation des bromures de l'eau de mer, on obtient la formation de brome, d'acide hypobromeux et de bromates.

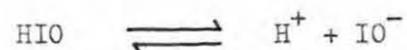
. Avec les iodures



L'iode s'hydrolyse comme le brome dans l'eau



L'acide hypoiodique formé se dissout



Donc, après ozonation, on pourrait constater la formation éventuelle d'iodure, d'acide hypoiodique et d'iodate mais étant donné la faible concentration en iodures dans l'eau de mer (0,06 mg/l environ), la libération d'iode peut être considérée comme négligeable après ozonation.

. Avec les chlorures

La proximité des potentiels d'oxydo réduction rejette toute possibilité de déplacer le chlore des chlorures par ozonation de l'eau de mer.

L'ozone n'agit pratiquement pas sur les ions chlorures, iodures, par contre son action sur les ions bromures est importante.

L'ozonation de l'eau de mer donne donc surtout naissance à des composés bromés, mais ne permet pas la formation d'ozone résiduel ; ce sont les composés bromés qui vont agir. On dose un résiduel d'oxydants totaux.

Remarque

Plus la concentration en ions bromures augmente, plus le résiduel oxydant formé sera important.

III Principe de fonctionnement de l'ozoneur

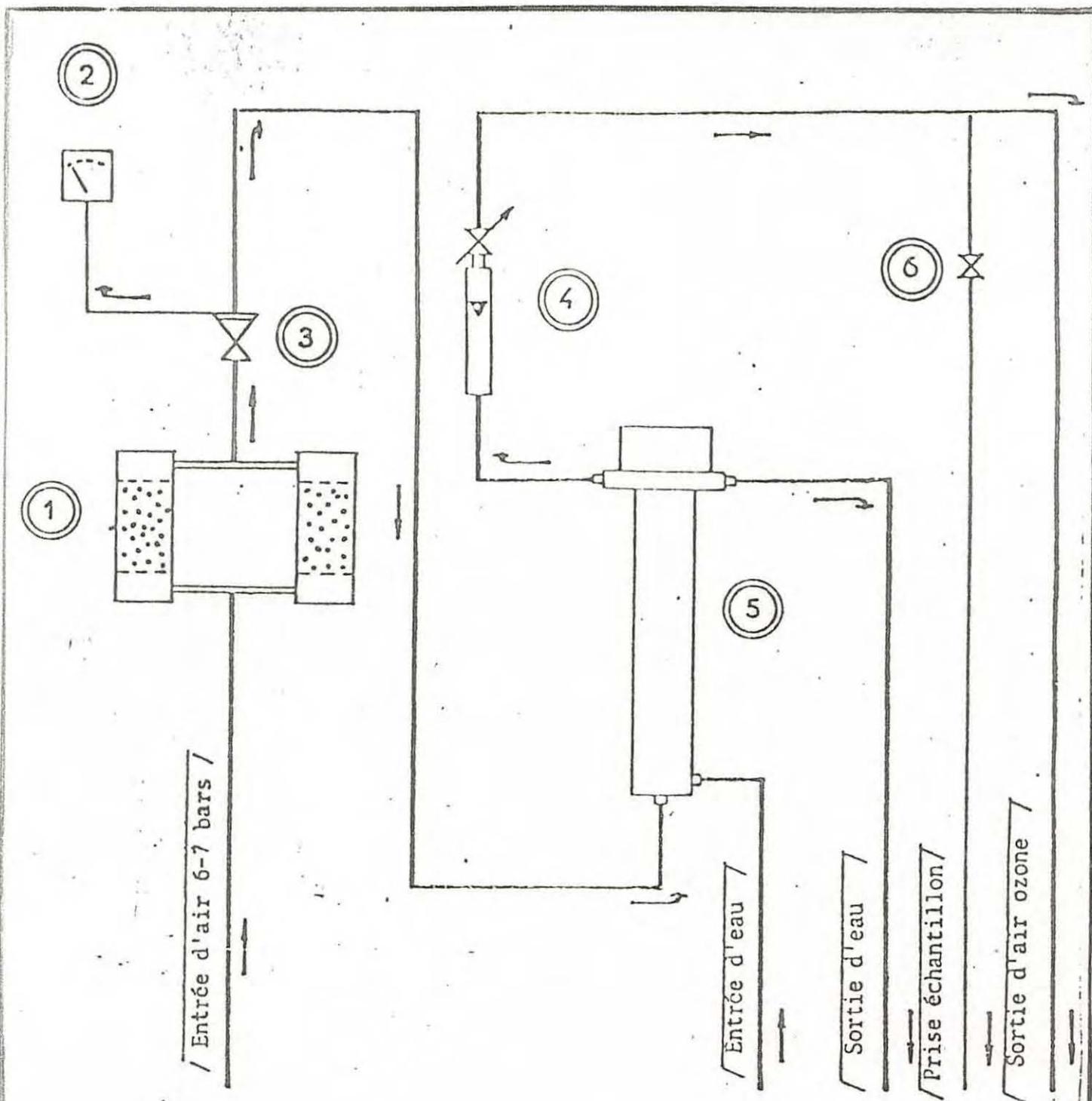
TRAILIGAZ (cf. Fig. I).

