

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

Rennes

ETUDE DE BONAMIA OSTREAE  
ESSAIS D'INFESTATIONS EXPERIMENTALES

par

Véronique GADAUD

Jury : M. J. COLLIGNON  
M. H. GRIZEL (Maître de stage)  
M. J. DAGUZAN  
M. L. MARTEIL  
M. G. FONTENELLE  
M. P. GRUA

Réalisé au laboratoire conchylicole

ISTPM - La Trinité-sur-mer

Financement assuré

par le Comité Interprofessionnel de la Conchyliculture Bretagne sud  
et la Chambre de Commerce de Lorient

Septembre 1981

## PLAN

	Pages
1. <u>Introduction</u>	1
2. <u>La culture de l'huitre plate en Bretagne</u>	3
2.1. <i>Carriage</i>	3
2.2. <i>Elevage</i>	3
2.3. <i>Affinage</i>	4
3. <u>Rappel des connaissances sur Bonamia ostreae</u>	5
3.1. <i>Description du parasite</i>	5
3.1.1. <i>En microscopie photonique</i>	
3.1.2. <i>En microscopie électronique</i>	
3.1.3. <i>Cycle de développement dans l'huitre</i>	
3.2. <i>Spécificité parasitaire</i>	7
3.3. <i>Epidémiologie</i>	7
3.3.1. <i>Signes cliniques</i>	
3.3.2. <i>Cycle d'infestation in situ</i>	
3.3.3. <i>Situation épidémiologique</i>	
3.3.4. <i>Mortalités</i>	
4. <u>Expériences d'infestations expérimentales</u>	10
4.1. <i>But de l'expérience et hypothèses de travail</i>	10
4.2. <i>Protocole de l'expérience</i>	11
4.3. <i>Méthodes et matériels</i>	12
4.3.1. <i>Origine des animaux</i>	
4.3.2. <i>Les aquariums</i>	
4.3.3. <i>Techniques d'infestations</i>	
4.3.4. <i>Production de phytoplancton</i>	
4.3.5. <i>Techniques de contrôle</i>	

4.4. <i>Suivi de l'expérience</i>	19
4.4.1. <i>Les aquariums</i>	
4.4.2. <i>La nourriture</i>	
4.4.3. <i>Mortalités</i>	
4.4.4. <i>Prélèvements</i>	
4.4.5. <i>Analyse critique</i>	
5. <u>Résultats</u>	24
5.1. <i>Evaluation des mortalités</i>	24
5.1.1. <i>Essai à température ambiante</i>	
5.1.2. <i>Essai à 20°C</i>	
5.1.3. <i>Discussion-conclusion</i>	
5.2. <i>Contrôle des témoins initiaux et finaux</i>	32
5.2.1. <i>Huitres</i>	
5.2.2. <i>Crabes</i>	
5.3. <i>Analyse des séries expérimentales</i>	34
5.3.1. <i>Huitres</i>	
5.3.2. <i>Crabes</i>	
6. <u>Conclusion</u>	42
Bibliographie	44
Annexes	48

## AVANT-PROPOS

Cette étude a été effectuée dans le cadre du mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome, spécialité Halieutique, au laboratoire conchylicole de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes de La Trinité-sur-mer, sous la responsabilité scientifique de M. GRIZEL.

Avant de présenter ce travail, je désire exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et leurs conseils.

Je remercie en particulier :

M. J. COLLIGNON, Professeur de la chaire de Biologie marine à l'ENSAR, président du jury.

M. H. GRIZEL, Chef du laboratoire conchylicole de La Trinité-sur-mer, qui m'a fait bénéficier de son aide matérielle et scientifique. Je l'en remercie très sincèrement.

M. J. DAGUZAN, Professeur au laboratoire de zoologie, faculté des Sciences Biologiques de Rennes, qui a accepté de juger ce travail.

M. MARTELL, M. FONTENELLE qui me font l'honneur d'assister à ce jury.

Je remercie également M. LASSUS (ISTPM - Nantes), M. ROBIN (COB - Brest) et Mme MARTIN (ISTPM - La Trinité-sur-mer) pour m'avoir prodigué leurs conseils et leur aide ainsi que M. COMPS (ISTPM - Sète) pour la réalisation du travail en microscopie électronique.



J'adresse mes remerciements très sincères à M. A LANGLADE,  
M. J. MAMEAUX, Melle BESNARD, Melle RABOUIN, Melle AUDIC  
et Melle KERARON pour leur aide technique.

Je n'oublierai pas enfin que cette étude n'aurait pu être  
réalisée sans la coopération des ostréiculteurs : MM. CRENEGUY et  
CADORET.

Ce travail a été possible grâce à l'aide financière du  
Comité Interprofessionnel de la Conchyliculture Bretagne sud et de  
la Chambre de Commerce de Lorient.

Je remercie enfin Mmes FARARD, LE ROUX, Melles DEBREYER,  
RIBLER pour leur participation à la réalisation de ce mémoire.

---

## RESUME

L'ostréiculture, depuis une dizaine d'années, subit de graves crises dues à des épizooties successives.

La première, causée par *Marteilia refringens* (1969 à 1975), n'a pas atteint les centres vitaux de l'ostréiculture. La deuxième, due à *Bonamia ostreae*, mise en évidence en juin 1979 à l'île Tudy, touche presque tous les centres ostréicoles bretons (captage, élevage, affinage), réduisant considérablement la production (- de 3 000 t en 1981).

Dans le cadre de l'étude de cette maladie, nous avons réalisé des essais d'infestations. Les trois techniques de contamination employées sont : la méthode de juxtaposition (proximity method), la méthode des broyats (feeding method) et l'intervention d'un hôte intermédiaire.

Pour cela, nous avons réparti des huîtres et des crabes (*Carcinus maenas*) de différentes origines dans 18 aquariums. Cet élevage est couplé avec une culture de phytoplancton pour l'alimentation des huîtres.

Ce n'est qu'au terme du sacrifice final que nous avons constaté macroscopiquement (observation de lésions branchiales) et microscopiquement la contamination des huîtres saines par des huîtres de zones parasitées (méthode de juxtaposition).

L'évaluation des mortalités, relevées quotidiennement, a permis aussi de mettre effectivement en cause *Bonamia ostreae* dans les mortalités observées sur parcs. Le rôle de la température et celui du crabe n'ont cependant pas pu être dégagés.

## 1. Introduction

L'aquaculture marine est composée actuellement de deux branches :

- l'aquaculture nouvelle (salmoniculture, pectiniculture, vénériculture, etc.),
- l'aquaculture traditionnelle.

Cette dernière concerne uniquement la conchyliculture classique avec l'ostréiculture et la mytiliculture. Ces deux cultures sont pratiquées de longue date (PLINE rapporte dans ses essais les premières formes de culture et d'affinage d'huîtres) et sont également connues pour être rentables. Toutefois depuis une dizaine d'années, l'ostréiculture subit de graves crises successives dues à des épizooties.

Celles-ci ont affecté l'huître creuse *Crassostrea angulata* (COMPS, 1969 ; COMPS et DUTHOIT, 1976 ; COMPS et al., 1976) et l'huître plate *Ostrea edulis* (COMPS, 1970 ; HERRBACH, 1971 ; GRIZEL et al., 1974) les deux espèces cultivées sur les côtes françaises.

Le remplacement d'une espèce par une autre, dans le cas de l'huître creuse, a permis rapidement à la profession ostréicole d'atteindre les productions d'avant 1970\* (60 000 t) voir de les dépasser (100 000 t en 1979) (fig. 1). Il n'en est pas de même de la culture de l'huître plate (fig. 2). En effet, la progression de la première épizootie, due à *Marteilia refringens* (GRIZEL et TIGE, 1973 ; GRIZEL et al., 1976) s'est faite au cours des années 1969 à 1975, sans jamais atteindre les centres vitaux de production et d'élevage (baies de Quiberon, de St Brieuc et de Cancale). Cette situation a entraîné une baisse de la production (15 000 t à 6 à 7 000 t) compensée au niveau des entreprises par une production d'huîtres creuses, culture antérieurement non pratiquée dans les centres touchés.

---

\* Toutes les statistiques sont de la Marine Marchande et de l'ISTPM.

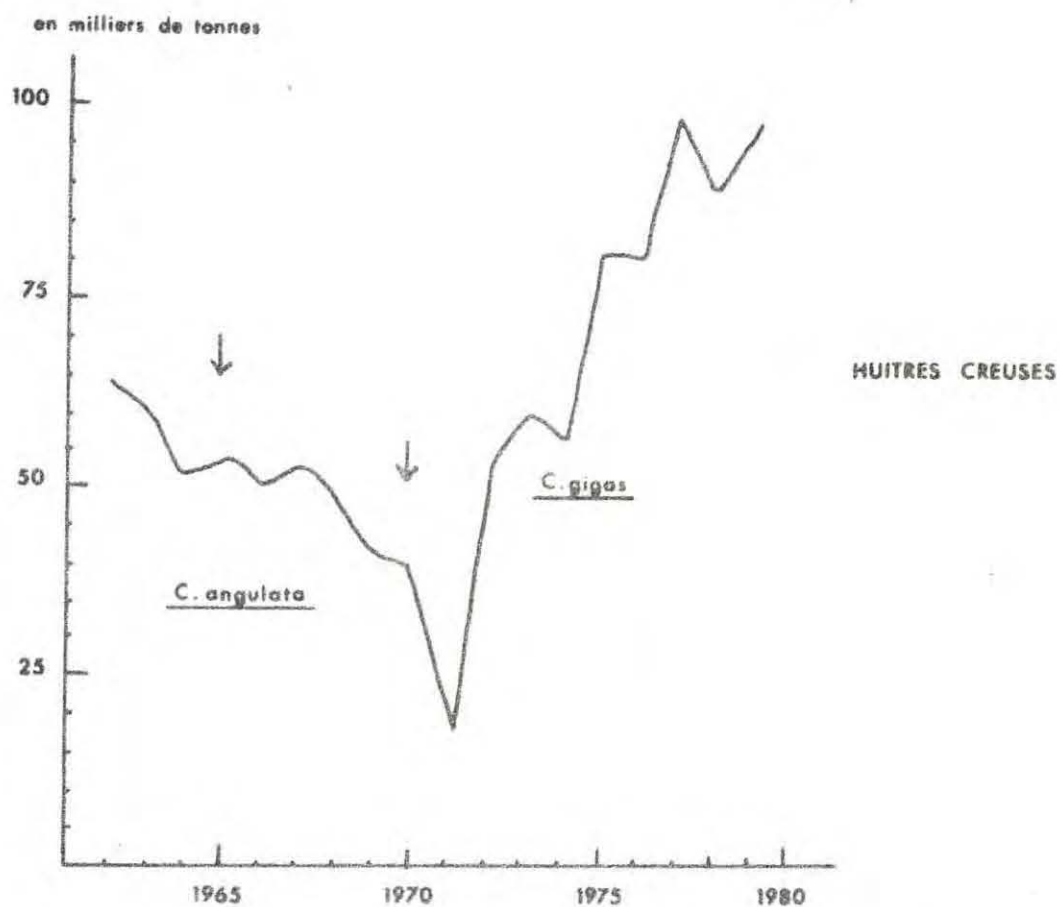


Fig. 1 : Evolution de la production des huîtres creuses (Crassostrea angulata à Crassostrea gigas) depuis 1961 jusqu'à 1980.

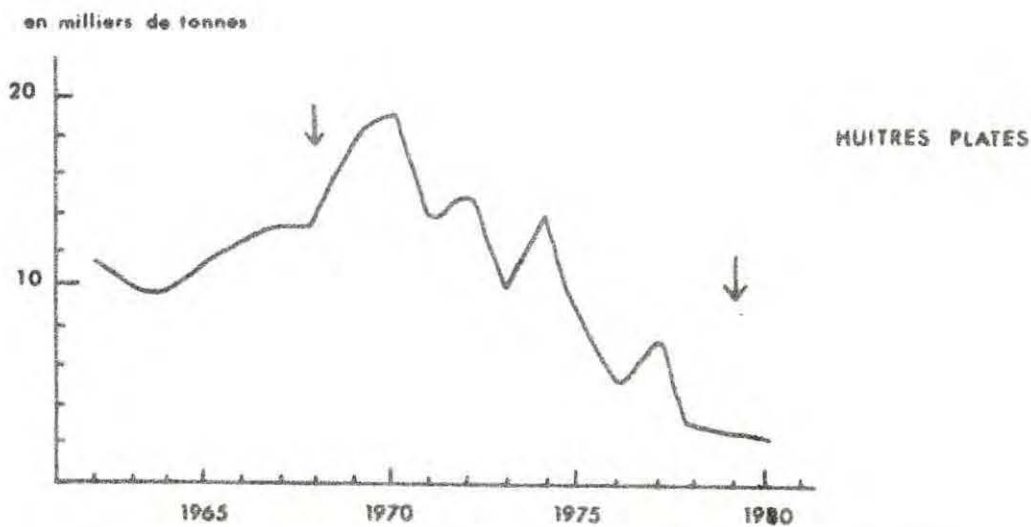


Fig. 2 : Déclin du stock par épidémies successives décelées en 1968 (Marteilia refringens) et en 1979 (Bonamia ostreae)



La situation depuis 1978 s'améliorait dans de nombreux secteurs et la culture de cette espèce allait reprendre son plein essor lorsqu'une deuxième épizootie due à *Bonamia ostreae* (PICHOT et coll., 1979) s'est développée.