L'air ou l'oxygène est admis dans l'appareil à la pression de 5 à 6 bars. Un détendeur-régulateur placé en sortie du sécheur ramène la pression à une valeur réglable entre 0 et 1 bar.

Sur le parcours, de la tuyauterie réunissant le détendeur-régulateur à la cellule de l'ozoneur est branché :

- un manomètre indiquant la pression d'utilisation

- la tuyauterie, canalisant l'air (ou l'oxygène) ozoné, comportant un gyromètre indicateur de débit et un robinet de réglage. Une dérivation munie d'un robinet permet de procéder en cours d'expérience, à un dosage de contrôle de l'ozone mis en oeuvre.



Repères	Désignation
1	Sécheur sans chaleur
2	Manomètre de façade 0 à 1 bar
3	Détendeur régulateur
4	Gyromètre avec vanne de réglage du débit
5	Elément générateur d'ozone
6	Vanne de prise échantillon

Fig. I : Schéma de fonctionnement

Deux tuyauteries assurent l'admission et l'évacuation de l'eau nécessaire au refroidissement de l'ozoneur.

Du point de vue électrique, l'appareil est prévu pour être alimenté en courant monophasé 50 Hz - 220 V.

IV Description des différentes parties du dosage de l'ozone

a) Dosage de l'ozone dans l'air

(Méthode iodométrique)

Ce dosage a pour but de déterminer le poids d'ozone produit par la mesure du débit gazeux et celle de la concentration en ozone.

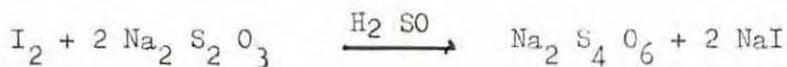
Pour calculer la concentration en ozone, on utilise la méthode iodométrique.

b) Principe

L'ozone est absorbé par de l'iodure de potassium pur



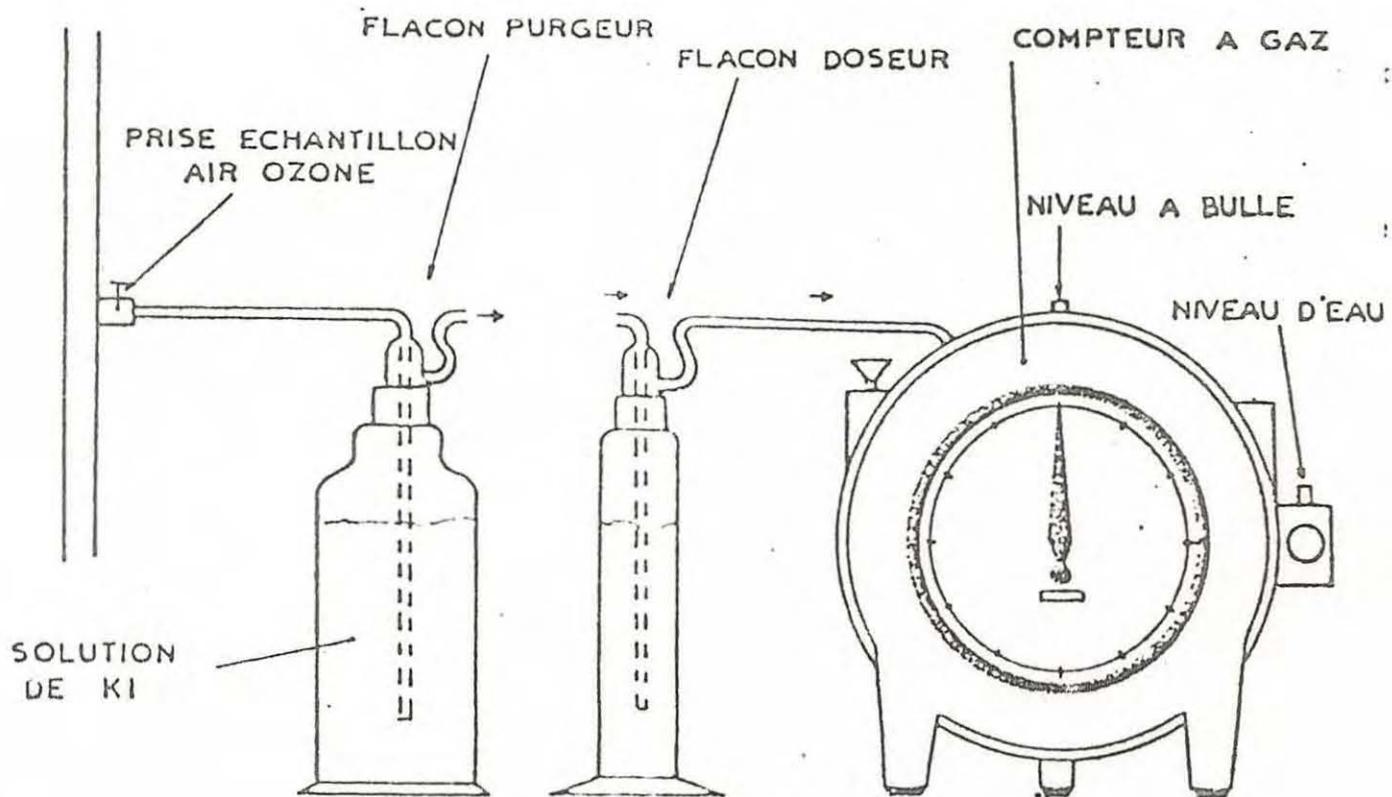
Après acidification par l'acide sulfurique, l'iode libérée est titrée avec une solution de thiosulfate de sodium N/10



Mode opératoire de ce dosage

1°) Le flacon purgeur contenant de l'iodure de potassium est branché à la prise d'échantillon, ceci permet de purger le tuyau de toutes impuretés.

2°) On règle le bullage sans production d'ozone à l'aide du compteur à gaz à un débit de 1 litre par minute (voir schéma)