L'extension brutale de la maladie et le fort pouvoir pathogène du parasite ont remis en question toute l'économie ostréicole intéressée par cette espèce. En 1980 la production a été évaluée entre 3 000 et 5 000 t. Elle sera certainement inférieure en 1981.

Pour résoudre cette crise et éviter si possible que de tels phénomènes se reproduisent, l'analyse de toutes les composantes du problème (professionnelle, administrative, scientifique) est à faire.

Sur un plan scientifique, l'étude du parasite reste un facteur important pour l'interprétation et la compréhension des épizooties.

Le sujet sur lequel j'ai travaillé durant mon stage au laboratoire conchylicole de La Trinité-sur-mer est un élément de cette étude. Au cours des mois de mai à septembre, j'ai réalisé des expériences d'infestations expérimentales pour connaître le mécanisme de contamination de *Bonamia ostreae*.

Dans le présent mémoire, afin de mieux comprendre l'importance économique de la maladie, nous rappellerons brièvement les principales phases de culture de l'huître plate et leur localisation et nous ferons un point des connaissances sur le parasite *B. ostreae*. Nous décrirons ensuite notre travail comprenant quatre parties : méthodologie, suivi expérimental, résultats et discussion, conclusion.

Nous noterons enfin que ce stage a pu être effectué grâce à l'attribution exceptionnelle d'une bourse d'étude versée par la section régionale du CIC de Bretagne sud et par la Chambre de Commerce de Lorient, montrant ainsi l'intérêt particulier que porte la profession à ce travail.

## 2. La culture de l'huître plate en Bretagne (fig. 3,4,5)

La culture de l'huître plate comprend essentiellement trois phases distinctes : le captage, l'élevage et l'affinage.

### 2.1. Captage

Les parcs de captage sont localisés dans des secteurs riches en gisement naturel, administrativement classé ou amodié. De plus, il est nécessaire que les conditions physico-chimiques minimales favorables à la reproduction de l'huître soient requises.

Ce sont traditionnellement le département du Morbihan avec la baie de Quiberon et les rivières attenantes et potentiellement à ce jour la rade de Brest.

Le collecteur tuile chaulée reste le plus utilisé, mais sont également employés avec succès des collecteurs en matière plastique et la coquille de moule selon deux techniques (sur sol et en suspension). D'autres matériaux sont actuellement à l'étude.

### 2.2. Elevage

Les jeunes huîtres, naissain et 18 mois, produites par les centres de captage, sont mises en élevage sur des parcs situés en zone intertidale ou en zone subtidale. Cette dernière technique date des années 1950 et a permis l'essor de la culture de l'huître plate. Les principaux centres d'élevage sont les baies de St Brieuc avec Binic et Paimpol, de Cancale et de Quiberon, la rivière de Morlaix et la rade de Brest ainsi que d'autres rivières d'importance moindre.

L'ostréiculture s'est ainsi développée sur les parcs en eau profonde de Binic. Elle s'est également accrue dans des centres indemnes en zone intertidale grâce à l'utilisation de la technique de culture en surélévation avec les poches sur table.

### 2.3. Affinage

Les huîtres de deux ans et trois ans peuvent pour partie être affinées pendant l'année précédant leur commercialisation à la consommation.

Cette opération s'effectue dans des rivières où la productivité primaire et la production phytoplanctonique sont généralement très élevées. Les huîtres trouvent ici des conditions idéales pour finir de croître et surtout acquérir une bonne qualité de chair.

Les plus connues de ces rivières sont la Penzé, les abers Benoît et Wrac'h et à moindre degré maintenant le Belon.

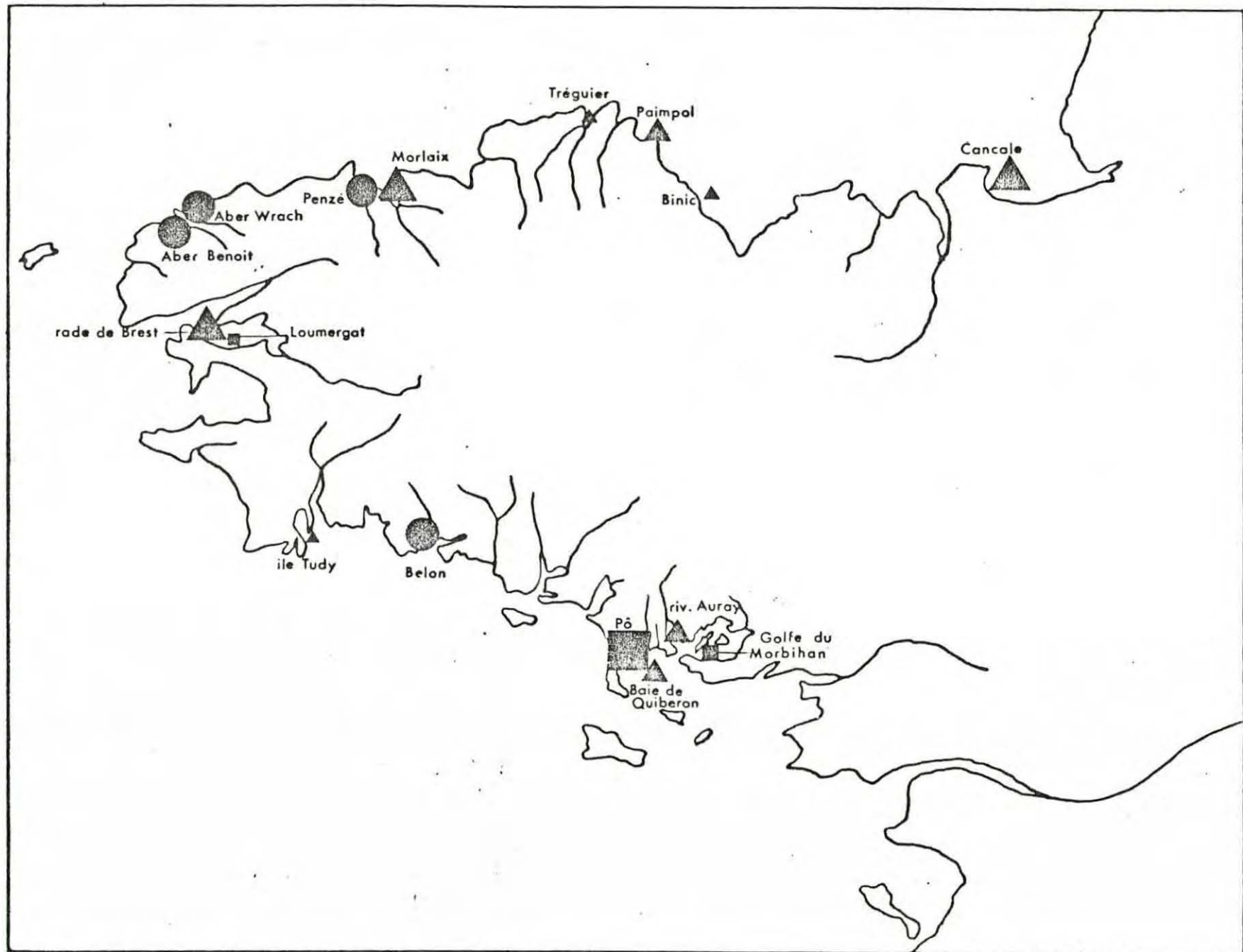


Fig. 3 : Localisation des centres de captage (■), d'élevage (▲) et d'affinage (●), avant 1968.



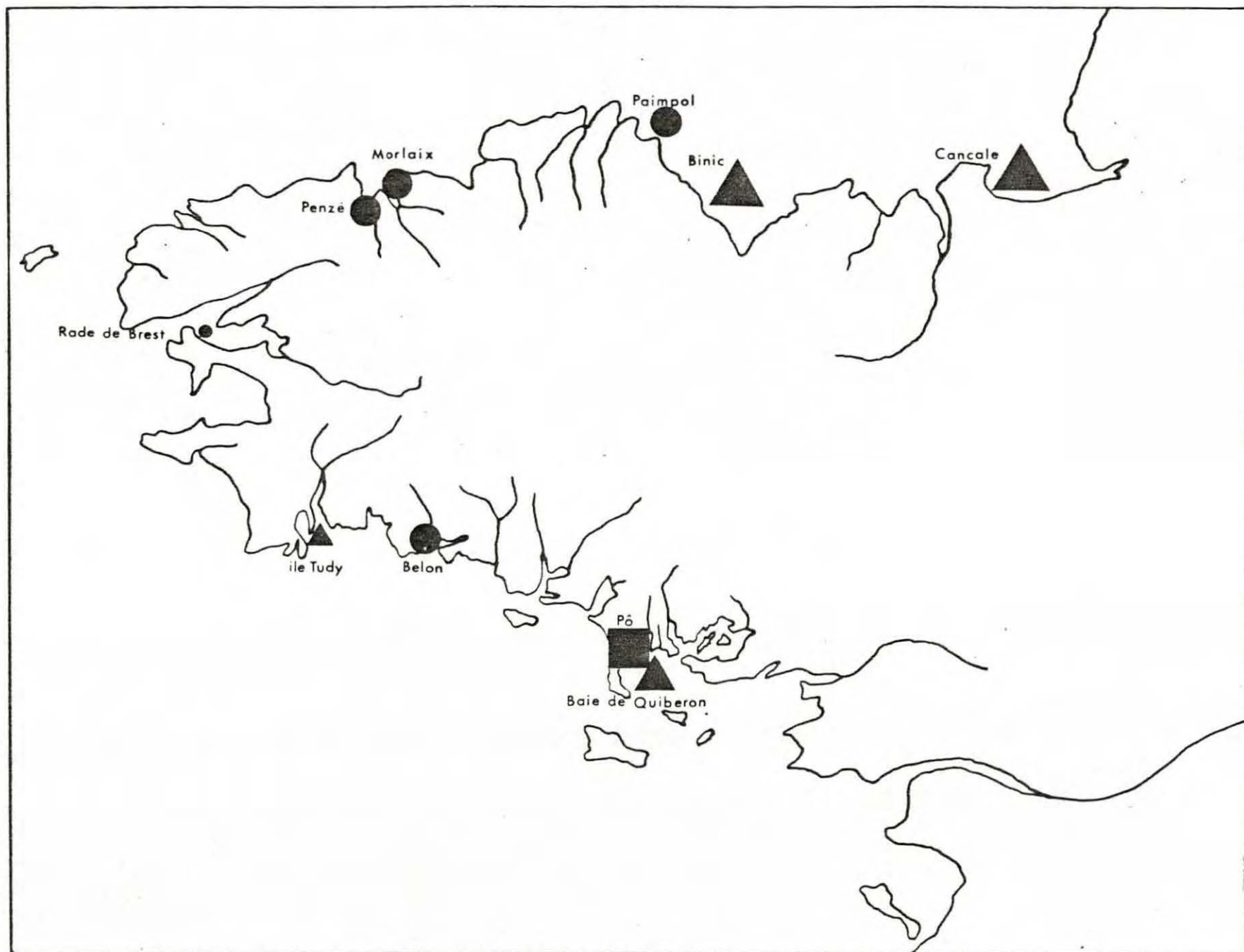


Fig. 4 : Localisation des centres de captage (■), d'élevage (▲) et d'affinage (●) entre 1968 et 1980.