FLACON SERVANT A LA DETERMINATION

DE LA DEMANDE EN OZONE DE L'EAU

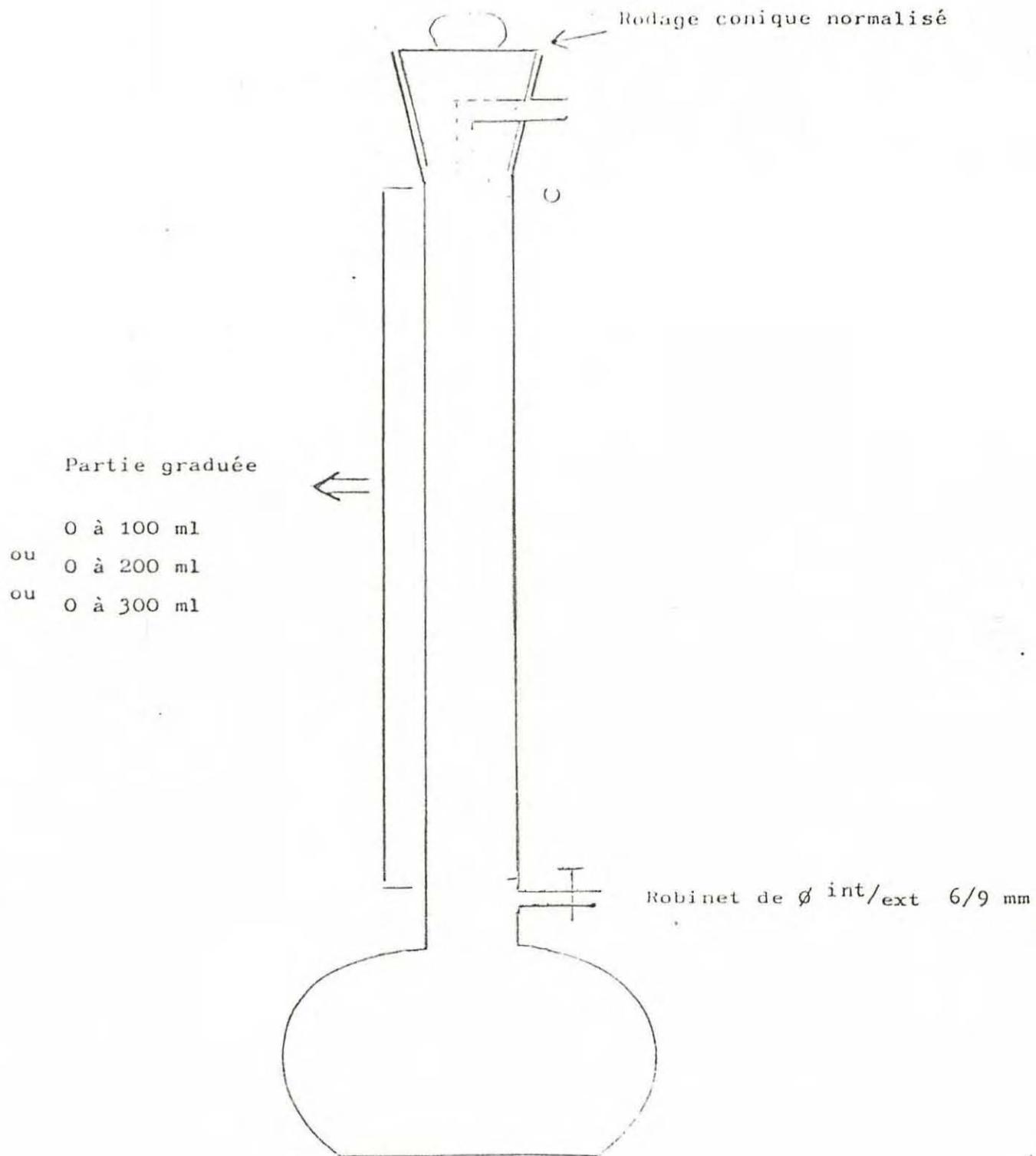


Fig II Volume total du flacon 1 000 ml

Le courant absorbé par l'ozoneur est réglé à 1 Ampère.

La température (°C) et la pression (mm Hg) sont notées.

3°) On fait passer 2,4 litres d'air ozoné dans le flacon doseur contenant de l'iode de potassium en excès (10 g).

4°) Le tube de la prise d'échantillon est remplacé sur le flacon purgeur

5°) On rince avec l'eau distillée la tête du flacon doseur

6°) On ajoute 10 ml d'acide sulfurique pour l'acidification

7°) On titre la solution avec le thiosulfate décimormal, lors de ce titrage, en fin de virage on ajoute un indicateur coloré, le thiodene.

Calculs

Quand le titrage est achevé, on calcule le volume corrigé V (ramené aux conditions normales : 0°C et 760 mmHg)

$V_0 = 2,4$ litres

K = facteur de correction, donné par une abaque (selon la température et la pression d'opération)

$V = V_0 \times K$ $V = 2,4 \times K$

On détermine, ensuite, la concentration de l'ozone dans l'air (en mg Oz/l'd'air)

$n =$ normalité de thiosulfate $= \frac{N}{10}$

$V' =$ volume de thiosulfate

$C = \frac{n \times V' \times 24}{V} = \frac{0,1 \times V' \times 24}{V_0 \times K} = \frac{0,1 \times V' \times 24}{2,4 \times K}$

$C = \frac{V'}{K}$

III - Dosage de l'ozone résiduel dans l'eau

1°) On introduit dans un flacon de demande enozone (cf. Fig. II) un volume d'air ozoné dont la concentration a été déterminée.

2°) On agite le flacon pendant 2 minutes afin de bien mettre en contact l'air ozoné avec l'eau

3°) On laisse reposer pendant 4 minutes. Pendant cette durée, l'ozone de l'air réagit avec l'eau pour former un résiduel d'oxydant que l'on titre par la suite.

4°) On ajoute (10 g) d'iodure de potassium. L'ensemble est titré par du thiosulfate $\frac{N}{100}$

En fin de virage, on ajoute du thiodène.

Calculs

On calcule le résiduel d'oxydants totaux

C = concentration en air ozoné (mg O₃/l)

V = volume d'air ozoné introduit dans le flacon (ml)

V' = volume d'eau traitée (500 - V) (ml)

X = quantité d'air ozoné (mg O₃)

$$\text{avec } X = \frac{C \times V}{1\ 000}$$

Le taux de traitement d'ozone sera égal à :

$$\frac{X \times 1\ 000}{(500 - V)} = \frac{C \times V}{500 - V} \quad (\text{en mg O}_3/\text{l})$$

Le résiduel d'oxydants totaux contenu dans l'eau sera égal à :

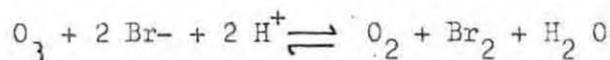
C' = descente de burette de thiosulfate de sodium N/100

avec 1 ml de thiosulfate N/100 0,799 mg O x T (Br₂)

On dose un résiduel d'oxydants totaux, essentiellement constitué par du brome.
On peut donc considérer que :

1 ml de thiosulfate N/100 correspond à 0,799 mg d'Oxt soit de Br₂

Il faut une mole d'ozone pour 2 moles de thiosulfate or une molécule d'ozone correspond à une molécule de brome



poids moléculaire du brome : 159,8 g

1 ml de thiosulfate N/100 correspond donc à :

$$\frac{159,8}{2 \times 100} = 0,80 \text{ g de Br}_2$$

$$\text{Résiduel } O_{xt} = \frac{C' \times 0,799 \times 1000}{500 - V}$$

c) Préparation des suspensions de parasite et traitements

Sur un lot d'huîtres plates provenant de secteurs parasités par Bonamia ostreae, les huîtres présentant, à l'ouverture, des lésions branchiales sont conservées (la présence de parasite étant souvent liée à la formation de lésions).

On prélève l'hémolymphe par une ponction intra-cardiaque. Les branchies prélevées sont dilacérées dans de l'eau de mer, la suspension de cellules branchiales et l'hémolymphe sont réparties dans des tubes à centrifuger. Un contrôle de la présence du parasite est effectué sur frottis.

Dans un tube à centrifuger contenant un certain volume de suspension d'huîtres parasitées, on ajoute un volume d'eau ozonée.

On laisse en contact pendant 1 heure, puis on ajoute du thiosulfate pour stopper l'action de l'ozone.