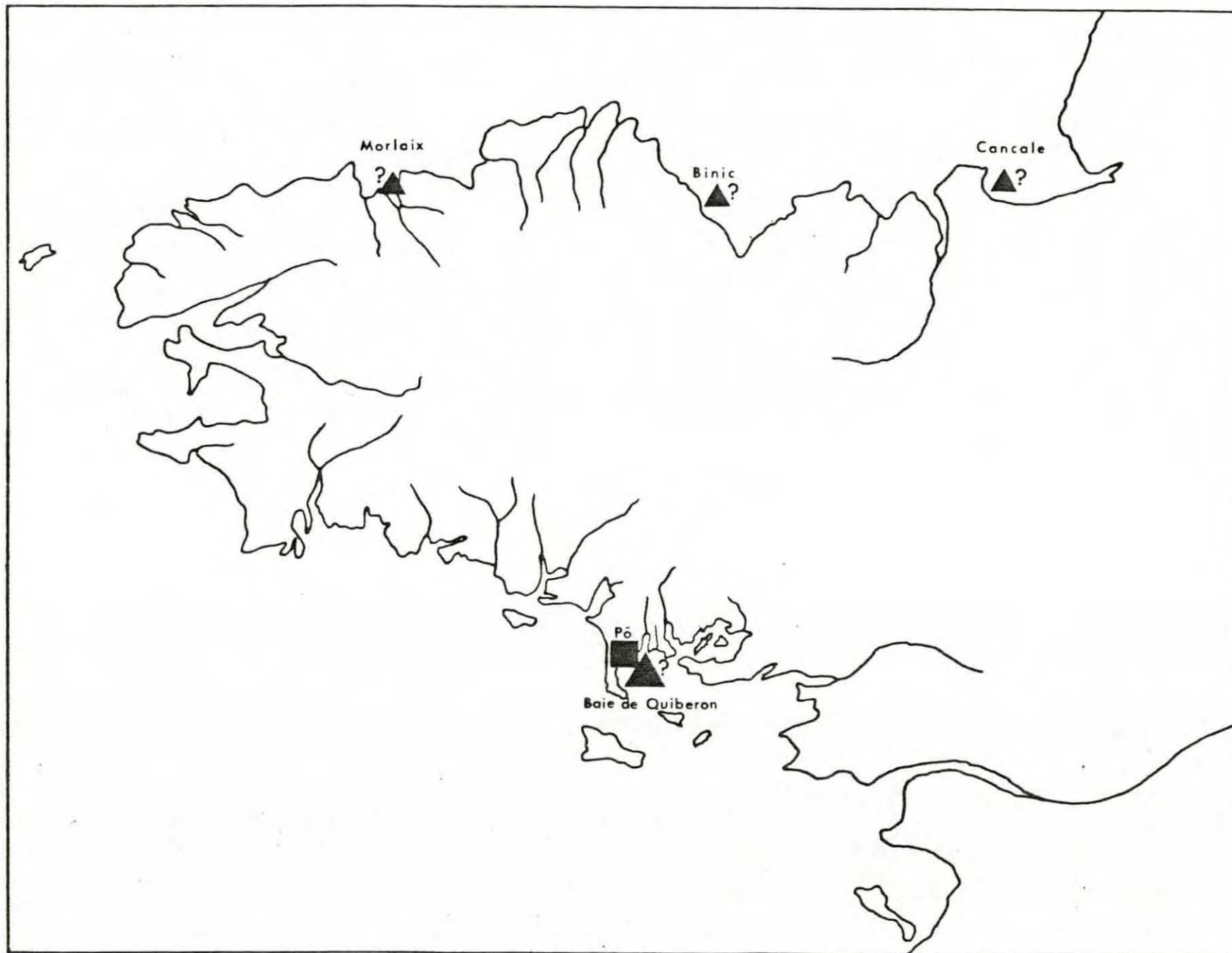


Fig. 5 : Localisation des centres de captage (■), d'élevage (▲) et d'affinage (●) à partir de 1980.

### 3. Rappel des connaissances sur Bonamia ostreae\* Pichot et coll., 1979

Le parasite X fut décelé en 1979 chez des huîtres subissant des mortalités à l'île Tudy et à Paimpol (COMPS et al., 1979). Son ultrastructure devrait être rapidement précisée par PICHOT et al., 1979, qui le nomèrent *Bonamia ostreae*.

Parallèlement le laboratoire de La Trinité-sur-mer suivait l'évolution de la situation épidémiologique (TIGE et al., 1980 ; TIGE et al., 1981 (sous presse)) et réalisait des expériences de contamination in situ (GRIEDEL, communication personnelle). Ce parasite était également décelé par CAHOUC et al., 1980.

#### 3.1. Description du parasite

##### 3.1.1. En microscopie photonique

Dans le cas de la maladie, des lésions sont observées au niveau des filaments branchiaux, du tissu conjonctif et plus rarement de l'épithélium stomacal. Elles forment très souvent un faciès particulier, caractérisé par la présence anormale de cellules sanguines et de petites cellules sphéroïdes de 2 à 3  $\mu$ . Ces dernières peuvent être libres dans les tissus ou situées à l'intérieur de cellules sanguines.

##### 3.1.2. En microscopie électronique

Les observations en microscopie électronique ont permis de préciser la structure des cellules parasites de l'huître.

Trois types peuvent être différenciés : les cellules denses, claires et en division.

##### . Cellules denses

Elles présentent un cytoplasme dense, riche en ribosomes où se trouvent également des mitochondries à crêtes peu nombreuses et des

---

\* Ce rappel est important car la bonne connaissance du parasite conditionne en partie la pratique d'un bon diagnostic.

particules denses structurées (PDS) de 130 à 170 nm. Le noyau limité par deux membranes unitaires est très opaque aux électrons. Ces formes sont les plus couramment observées et correspondent aux cellules décrites antérieurement.

#### . Cellules claires

De taille plus grande que les précédentes (2,5  $\mu$  à 7  $\mu$ ) et de forme amoeboïde, elles sont peu basophiles et sont caractérisées par :

- un noyau contenant un volumineux nucléole pariétal,
- des mitochondries à nombreuses crêtes,
- des formations membranaires ou saccules assimilables à un golgi.

Ces cellules renferment également des PDS décrits ci-dessus. Ils sont assimilables aux haplosporosomes décrits par PERKINS (1979).

#### . Cellules en division

Différents stades de division cellulaire ont pu être observés. Les microtubules de 20 nm visibles dans le nucléoplasme et formant un faisceau à partir d'un corps polaire sont à rapprocher des spindle pole body (SPB) décrits par PERKINS (1975) au cours des divisions cellulaires de *Minchinia nelsoni*.

La division nucléaire, au cours de laquelle la membrane unitaire persiste, est suivie d'une division cytoplasmique par formation d'une membrane plasmique interne. La multiplication dans la cellule hôte semble donc se faire suivant un mode schizogonique par division binaire simple.

### 3.1.3. Cycle de développement dans l'huitre

D'après PICHOT et al., 1979, les cellules claires représenteraient les formes végétatives, se multipliant par division schizogonique. Les cellules denses seraient les formes résistantes servant à assurer la dissémination du parasite. Ces auteurs n'excluent toutefois pas la présence d'un cycle à phase sporogonique qui se développerait chez l'huitre ou chez un hôte intermédiaire.



### 3.2. Spécificité parasitaire

Dès qu'une maladie se déclare chez un coquillage, des opérations de diagnostic sont aussitôt envisagées sur au moins toutes les espèces cultivées dans le secteur atteint.

Ainsi, ces contrôles avaient permis, lors de l'épizootie due à *Marteilia refringens*, de retrouver ce parasite chez *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*. Il n'a toutefois jamais entraîné de mortalité chez ces deux espèces.

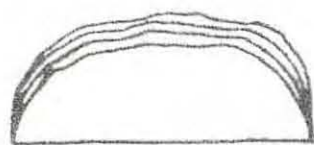
Concernant *B. ostreae*, des examens identiques ont été réalisés dans les principaux foyers infectieux décelés à ce jour. Les coupes histologiques pratiquées notamment sur *M. edulis* provenant du Vivier-sur-mer et de Cancale et de *C. gigas* cultivée à Paimpol, Cancale et en rivière d'Étel n'ont pas permis de déceler ce parasite (Communication personnelle - laboratoire de pathologie - ISTPM La Trinité-sur-mer).

### 3.3. Epidémiologie

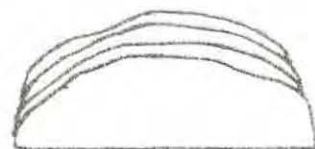
#### 3.3.1. Signes cliniques

Les signes cliniques retenus sont normalement décelables à l'examen macroscopique. D'après TIGE et al., 1980, les huîtres des parcs atteints par la maladie restent très souvent entrouvertes. La fermeture des valves est lente lorsqu'on les touche. La coquille, à l'exception parfois d'un manque de "pousse", signe non spécifique, ne présente aucun caractère particulier.

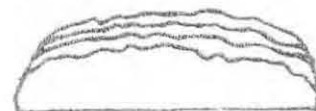
Le "poisson" a généralement une glande digestive normalement colorée et peut contenir des produits de réserve (glycogène). Les signes les plus caractéristiques sont au niveau des branchies. En effet, elles peuvent être affectées de lésions à différents stades (fig. 5 d'après TIGE et al., 1980). Le pourtour de ces lésions présente une teinte jaunâtre, généralement significative de la présence de *Bonamia*.



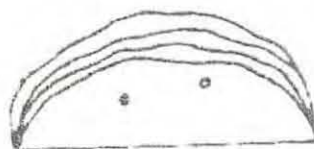
Branchies normales



Branchies normales



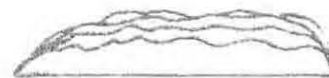
1



1

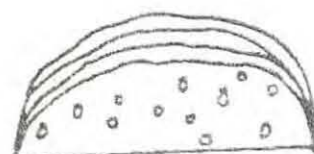


1

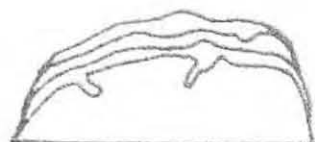


2

1.2. Branchies érodées



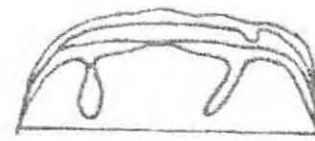
2



2



3



3

1. 2. 3. Branchies présentant différents types de perforations.

1. 2. 3. Branchies présentant différents types d'indentations.

Fig. 6 : Lésions branchiales associées à Bonamia ostreae (d'après Migé et al., 1980).

Nous retiendrons toutefois, comme ces auteurs, que ces signes ne sont pas spécifiques car, d'une part, de nombreuses huîtres ont été trouvées parasitées sans pour autant présenter ces caractéristiques et, d'autre part, la maladie des branchies chez *Crassostrea angulata* présentait également des lésions très similaires mais dues à l'action d'un virus (COMPS et al., 1976).

### 3.3.2. Cycle d'infestation in situ

Les expériences réalisées à l'Ile Tudy et à Paimpol (GRIZEL, communication personnelle) montrent que la contamination de lots supposés sains, peuvent s'effectuer ponctuellement (mars, avril, mai) mais qu'elle a surtout lieu en période estivale (infestations massives juillet, août, septembre). Ces infestations se poursuivent à degré moindre pendant les derniers mois de l'année.

Ces essais pratiqués avec des huîtres originaires de la baie de Quiberon où les témoins n'ont jamais révélé de parasite du mois de janvier à octobre posent un certain nombre de questions et permettent d'émettre trois hypothèses :

- lors de la mise en essai, les huîtres utilisées sont déjà contaminées à un taux très bas, difficilement décelable,
- un stade non décrit est déjà présent chez les huîtres,
- enfin, la contamination a bien lieu dans le site expérimental.

### 3.3.3. Situation épidémiologique

Le parasite a été décelé à l'origine en juin 1979 sur des huîtres subissant des mortalités à l'Ile Tudy. Sans pour autant pouvoir l'incriminer, il a été retrouvé associé, au cours du mois de novembre de la même année, à des mortalités très ponctuelles sur certains parcs de Paimpol (Pors Evens). Par la suite, il a été mis en évidence dans les différents centres mentionnés dans les tableaux 1 et 2. Ce diagnostic concerne soit des huîtres élevées dans le site, soit des huîtres transférées dans le site.

Secteurs	1979		1980												1981						
	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.
Rade de Brest	-		-	-	-	-	-		-	C	-	-			C	C	C	-	-	-	C
Pont l'Abbé		-								C											
Eréquier	-					-															
Abers			-	-			-	C	C	C	C	C	-	-				-	C		
Penzé			-	-	-	-	-	-		C			C	-		T	T	C	C		-
Norlaix			C	-	C	C	C	C	CT	CT	CT			C			C				-
Paimpol			C	C	CT	C	C	C	CT	C	C	C	C	C	C	C	C	CT	C	C	C
Binic			-	C	C	-	C	C			C	C		C		C				C	
Nance			-	-											C					C	
Cancalle			-	-		C		C	C	CT	C	C			-		C	C	C		

Tableau 1 - suivi épidémiologique de novembre 1979 à juillet 1981 des secteurs ostréicoles de Bretagne-nord.

C : huîtres élevées (cultivées) dans le site

T : huîtres transférées dans le site



Secteurs	1979		1980												1981						
	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.
Vénerf	-	-		-	-						C				-					-	
Dervins	-			-		-														-	-
Golfe	-	-			-	C	-	-		-	-				-		-			-	-
Riv. d'Auray			-	-													-				
St Pilibert			-	-	-	-	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
La Trinité			-			-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	C	-				
Quiberon - P8			-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C
Stel			-	-	-	C	C	C			C	-	C		C	C		C			
Le Croisic				-					C												
Ile Tudy	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C		C	C		C	C	C	C	C	C	C
Odet																	-				

Tableau 2 - suivi épidémiologique de novembre 1979 à juillet 1981 des secteurs ostréicoles de Bretagne-sud.

C : huîtres cultivées dans le site

T : huîtres transférées dans le site

Actuellement la maladie sévit dans quasiment tous les centres de captage et d'élevage bretons à l'exception, sous réserve de résultats négatifs des analyses en cours, du golfe du Morbihan, de la rivière d'Auray et d'une partie de la rade de Brest (gisement de Loumergat) (fig. 7).

#### 3.3.4. Mortalités

Les expériences réalisées par le transfert d'huîtres non contaminées (huîtres âgées) sur des parcs situés en zone atteinte par *Bonamia ostreae* ont permis de montrer que :

- les mortalités importantes surviennent deux à trois mois après l'observation des premières contaminations massives,
- elles s'échelonnent pendant la période automnale et hivernale,
- elles sont de 100 % au bout d'une période maximale de 13 à 15 mois.

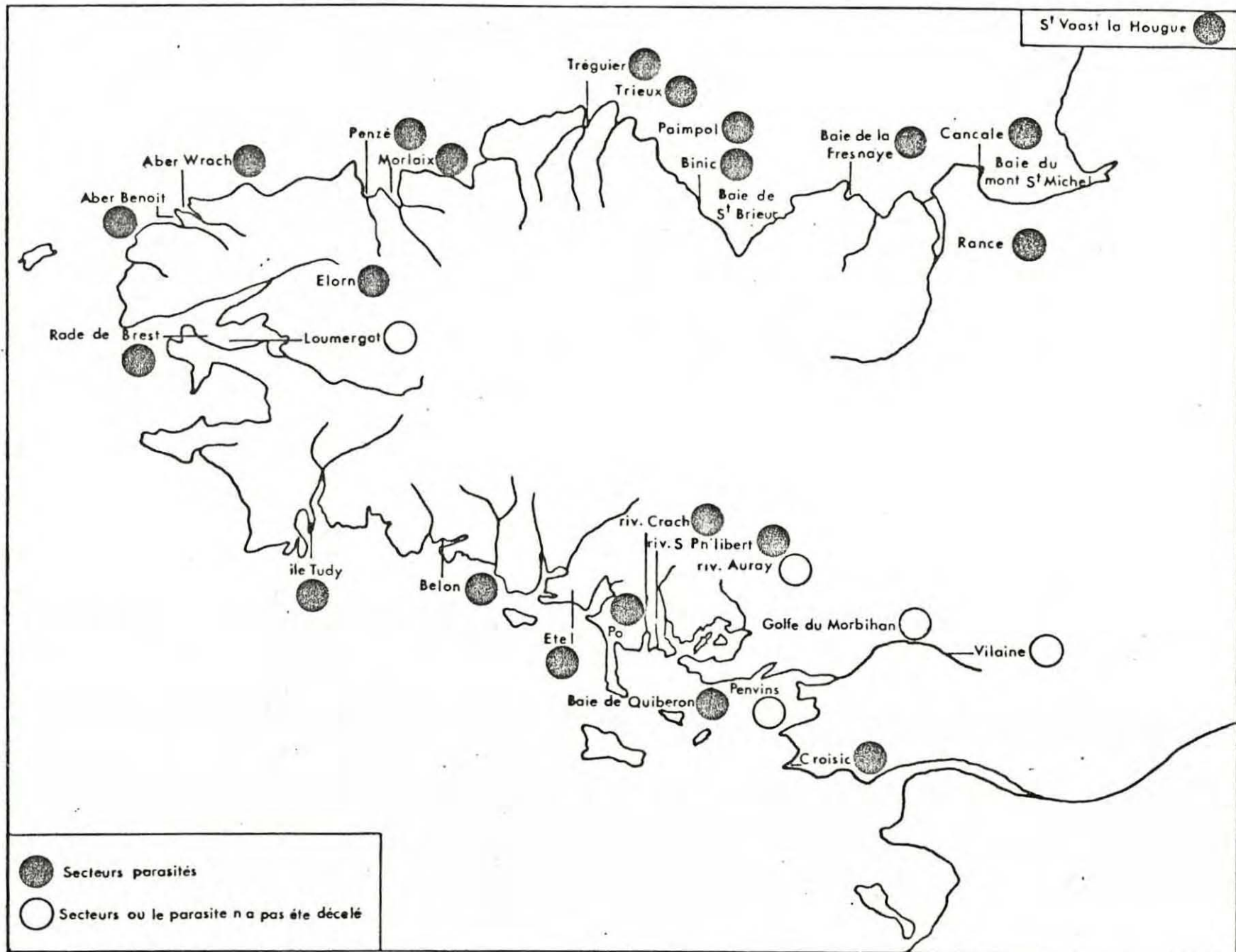


Fig. 7 : Répartition des secteurs parasités par Bonamia ostreae en Juillet 1981.

#### 4. Expériences d'infestations expérimentales

##### 4.1. But de l'expérience et hypothèses de travail

Des observations réalisées sur *Bonamia*, il ressort que :

- 1°) les huîtres baillantes sont la proie des prédateurs,
- 2°) la période maximale d'infestation paraît avoir lieu durant l'été, pendant les mois les plus chauds,
- 3°) il est possible que le parasite soit présent dans l'huître sous une forme non décelable ou décelée à ce jour,
- 4°) la maladie s'est souvent déplacée par taches sur les parcs, affectant à un temps donné qu'une partie d'un parc, et surtout qu'une ou plusieurs parties d'un centre.

Partant des constatations 1 et 4 nous avons émis l'hypothèse d'une possibilité de cycle de développement de la maladie par un hôte vecteur ou secondaire qui serait préférentiellement un prédateur de l'huître ou un nécrophage.

Le crabe vert *Carcinus maenas* étant présent dans toutes les régions ostréicoles bretonnes, notre choix s'est porté sur cet animal pour réaliser les expériences.

Se basant sur le point 2, nous pensons qu'il est possible que la température, comme dans le cas du développement de *Marteilia refringens* (LEIBOVITZ et GRIZEL (sous presse)) soit un facteur déterminant dans la contamination ou l'évolution du parasite.

Enfin, tenant compte du point 3, nous avons conçu cet essai de manière à éliminer indirectement l'inconnue présente.

Les hypothèses posées, le but de ces expériences est donc, comme nous l'avons indiqué précédemment, d'étudier le mécanisme d'infestation de *Bonamia ostreae*, en vérifiant au cours de celles-ci :

- l'incidence du parasite sur les mortalités (relation présence parasite - mortalité),
- l'influence de la température
- le rôle éventuel de *Carcinus maenas*,
- la possibilité d'une contamination huître à huître, le parasite étant véhiculé par le milieu.

#### 4.2. Protocole de l'expérience

Plusieurs auteurs ont déjà procédé à des essais d'infestation expérimentale, notamment de *Perkinsus marinus* (RAY, 1954), *Marteilia refringens* (BALOUET et all.), *Nematopsis* sp. (GRIZEL et all.) en employant des protocoles et des techniques assez similaires.

Dans notre cas, nous avons utilisé deux séries de bacs, dont le détail des caractéristiques est donné ultérieurement.

. La première série, à température ambiante comprend 11 bacs composés selon le schéma suivant :

<u>Chaîne témoin</u>		<u>Chaîne active</u>	
1	HNP	6	HNP + HP X 2
2	HP	7	HNP + CZP X 2
3	CZNP	8	HNP + CZNP
4	CZP	9	HNP + SP
5	HNP + CZNP		

HNP = huîtres non parasitées

HP = huîtres parasitées

SP = suspension parasites

CZNP = crabes de zone non parasitée

CZP = crabes de zone parasitée



. La deuxième série, à température de 20°C, comprend 7 bacs répartis selon le schéma ci-dessous :

<u>Chaîne témoin</u>		<u>Chaîne active</u>	
1	HNP	3 HNP + HP	6 HNP + HP + CZP
2	HP	4 HNP + CZP	7 HNP + HP + CZNP
		5 HNP + SP	

Ce modèle, complété par une analyse de témoins initiaux (huîtres et crabes provenant de différents secteurs) et une analyse de témoins finaux (huîtres de zone non parasitée), devrait permettre de contrôler si la maladie s'est développée "naturellement" sur les huîtres de la zone non parasitée et de répondre au problème posé.

#### 4.3. Méthodes et matériels

##### 4.3.1. Origine des animaux

Les huîtres de zone non parasitée, sont des huîtres atlantiques, draguées sur un banc naturel dans le port de la Palice. Huîtres "tout venant", elles sont âgées de 18 mois à 4 ou 5 ans. Elles sont détroquées, brossées et lavées avant d'être introduites dans les bacs.

Les huîtres parasitées sont collectées sur les parcs ostréicoles bretons des secteurs infestés : Ile Tudy et Peimpol. Ce sont des huîtres de 2 et 3 ans qui n'ont subi qu'un simple lavage avant d'être introduites dans les bacs.

Les crabes de zone indemne proviennent aussi de La Rochelle. Ils ont une taille allant de 4 à 10 cm de largeur céphalothoracique.

Les crabes de zones parasitées sont fournis par des ostréiculteurs du Morbihan (rivière de St Philibert) d'une part et d'autre part, nous avons mouillé une nasse appâtée dans le port de La Trinité-sur-mer.

Ce sont les crabes d'une taille de 4 à 5 cm de largeur qui ont été retenus, taille paraissant la plus propice pour un bon maintien en élevage.

#### 4.3.2. Les aquariums

Les 18 bacs sont disposés dans deux salles d'élevage (fig. 8). Dans la première salle, la série à température ambiante et dans la seconde salle, la série, dont l'eau est thermostatée à 20°C, ainsi que les ballons et gaines plastiques pour la culture de phytoplancton

Les aquariums utilisés sont des bacs blancs en plastique de contenance 60 l.

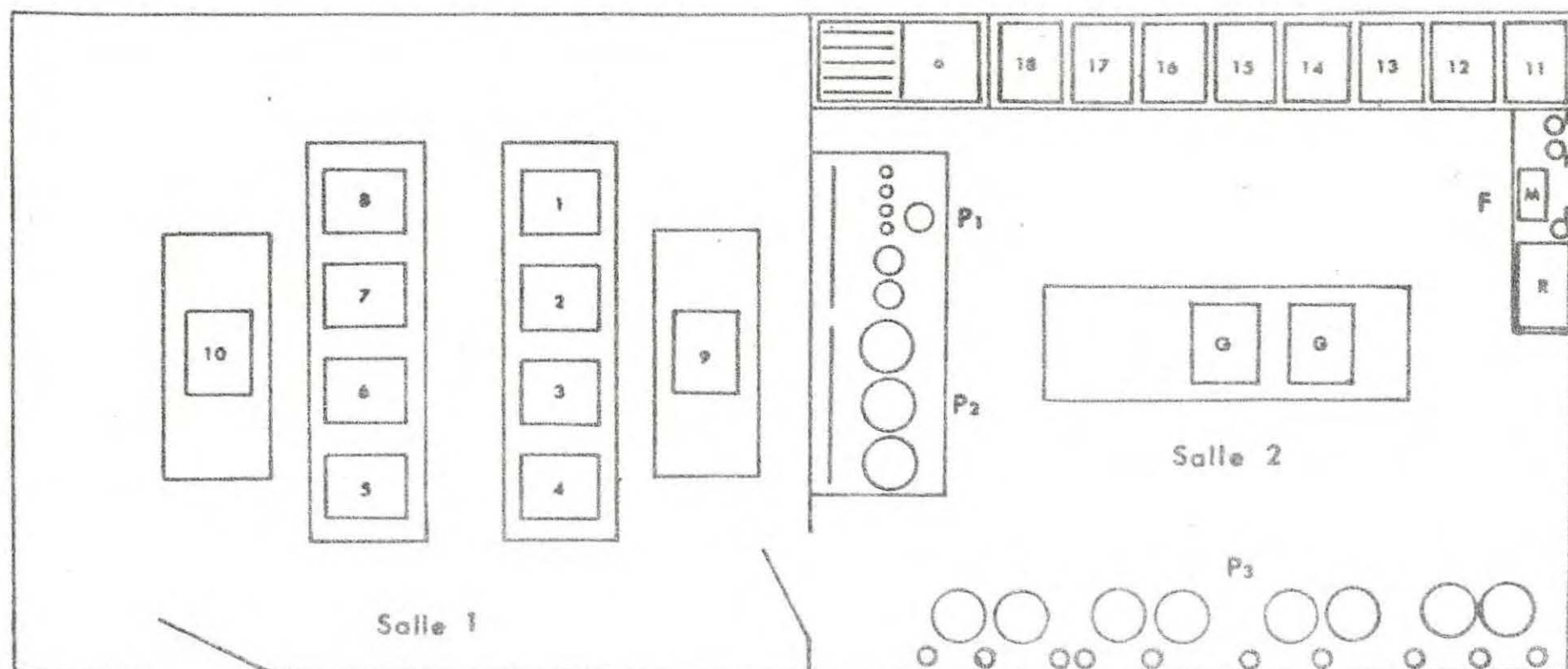
Au fond de chaque bac est déposée une couche de 2 à 3 cm de sable pour recréer le biotope des crabes et pour assurer le développement d'un film bactérien au fond du bac. Ce dernier facilite la décomposition des matières en suspension.