Après centrifugation, on remet le culot en suspension pour en prélever 0,2 ml à 0,3 ml que l'on injecte à chacune des huîtres plates saines.

Lot de 10 huîtres plates pour le témoin (Bonamia ostreae non traité)

Lot de 10 huîtres plates pour l'essai

Pour éviter qu'elles ne rejettent dans l'eau, les solutions injectées, les huîtres sont pendant 4 à 5 heures sous des linges humides.

Ensuite, elles sont disposées dans des bacs. Un contrôle des mortalités est effectué tous les jours.

Sur les huîtres mortes, on examine leurs branchies ; on fixe la glande digestive et on effectue un frottis, à partir des filaments branchiaux.

Au bout de 2 à 3 mois, on sacrifie les huîtres restantes.

d) Discussion des essais

Différentes expériences ont été réalisées pour des résiduels d'oxydants de 0,1 mg à 8 mg/l.

Lorsque l'on observe les différents frottis, deux cas sont envisageables :

- infestation des huîtres par Bonamia ostreae

Le parasite est résistant pour le résiduel d'oxydants employé et a conservé sa virulence.

- absence d'infestation

Résiduel appliqué peut être considéré comme léthal pour Bonamia ostreae

Le résiduel d'oxydants totaux léthal se situerait vers 4 mg/l.

Actuellement, d'autres essais sont en cours pour confirmer ce résultat.

Conclusion

A la suite des mortalités massives de l'huître plate, Ostrea edulis, un plan de sauvegarde a été envisagé. Il consistait entre autre à éradiquer (mise à terre des lots d'huîtres parasités).

Actuellement, ce plan en application depuis le printemps 1982 n'est que partiellement respecté (faute de moyens financiers, indemnisation...).

Il serait cependant intéressant :

- de continuer à effectuer le nettoyage de certains parcs
- d'arrêter momentanément la culture de l'huître plate dans les centres d'élevage (Bretagne Nord et Sud) touchés par l'épizootie
- de continuer à maintenir pour sauvegarder l'espèce un courant d'élevage exclusivement à partir de naissain (sain capté en eau profonde) sur des nouvelles concessions expérimentales attribuées à l'I.S.T.P.M. (comme ce fut le cas en Bretagne Nord dans les zones de Plouha et de Cancale en 1982.

Des essais sont en cours dans la rivière de Crach (Bretagne Sud) pour connaître le délai pour l'infestation d'huîtres saines.

Des recherches sont effectuées au laboratoire

- infestation expérimentale
(méthodes de proximité)

avec l'immersion dans une eau contaminée et l'injection de parasites

- recherches pour déterminer des doses minimales activées d'ozone pour traiter les effluents, les bassins de stockage des huîtres plates.

BIBLIOGRAPHIE

- ISTPM présentation et mission
Science et pêche 5 (janvier 1983)
- Recherches sur Bonamia ostreae parasite nouveau de l'huître plate (Pichot et coll)
- Bonamia ostreae, parasite de l'huître plate: comparaison de deux méthodes de diagnostic (Bachere et coll)
- La conchyliculture française, deuxième partie, biologie de l'huître et de la moule
- Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres (CompsMichel)
- Recherches sur un protiste, parasite nouveau de l'huître plate des côtes françaises (Comps Michel)
- C,R Acad Sc Paris t 295 (5juillet 1982) Serie III
- Ozonation de l'eau de mer et epuration des coquillages (Fauvel et coll)
- TRAILLIGAZ
Laboratoire de recherche et de controle
J.P.Legeron et J.Y. Perrot
 - Dosage de l'ozone dans l'air ozoné
Méthode iodométrique
 - Dosage de l'ozone résiduel dans l'eau
 - Demande en ozone d'une eau