Chaque bac est rempli de 45 l. à 50 l d'eau de mer filtrée. Cette eau de mer est pompée en rivière de La Trinité et filtrée sur filtre "Millipore" comprenant en série un premier préfiltre grossier à la sortie de la pompe moteur, puis un second préfiltre à 0,45  $\mu$ , enfin un filtre à 0,2  $\mu$ . L'eau de mer n'a jamais été renouvelée au cours de l'expérience. Chaque bac est rempli de 45 l à 50 l d'eau de mer filtrée.

L'aération des bacs est assurée par des petits moteurs bulleurs "Rena" et "Hykro". Chaque moteur assure le bullage de 3 bacs et dispense l'air à un débit d'environ 200 à 270 l/h. Dans chaque bac, il n'y a qu'un seul sucre diffuseur.

La température de 20°C des bacs de la seconde salle est maintenue à l'aide de résistances thermostatées "Hykro" pour aquarium (100 W - 220 W). Elle représente approximativement la moyenne des températures d'eau relevée dans les milieux ostréicoles bretons.

Charge des bacs : chaque bac reçoit entre 60 et 80 huîtres auxquelles s'ajoutent 15 crabes pour 5 des 18 bacs et 30 crabes pour un seul



Aquariums

Série à t° ambiante

- 1 60HNP + 20HP
- 2 60HNP + 20HP + 15CZNP + 15CZP
- 3 60HNP + 15CZP
- 4 Témoin : 60HNP + 15CZNP
- 5 Témoin : 60HP
- 6 Témoin : 60HNP
- 7 Témoin : 20CZNP
- 8 60HNP + SP
- 9 60HNP + 20HP
- 10 60HNP + 15CZP
- 18 20CZP

Série à 20°C

- 11 60HNP + 15CZP
- 12 60HNP + 20HP
- 13 60HNP + 20HP + 15CZP
- 14 60HNP + 20HP + 15CZNP
- 15 60HNP + SP
- 16 Témoin : 60HNP
- 17 Témoin : 60HP

Production de phytonancton

- P<sub>1</sub> = prélèvement en erlenmeyer de 500 et 1000 ml
- P<sub>2</sub> = prélèvement en bonbonne 10 l
- P<sub>3</sub> = production de masse en gaine

Nourriture par crabe

G = bac de Crassostrea gigas

Filtration eau de mer

R = réserve eau de mer

M = moteur

P = préfiltre

F = filtre

Fig. 8 : Description des salles d'élevage.



des bacs. Cette répartition est donnée sur la figure 8. Dans les bacs où cohabitent des individus de provenance différente, un marquage distinctif est employé :

- deux traits de scie à métaux sur la valve droite des huîtres parasitées,
- une marque de peinture blanche sur la carapace des crabes de zone parasitée.

#### 4.3.3. Techniques d'infestations

Nous avons repris les techniques utilisées par SAMMY M. RAY en 1954 pour réaliser l'infestation d'huîtres par *Derocystidium marinum* selon deux méthodes :

- méthode d'infestation huître à huître  
(proximity method)
- méthode par broyats de tissus d'huîtres infestées  
(feeding method) (branchies de 3 huîtres, 2 fois par semaine)  
(SAMMY M. RAY, 1954)

Plus récemment, la technique des broyats d'huîtres avait été suivie par BALOUET pour l'infestation d'huître par *Marteilia* (BALOUET, CHASTEL, QUILLARD, CAROUR, 1976).

Nous avons employé une troisième technique : l'intervention d'un hôte intermédiaire. En effet, le cycle du parasite, après sa libération par voie digestive ou après la mort de l'huître, peut se poursuivre dans un ou plusieurs hôtes intermédiaires.

De tels cycles se rencontrent chez *Nematopsis ostrearum* qui a pour hôte Brachyoure, *Panopeus herbstii* ou *Eurypanopeus depressus* et hôte mollusque *Ostrea virginica* (PRYTHORCH, 1940 in vivarès 1969).

KORRIGAN (1968) a trouvé plusieurs hôtes potentiels pour *Mytilicola intestinalis*.

Dans cette expérience, nous avons testé le rôle de *Carcinus maenas* dans le cycle de *Bonamia ostreae*.

#### 4.3.4. Production de phytoplancton

Des essais comparables à celui-ci ont déjà été menés en alimentant les huîtres avec du lait en poudre (TIGE, 1979, rapport ISTPM). Les algues nous ont paru être un meilleur aliment pour les huîtres, notre expérience devant durer plusieurs mois.

##### Les souches utilisées

Deux espèces, communément employées par différents laboratoires ont été retenues pour leur taille qui s'assimile à celle des cellules planctoniques ingérées par les huîtres dans la nature (3 à 12, PAULMIER, 1972). Ce sont :

- *Tetraselmis suecica* : algue unicellulaire flagellée verte
- *Monochrysis lutheri* : algue unicellulaire flagellée brune

Les souches de départ, contenues dans deux erlenmeyers de 500 ml, m'ont été fournies par l'ISTPM de Nantes.

##### Prélevage

J'ai utilisé les techniques pratiquées par LASSUS (communication personnelle) et par la SATMAF (LE BORGNE et col., colloque 1978). Les souches sont repiquées et maintenues pour notre expérience dans des erlenmeyers de 300 à 1 000 ml, contenant au 3/4 de l'eau de mer filtrée à 0,2 et 2 ml/l de milieu de Provasoli (composition annexe 2).

Les flacons, bouchés par du coton cardé et de la gaze, sont préalablement stérilisés à 120°C pendant 10 minutes. Une feuille d'aluminium individuelle assure la protection des bouchons au cours de la stérilisation. Le contenu des erlenmeyers est quotidiennement agité.

Le prélevage est réalisé dans des bonbonnes de 10 l, également stérilisées et contenant du milieu identique au précédent. La culture est aérée par bullage.

Les repiquages entre erlenmeyers sont pratiqués aseptiquement selon la technique classique utilisée en bactériologie.

Le repiquage des erlenmeyers en bonbonnes se fait par simple transvidage, les risques de contamination étant faibles.

La fréquence des premiers est de 8 jours, celle des seconds de 10 jours.

Erlenmeyers et bonbonnes sont disposés sur une étagère basse de la deuxième salle d'élevage. L'ensemble est protégé par des plaques de polystyrène qui assurent un maintien de la température aux alentours de 20°C. L'éclairage est réalisé par 6 tubes fluorescents ordinaires Philips horizontaux de 90 cm de long et d'une puissance de 40 W chacun.

#### Production de masse de phytoplancton

Les installations correspondant à la production de masse sont reportées dans la figure 8. Elles sont constituées de quatre gaines plastiques polyéthylène chacune mesurant 15/100 d'épaisseur, 380 mm de large et 2,5 m de long. Chaque gaine repliée en U et suspendue par les deux extrémités, est remplie d'eau de mer uniquement filtrée à 0,2  $\mu$  et enrichie en milieu de Provasoli. La mise en culture des deux espèces d'algues est faite alternativement sur deux gaines de manière à obtenir une production régulière.

La production de *Tetraselmis* est assurée par une simple remultiplication in situ des cellules et un réajustement d'eau et de milieu de culture. Le genre *Monochrysis* est réensemencé tous les 10 jours dans une gaine plastique neuve.

La production est contrôlée par des comptages réalisés à l'aide d'une cellule de Mallassez. En production :

- 520 000 à 1 000 000 cellules/ml pour *Tetraselmis*
- 800 000 à 2 223 000 cellules/ml pour *Monochrysis*



Le bullage est assuré par des bulleurs "Hykro" et de longs tubes pyrex légèrement recourbés à leur extrémité.

L'éclairage est fourni par 5 tubes blancs brillants Phillips de 1,2 m de long et 40 W de puissance intercalés avec 5 tubes gros lux (lumière violette) de même longueur et de même puissance que les précédents.

#### 4.3.5. Techniques de contrôle

Les observations de contrôle sont macroscopiques et microscopiques.

##### Examens macroscopiques

Les examens macroscopiques des huîtres portent sur la croissance de la coquille, l'état d'engraissement de l'animal et surtout sur la présence ou l'absence de lésions branchiales. Ces dernières, comme nous l'avons rappelé précédemment, sont un signe intéressant de la présence de *Bonamia*.

Les examens macroscopiques des organes de crabes se font après une dissection de la carapace. Cette dernière peut être incisée dorsalement suivant la marge latérale du céphalothorax comme le décrit TIXIER, 1957, ou ventralement selon les lignes de suture. Nous avons retenu la première qui permet de garder tous les organes en place (fig. 9 et 10).

Les examens sont réalisés à l'œil nu pour la cavité coelomique et à la loupe binoculaire pour les différentes parties du tube digestif. Comme l'ont décrit BAUCHAU (1966) et TIXIER (1957), ce sont l'estomac, l'intestin moyen et postérieur (rectum), les caeca digestifs (deux antérieurs et un postérieur) et l'hépatopancréas.

##### Examens microscopiques

Les examens microscopiques se font sur des frottis et sur des préparations histologiques. Les techniques de frottis ont été surtout employées pour les parasites des crabes pour permettre de compléter rapidement un diagnostic macroscopique.

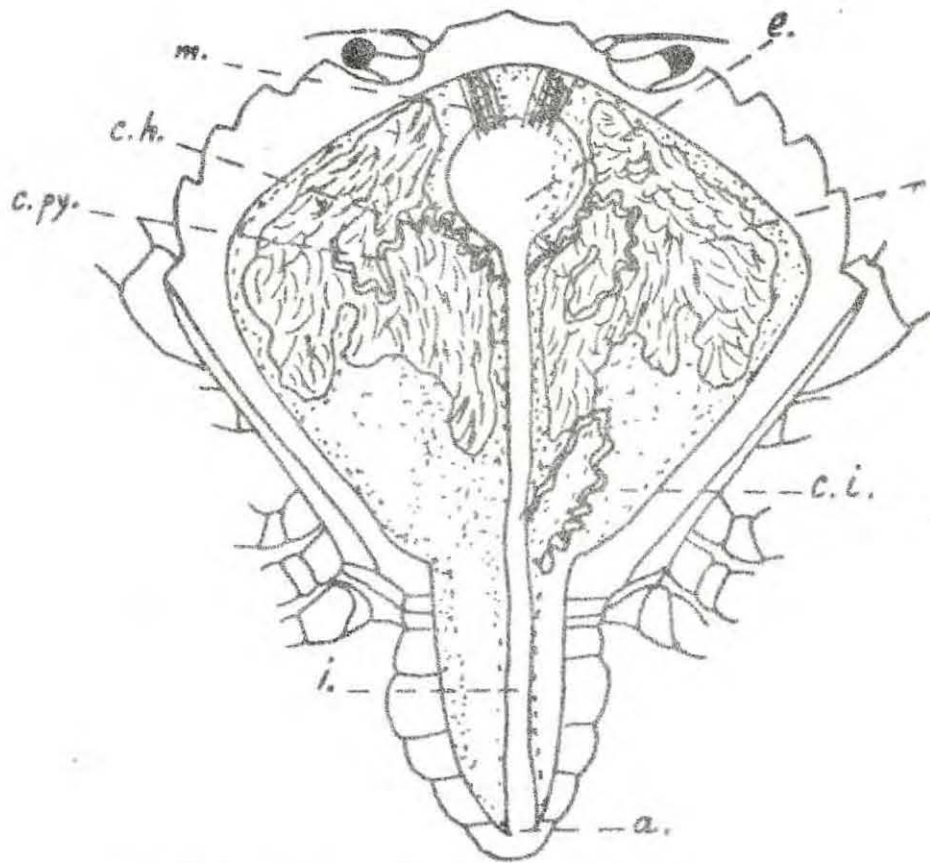


Fig. 9 : Appareil digestif du crabe :

- e.: estomac
- m.: muscle
- c.h.: canaux hépatiques
- c.py.: caecum pylorique
- hp.: hépatopancréas
- c.i.: caecum intestinal
- i.: intestin
- a.: anus

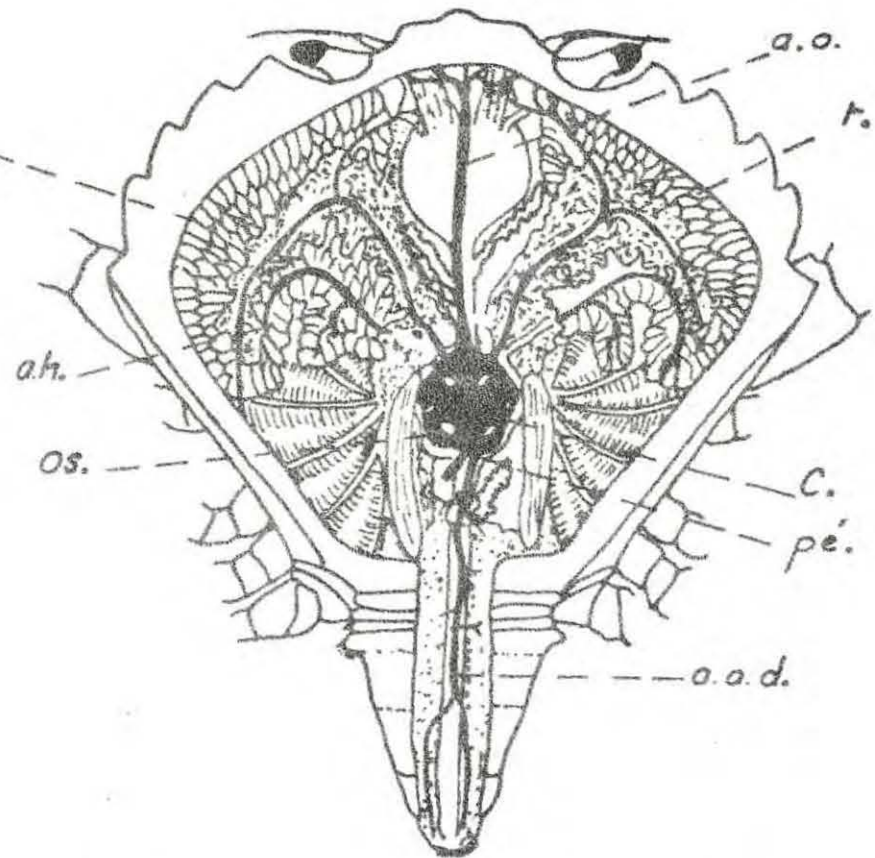


Fig. 10 : Organisation générale du crabe. Dissection thoracale.

- a.o.: artère ophtalmique
- t.: testicules
- a.h.: artère hépatique
- c.: coeur
- os.: ostiole
- pé.: péricarde
- a.a.d.: artère abdominale dorsale

(D'après Dixier, 1957)



Nous développerons préférentiellement les techniques histologiques qui ont été utilisées systématiquement pour tous les contrôles d'huîtres et de crabes.

Chez l'huître, le prélèvement consiste en une coupe antéro-postérieure ou dorso-ventrale d'une tranche de chair comprenant du manteau, des palpes, des filaments branchiaux, de la masse digestive et des gonades (fig. 11 et 12).

Chez le crabe, les fixations concernent le cœur, prélevé dès l'ouverture de l'animal, puis après examen macroscopique, une partie de l'oesophage, de l'intestin moyen, du caecum intestinal postérieur et du rectum.

Pour chaque animal, toutes les pièces prélevées sont mises dans un pillulier numéroté et enregistré, et fixées généralement par le liquide aqueux de Bouin. Dans quelques cas, nous avons utilisé le Carnoy 2 pour réaliser ultérieurement des colorations spécifiques (ex : Feulgen). Les opérations et les compositions des produits employés sont données en annexes (3 à 6).

Après déshydratation et imprégnation à la paraffine (60°C), les échantillons sont inclus dans cette dernière, tout en étant convenablement orientés afin d'obtenir ultérieurement le plan de coupe désiré.

Les blocs de paraffine contenant les pièces sont débités à l'aide d'un microtome en coupes fines d'épaisseur de 6  $\mu$ . En diagnostic de routine seulement deux coupes sériées sont traitées et observées, car les échantillons sont très nombreux.

Dans notre expérience où les lots comportent relativement peu d'huîtres (max. 60), nous avons préféré travailler sur trois coupes pratiquées à des niveaux différents des pièces, pour diminuer les risques d'erreur. En effet, une étude de statistique a été faite portant sur trois niveaux de coupe d'un lot d'huîtres parasitées (TIGE et col., 1980, sous presse). Les résultats ont donné 10, 11 et 12 huîtres parasitées sur 32 huîtres examinées. Les intervalles ont été de 5 huîtres au risque 0,05 et 11,4 huîtres au risque 0,01.

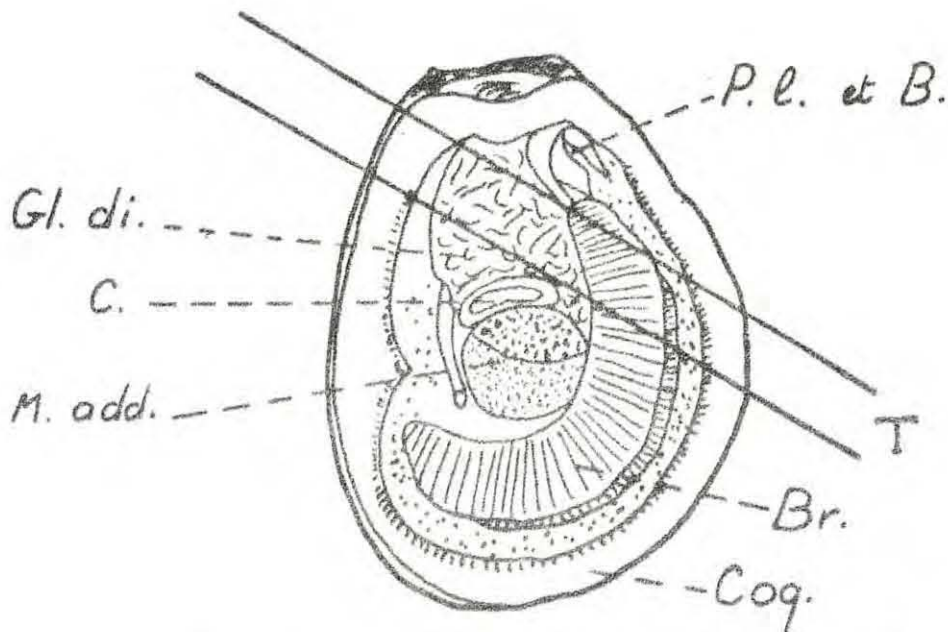


Fig. 11 : Anatomie générale d'une huître plate

T : tranche d'huître prélevée pour la fixation

Br. branchie ; coq. coquille ; c. cœur ; Gl. di. glande digestive ; M. add. muscle adducteur ; P.l. et B. palpes labiaux et bouche.

(Schéma inspiré de Valae, 1974)

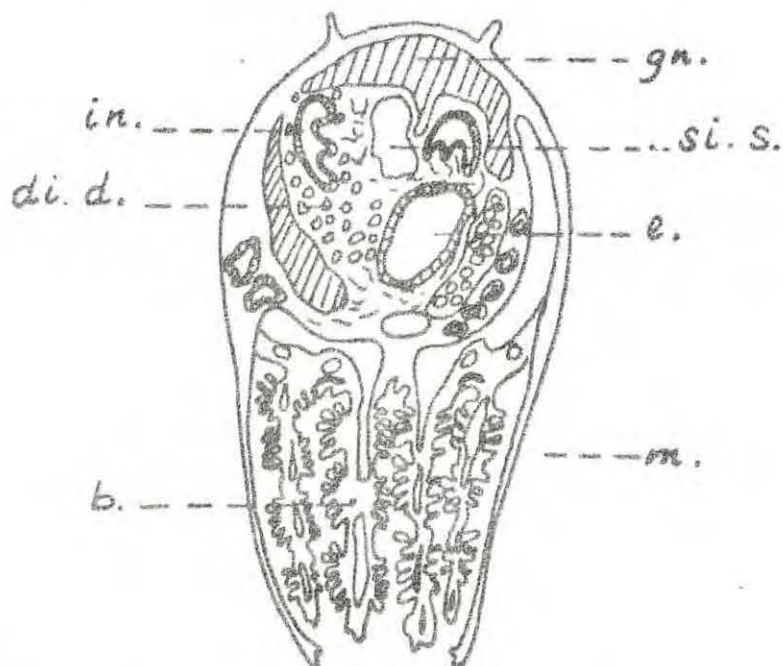


Fig. 12 : Section transversale de l'huître

b. branchie ; di. d. diverticules digestifs ; e. estomac ; gn. : gonade ; in. intestin ; m. : manteau ; si. s. : sinus sanguin.

(D'après Galtsoff, 1964).

Préalablement à la coloration, on réhydrate les coupes. La coloration de PPEWANT (variante de GABE) a été utilisée pour les huîtres. Pour les crabes, deux colorations ont servi : l'hémalum picro-indigocarmin (le plus utilisé) et l'Azan de Heindenhein.

#### 4.4. Suivi de l'expérience

Au cours de cette expérience d'une durée de 3 mois (du 19 mai au 20 août), nous avons relevé quotidiennement pour chaque bac les mortalités survenues sur les huîtres et les crabes, et la température de l'eau.

Il a fallu également assurer la surveillance de la salinité, de l'aération et maintenir une production phytoplanctonique.

##### 4.4.1. Les aquariums

###### Salinité

La salinité initiale de l'eau de mer pompée en rivière de La Trinité est de 25,2 g/l (mesure effectuée au densimètre de précision,  $d = 1,018$  à  $15^{\circ}7$ ). Cette salinité a rapidement évolué, essentiellement dans les bacs thermostatés du fait de l'évaporation, pour atteindre dans quelques cas un maximum de 42 ‰ (densité : 1,020,7 à  $21^{\circ}C$ ).

Nous avons donc procédé par quatre fois à un réajustement progressif de ce facteur par addition d'eau distillée, de façon à obtenir une salinité de 33 ‰. Il faut noter que ces variations progressives ne semblent pas avoir affecté les huîtres. Celles-ci peuvent en effet supporter des salinités de 45 ‰, les salinités optimales se situant entre 32 et 37 ‰ (MARTEIL, 1976).

###### Température

Dans la première salle, tous les bacs sont à température ambiante. Cette dernière a varié au cours de l'expérience entre  $15^{\circ}6$  et  $21^{\circ}5$  C.