ANNEXES



Photo:
Perforations et indentations
des branchies de l'huître
plate

Photo:
Indentations a différents
stades



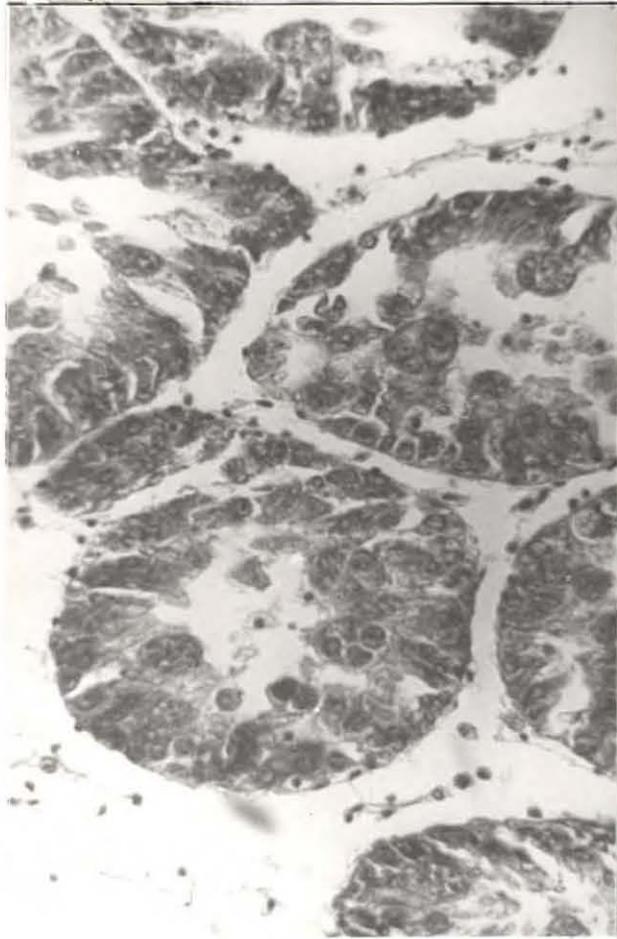


Photo: Diverticules digestifs parasités par
Marteilia refringens
(G x 40) coupe histologique