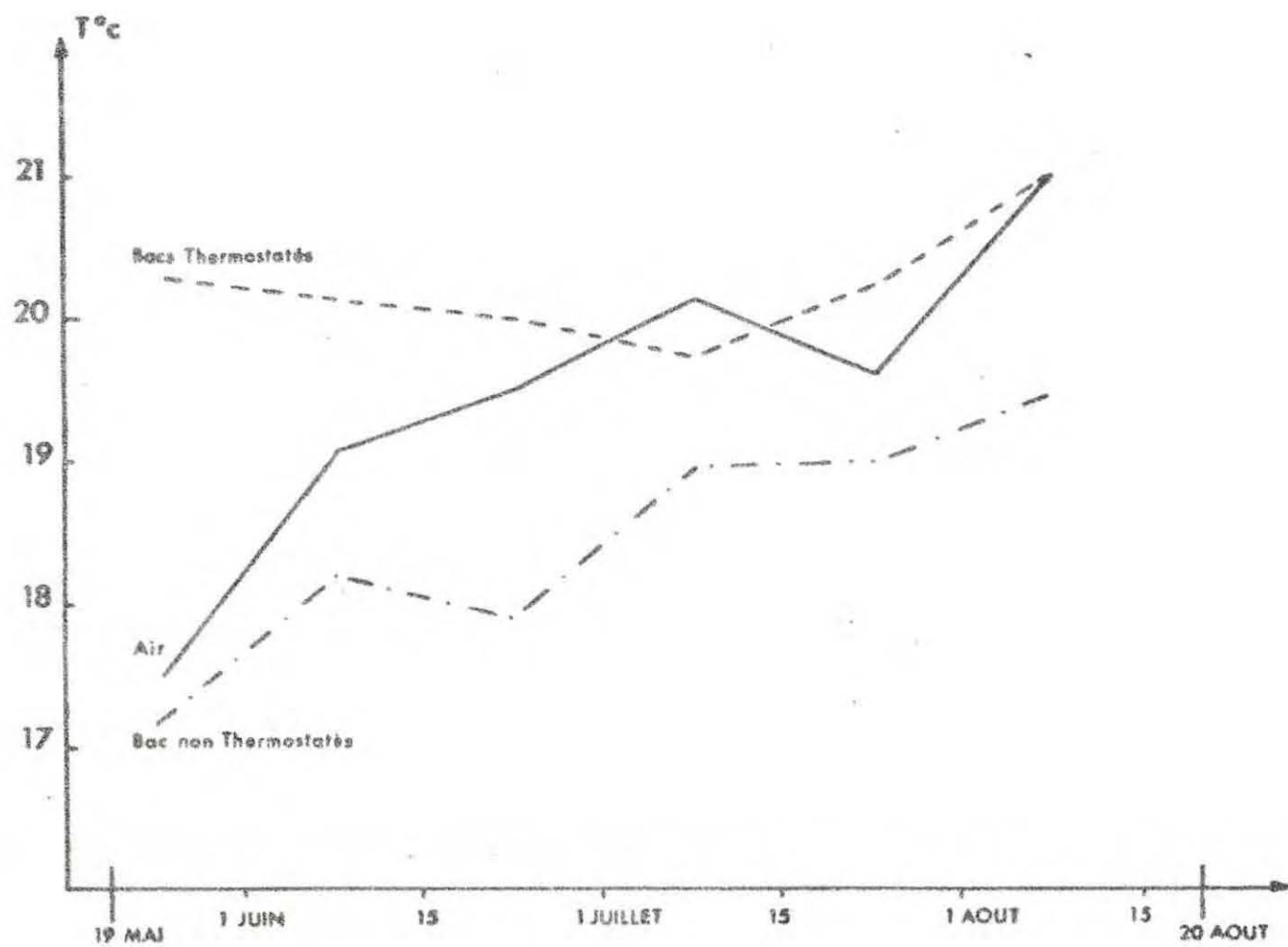


Fig. 13 : Moyennes des températures de l'air des bacs non thermostatés et des bacs thermostatés au cours de l'expérience.



La fluctuation des températures de l'eau des bacs est similaire à celle de l'air, l'écart thermique étant de 5° (mini 15°, maxi 20°) (fig. 13).

Dans la seconde pièce, la température de la série de bacs thermostatés numérotés de 11 à 17, est programmée à 20°. Elle a en fait fluctué légèrement au-dessous et légèrement au-dessus de ce point. Les maximums (22°) sont notés pendant la période chaude du mois d'août.

#### Aération et salissure des bacs

Initialement, l'aération au niveau du bac est assurée par un seul diffuseur. Cependant, au cours de l'expérience, le développement de salissures dans certains bacs, nous a conduit à doubler, voir tripler, ces diffuseurs.

Les salissures sont surtout constatées dans les bacs contenant des gros crabs, provenant de zones non parasitées. Elles sont composées de matières organiques diverses en décomposition (féces, morceaux d'huîtres et de crabs) qui entraînent un accroissement de la consommation en oxygène et provoquent une augmentation notable de turbidité. Ces deux actions conjuguées sont certainement la cause de mortalités constatées. Le rôle du premier facteur est bien connu celui du deuxième intervient sur l'activité valvaire (MURPHY, 1931 ; HIS, 1977) et sur la filtration, pouvant entraîner un colmatage du filtre branchial.

#### 4.4.2. La nourriture

En routine d'élevage deux litres de chacune des souches (*Tetraselmis* et *Monochrysis*) sont versées dans chaque bac deux fois par semaine.

La densité des cultures utilisées est de 570 000 à 10 000 000 cellules/ml pour *Tetraselmis* et 800 000 à 2 230 000 cellules/ml pour *Monochrysis*.

Les crabs des bacs contenant les huîtres de l'expérience, sont livrés à leur rôle naturel de prédateur et de nécrophage.

Les crabes des bacs témoins, sont nourris une fois par semaine avec des huîtres *Crassostrea gigas* prélevées en rivière d'Auray (2 huîtres par bac).

#### 4.4.3. Mortalités

Au cours d'une première mise en place de l'essai d'infestation, nous avons constaté très rapidement d'importantes mortalités particulièrement chez les huîtres provenant de La Rochelle.

L'analyse de ces mortalités nous conduit à penser qu'elles résultent :

- du stress subit lors du voyage (huîtres d'eau profonde, mauvais conditionnement, présence à l'arrivée de beaucoup de salissures et spiphytes en décomposition) ;
- de la densité d'huîtres mises en présence dans les bacs (essai de 120 huîtres/bac initialement).

Devant ce fait, nous avons remis en place de nouveaux bacs avec les huîtres restantes ayant supporté cette période transitoire. De plus, nous sommes convenus de diminuer le nombre d'huîtres et de crabes par bac (cf. annexe 1).

D'autre part, des mortalités massives sont survenues au cours du mois de juin dans le bac 2 (moins d'un mois après le début de l'essai) dues à la trop forte charge de départ et le défaut d'aération. De plus, la lecture histologique des crabes fixés, a révélé une septicémie généralisée.

L'étude ultérieure rapportée dans les résultats concernent donc les animaux de ces nouveaux bacs à l'exception du bac n° 2.

#### 4.4.4. Prélèvements

Initialement un sacrifice intermédiaire avait été prévu mais étant donné le contexte de l'expérience et le peu d'huîtres (relatif) de chaque bac, nous avons fait qu'un sacrifice final le 20 et 21 août.

Cependant, au cours de l'expérience, les huîtres baillantes étaient retirées et fixées.

#### 4.4.5. Analyse critique

Les opérations quotidiennes de routine représentent une part importante du temps de travail. Afin de limiter cette période, et malgré l'aide d'une personne pour réaliser les différentes tâches, j'ai dû réduire sciemment le nombre de bacs et d'huîtres prévus pour réaliser ces expériences dans le temps imparti.

Ces nombres, certes insuffisants pour mener une étude complète basée sur des vérifications statistiques utilisant des méthodes performantes (moyenne variance), nous ont néanmoins permis, comme nous le verrons, d'interpréter l'expérience en s'appuyant sur la présence ou l'absence de parasite sur coupes histologiques et sur des méthodes statistiques moins poussées (intervalles de confiance d'un pourcentage).

Ce travail a demandé également du temps pour éliminer certaines difficultés rencontrées lors de la mise en place de l'essai. Une période de préadaptation des coquillages nous paraît maintenant nécessaire pour déterminer au mieux les conditions expérimentales. Celles-ci comme nous l'avons constaté dépendent du bon conditionnement des animaux lors du transport, mais également du "biotope expérimental" (densité, température, salinité, aération, nourriture, etc.).

Parmi les facteurs de ce biotope, il ne faut pas négliger la salinité. En effet, celle-ci peut provoquer des réactions d'adaptation surtout lors de transferts d'huîtres plates dans des milieux de salinité différente.

D'après SCHLIMPPER (1955) et RICCI (1957), la durée d'acclimatation est proportionnelle à l'amplitude de la variation. Pour *Ostrea edulis*, elle peut demander de deux à trois semaines, au-delà la croissance reprend ou la mortalité apparaît. Ainsi, un tel phénomène a pu intervenir lors des mortalités initiales constatées, se greffant aux causes que nous avons évoquées.

L'aération est également un facteur primordial surtout lorsque les animaux se trouvent dans des situations critiques résultant soit d'une forte densité, soit d'une eau chargée en matière organique. Les deux cas se traduisent par une consommation élevée d'oxygène. Nous avons dû pallier à ces inconvénients à deux reprises, en diminuant initialement le nombre d'animaux et en multipliant au cours de l'expérience les arrivées d'air dans les bacs les plus sensibles.

La production d'une nourriture adhoc, nous a paru nécessaire, vu la durée de l'essai. Le choix d'algues nous a posé le problème de leurs cultures. Celles-ci, réalisées dans des conditions d'asepsie pas toujours idéales, se sont dans l'ensemble bien déroulées. *Tretraselmis* s'est très bien comporté. *Monochrysis* pose des problèmes lors des repiquages. Elle paraît être très sensible à la qualité d'eau, or nous n'en avons pas toujours disposé en période estivale (forte turbidité et nombreuses pollutions bactériennes).

Enfin, si la production a pu être assurée sur un plan qualitatif, nous sommes limités sur le plan quantitatif. Cette restriction se traduit au niveau du choix de la quantité de nourriture qui dépend donc plus de nos possibilités de production que des besoins réels des huîtres.

Ce manque probable de nourriture lié au constat d'une croissance de la coquille, peut permettre d'expliquer la maigreur de certains animaux en fin d'expérience.

L'utilisation d'algues lyophilisées (ROBIDJ, communication personnelle) aurait peut être été plus rationnelle dans le contexte de notre expérience, nous dégageant du temps libre et nous permettant d'accroître le rythme d'alimentation.



## 5. Résultats

### 5.1. Evaluation des mortalités

Toutes les mortalités sont reportées dans les tableaux par quinzaine.

#### 5.1.1. Essai à température ambiante

##### Comparaison des témoins huîtres

Nature des lots	Mai		Juin				Juillet				Août		% global de mortalité	n° du lot
	19	31	1	15	15	30	1	15	16	31	1	20		
Témoin HNP Bac 6 (60)											2 % (1)	2 % (1)*	I	
Témoin EP Bac 5 (60)	23 % (14)		15 % (9)		5 % (3)		8 % (5)		13 % (8)		5 % (3)	70 % (42)	II	
Témoin HNP Séjour avec CZNP Bac 4 (60)			13 % (8)		3 % (2)		12 % (7)		5 % (3)		5 % (3)	38 % (23)	III	

Ce sont surtout les pourcentages globaux des tableaux qui ont retenu notre attention.

Un test du  $\chi^2$  ne peut pas être utilisé car les données sur la mortalité théorique d'huître due uniquement à l'expérience sont insuffisantes.

Cependant, il paraît intéressant de calculer les intervalles de confiance des pourcentages observés pour les comparer ultérieurement aux pourcentages de mortalités des séries actives.

\* (x) = effectif réel observé.

Intervalle de confiance de I

Selon LANOTTE  $q = \frac{r}{n} = \frac{1}{60}$  : les limites inférieures et supérieures sont alors :  $0,004 < q < 0,039$      $0,02 < r < 5,34$   
 $0 \% < P_I < 10 \%$

Intervalle de confiance de II

$$q = \frac{r}{n} = 0,7 \quad \sigma = \sqrt{\frac{q(1-q)}{n}} = 0,059$$

$$I_{II} = 0,7 \pm 0,12 \quad 59 \% < P_{II} < 82 \%$$

Les mortalités de (I) et (II) sont très significativement différentes. Ces résultats s'accordent avec les relations de cause à effets (présence *Bonamia* - mortalité d'huîtres) notées après deux ans d'observations sur le terrain. Dans les conditions expérimentales où l'huître est soustraite à tout prédateur, il est raisonnable de penser que les mortalités sont effectivement dues à *Bonamia ostreae*.

D'autre part, les six pourcentages de II diffèrent significativement (test d'indépendance du  $\chi^2$ ,  $\chi^2 = 14,06$  au seuil 5%.  $\chi^2_{5 \text{ théorique}} = 11,07$ ) (SCHWARTZ, 1969). Il y a donc un facteur temps : la mortalité a été plus forte en début d'essai. C'est en fait imputable soit à l'expérience soit à la forte pathogénie du parasite.

Intervalle de confiance de III

$$q = \frac{r}{n} = \frac{23}{60} \quad 0,261 < q < 0,518$$
$$26 \% < P_{III} < 52 \%$$

Enfin la comparaison des intervalles de confiance des lots (I) et (III) montre également une différence significative, imputable à la présence de crabes.