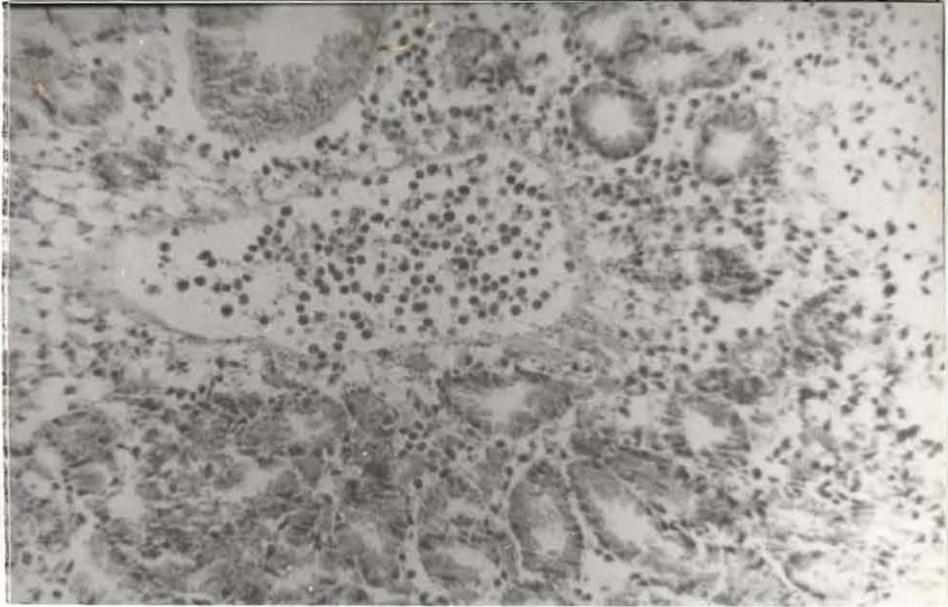


Photo: Glande distive parasitée par Bonamia ostreae
(Gx 10)
coupe histologique



Photo: indentation au niveau du tissu branchial
(Gx 40)
coupe histologique

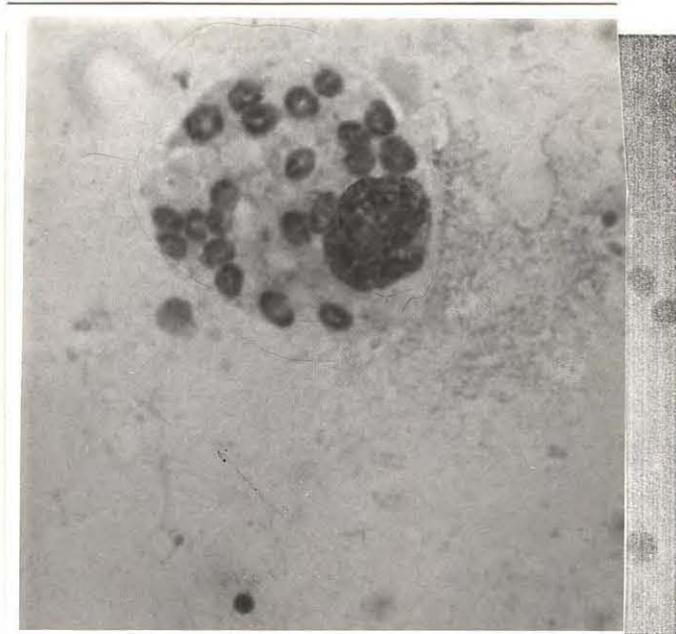


Photo: Hémocyte parasité par Bonamia ostreae
avant lyse
(G x 100)
frottis

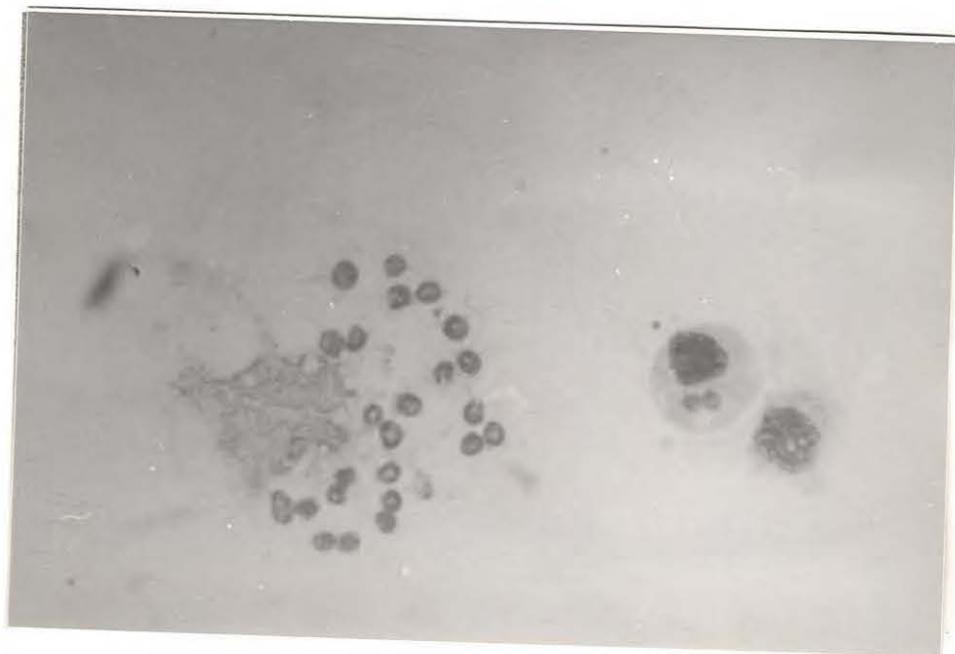


Photo: Hémolyse d'un hémocyte avec libération
du Bonamia ostreae
(G x100)