Comparaison des témoins crabes

Nature du lot	Mai		Juin				Juillet				Août		% global de mortalité	n° du lot
	19	31	1	15	16	30	1	15	16	31	1	20		
Témoin CZMP Bac 7 (20)			15 % (3)	30 % (5)	5 % (1)	10 % (2)					25 % (5)	85 % (17)	IV	
Témoin CZP Bac 18 (20)			20 % (4)								5 % (1)	25 % (5)	V	

Le comportement cannibale et nécrophage du crabe nous a amené à traiter à part ce tableau de témoins.

Intervalle de confiance de IV

$$q = \frac{r}{n} = \frac{17}{20} \quad \sigma = \sqrt{\frac{q(1-q)}{n}} = 0,0798$$

$$i_{IV} = 0,85 \pm 0,16 \quad 59 \% < P_{IV} < 100 \%$$

Intervalle de confiance de V

$$q = \frac{r}{n} = \frac{5}{20} \quad \sigma = \sqrt{\frac{q(1-q)}{n}} = 0,090$$

$$i_V = 0,25 \pm 0,19 \quad 6 \% < P_V < 44 \%$$

La formule du  $\chi^2$  de LANOTTE donne le même résultat : ces deux pourcentages sont significativement différents. On devrait pouvoir conclure à une association positive entre la mortalité et l'appartenance au groupe CZMP. En fait, il n'en est rien car, pour apprécier la notion d'indépendance et d'association, il aurait fallu disposer de crabes de même taille, ayant subi les mêmes traitements.

Les conditions d'expérience peuvent permettre d'expliquer ce résultat. En effet, les crabes utilisés sont de taille différente, ceux de zone parasitée (CZP) étaient beaucoup plus petits que ceux de zone non

parasitée (CZNP). L'activité supérieure des gros crabes a engendré des problèmes de maintien dans les bacs (aération, turbidité) qui ont abouti à des mortalités précoces de crabes et d'huîtres (bacs 2, 10 et 14). Aucune perturbation notable n'a été observée avec les petits crabes.

Aussi, les mortalités de crabes des différents bacs ne seront plus discutées ici. Elles sont reportées au niveau du tableau global des mortalités en annexes (7, 8 et 9).

Comparaison des huîtres de la série active

Nature des lots	Mois		Mai			Juin			Juillet			Août		% global de mortalité	N° des lots
	19	31	1	15	16	1	15	16	1	15	16	1	20		
HNP Bac 1 (60)												5 % (3)	5 % (3)	VI	
HNP Bac 9 (60)				2 % (1)								3 % (2)	5 % (3)	VII	
HNP Suspension Bac 8 (60)								2 % (1)	3 % (2)			5 % (3)	10 % (6)	VIII	
HNP Séjour avec CZP Bac 3 (60)				22 % (13)								3 % (2)	25 % (15)	IX	
HNP Séjour avec CZP Bac 10 (60)			2 % (1)	2 % (1)				13 % (8)	47 % (28)			15 % (9)	78 % (47)	X	
HP Bac 1 (20)			15 % (3)	15 % (3)	5 % (1)								35 % (7)	XI	
HP Bac 9 (20)			20 % (4)	30 % (6)				25 % (5)					75 % (15)	XII	

Tableau 3



Dans le tableau 3 sont reportées les mortalités de lots d'individus différents. Par comparaison entre elles d'une part et aux témoins d'autre part, nous allons essayer de dégager quelques points marquants.

Les couples (VI), (VIII) et (XI), (XII) sont respectivement identiques dans les conditions d'expérience.

Alors que les premiers ont eu un comportement globalement identique, s'apparant à celui du témoin HNP (I), les lots XI et XII diffèrent significativement.

Le lot (XII) se comporte comme le lot témoin parasité (II). Il est possible de penser que le lot XI a présenté une proportion anormalement peu élevée d'huîtres infestées au départ.

Cependant un point commun subsiste entre ces trois lots (II), (XI et XII) : les mortalités les plus élevées de ces huîtres parasitées sont apparues surtout en début d'expérience.

Le pourcentage global 10 % du lot (VIII) est compris entre l'intervalle de confiance de (I) (borne supérieure). Nous avons cependant tester ce résultat "limite" par une méthode exacte qui est le calcul de la probabilité d'obtenir dans deux groupes une différence dans l'hypothèse d'équivalence. Si cette probabilité est très faible, on rejette l'hypothèse d'équivalence : la différence est significative (LANOTTE, 1971) :

$$P_1 = \frac{7 \mid 113 \mid 60 \mid 60 \mid}{1 \mid 6 \mid 59 \mid 54 \mid 120 \mid}$$

$$P_2 = \frac{7 \mid 113 \mid 60 \mid 60 \mid}{2 \mid 5 \mid 59 \mid 55 \mid 120 \mid}$$

$$P_3 = \frac{7 \mid 113 \mid 60 \mid 60 \mid}{3 \mid 4 \mid 57 \mid 56 \mid 120 \mid}$$

$P = 0,483$ . Or  $2 \Sigma P$  est supérieur au seuil 0,05 (5 %) généralement adopté, c'est-à-dire que la différence observée ne doit pas être considérée comme significative mais simplement due au hasard.

Les lots (IX) et (X) d'huîtres ayant séjourné avec des crabes, expérimentalement identiques, diffèrent à la fois entre eux de façon très significative et du témoin (III) ( $26 \% < P_{III} < 52 \%$ ). Le comportement des crabes est trop différent d'un bac à l'autre (IV et V) pour pouvoir comparer celui des huîtres dans ces mêmes bacs. Les huîtres de La Rochelle, dont la coquille était très fragile, étaient attaquées par les plus gros crabes alors qu'elles ne subissaient pas de mortalité par prédation dans les bacs à petits crabes. Dans le même temps, elles s'asphyxiaient par colmatage des branchies. Nous ne reviendrons pas sur les séries où les huîtres et les crabes sont mélangés. Nous nous contenterons de reporter les mortalités observées dans le tableau global (annexes 7, 8 et 9).

### 5.1.2. Essai à 20°C

#### Comparaison des témoins huîtres

Nature des lots	Mois		Mai				Juin				Juillet				Août		% global de mortalité	N° du lot
	19	31	1	15	16	30	1	15	16	31	1	20						
Témoin EHP Bac 16 (60)			1,6 % (1)											5 % (3)	6,6 % (4)	XIII		
Témoin HP Bac 17 (50)	15 % (9)		10 % (6)		2 % (1)		10 % (6)		8 % (5)				3 % (2)	48 % (29)	XIV			

En se basant toujours sur les pourcentages globaux, nous comparons entre elles les séries à 20°C, puis celles à température ambiante.

#### Intervalle de confiance de XIII

$$q = \frac{r}{n} = \frac{4}{60} \quad 0,018 < q < 0,162$$

$$2 \% < P_{XIII} < 16 \%$$

Intervalle de confiance de XIV

$$q = \frac{r}{n} = \frac{29}{60} \quad 0,352 < q < 0,612$$

$$35 \% < P_{XIV} < 65 \%$$

Les témoins (XIII) et (XIV) restent significativement différents et confirment la différence entre (I) et (II) (témoin HNP et HP à température ambiante).

Les mortalités de témoins HNP à température ambiante et à 20°C sont similaires. Par contre les comportements des lots (XIV) et (II) ne sont pas comparables, mais s'assimilent à la différence de comportement déjà observée entre les lots (XI) et (XII).

Comparaison des huîtres des séries actives

Nature des lots	Mois		Mai				Juin				Juillet				Août		% global de mortalité	N° du lot
	19	31	1	15	16	30	1	15	16	31	1	20						
HNP Bac 12 (60)			1,6 % (1)										5 % (3)		6,6 % (4)	XV		
HNP Suspension Bac 15 (60)					1,6 % (1)				1,6 % (1)						3,3 % (2)	XVI		
HP Bac 12 (20)	15 % (3)		5 % (1)		5 % (1)		5 % (1)								30 % (6)	XVII		

L'analyse de ce tableau, comparée à celle de la série active à température ambiante, conduit aux mêmes observations :

- le comportement des huîtres de La Rochelle ne diffère pas des 2 témoins HNP. Ces deux méthodes d'infestation par juxtaposition et par broyats ne font donc pas apparaître de mortalités anormales à 20°C comme à température ambiante,



- un comportement identique à tous les lots parasités (20°C et température ambiante) : les mortalités apparaissent en début d'expérience.

### 5.1.3. Discussion - conclusion

Les mortalités observées sur les huîtres parasitées semblent effectivement être dues à *Bonamia ostreae*.

Aucune différence significative n'est apparue entre les séries à température ambiante et celles à 20°C.

Les témoins HNF et les huîtres HNF des séries actives (séjour avec huîtres parasitées sans crabes) ont présenté un comportement semblable. Deux hypothèses sont alors possibles :

- les deux techniques d'infestation (juxtaposition et boyats) n'ont pas permis la contamination des huîtres saines par *Bonamia ostreae*

- la contamination a eu lieu mais la durée de l'expérience n'a pas été suffisante pour qu'apparaissent des mortalités d'huîtres HNF imputables à la maladie.

Cette seconde hypothèse sera vérifiée par l'examen histologique.

La fonction prédatrice et de nécrophage du crabe ne peut être directement mise en cause dans le constat des mortalités. Il nous semble, cependant, qu'elle s'est exercée notablement dans les bacs contenant des crabes de grande taille.

A cela, il faut ajouter l'influence de la turbidité et de la baisse d'oxygène dans certains bacs, comme nous l'avons souligné précédemment.

Chez les huîtres parasitées, deux niveaux de mortalité sont constatés (mortalité moyenne forte : 70 % ; mortalité moyenne faible : 35 %). Cette différence peut s'expliquer par les constats réalisés sur



le terrain. En effet, les pourcentages d'huîtres parasitées varient, en cours d'année, au sein d'un même parc et l'infestation se déplace par taches.

Cependant, l'apparition de la mortalité en début d'expérience reste un point commun à tous les lots d'huîtres parasitées.

## 5.2. Contrôle des témoins initiaux et finaux

### 5.2.1. Huîtres

#### Anatomie normale des tissus sains

Les rappels suivants sont effectués dans le but de pouvoir comparer des tissus sains et des tissus affectés de lésions.

L'appareil respiratoire de l'huître est composé de quatre branchies, chaque lame branchiale étant formée de deux feuillets reliés entre eux par la gouttière marginale et par les jonctions interfoliaires. Chaque feuillet comprend une série de filaments. Chez l'huître plate, leur nombre par pli peut varier entre 9 et 12 (YONGE, 1960). Le filament en section transversale se compose selon ATKINS (1938) de cinq groupes de cils, de cellules à mucus, de fibres musculaires transversales et de baguettes chitineuses constituant le squelette.

Parmi les différentes parties de l'appareil digestif, nous retiendrons surtout l'estomac et les diverticules digestifs (YONGE, 1926). L'épithélium stomacal est caractérisé par des cellules hautes et ciliées à noyaux fusiformes. Les diverticules digestifs sont formés d'un grand nombre d'acinies, composés de cellules larges à gros noyaux sphériques situés près de la basale de l'épithélium.

Le tissu conjonctif d'emballage comprend une trame fibrillaire lâche avec des noyaux fusiformes, de nombreuses cellules sanguines et des cellules de réserve ou cellules de Leydig.

### Résultats de l'analyse microscopique

À leur réception une partie des huîtres de La Rochelle a dû subir un séjour de quelques jours dans de l'eau de mer non filtrée. Nous avons alors fixé deux lots témoins initiaux de 30 huîtres, un premier à la réception et un second pris parmi les huîtres du bassin d'attente.

La lecture histologique de ces deux lots a confirmé l'hypothèse première : les huîtres de la Rochelle étaient au 1er mai indemnes de *Bonamia ostreae* (0/30 et 0/30) \*.

À cette même époque les taux d'infestation des huîtres parasitées de l'île Tudy et Paimpol étaient respectivement 8/25 (lot glané sur parc) et 10/21 (lot semé à 18 mois sur sol à Paimpol). Les huîtres que nous avons utilisées proviennent de ces lots.

Le contrôle final réalisé sur les huîtres de La Rochelle (30 individus), prélevées le 17 septembre n'a lui aussi, pas permis de déceler la présence de *Bonamia ostreae*. L'examen s'est effectué sur les branchies et la masse viscérale. Cette observation confirme que le parasite *B. ostreae* est toujours absent de ce secteur.

### 5.2.2. Crabes

#### Localisation des parasites chez les Brachyours

VIVARES (1969) a mis en évidence la localisation précise des parasites dans l'hôte.

Le tube digestif et ses annexes sont le lieu de prédilection de nombreux parasites. On les trouve aussi au niveau des branchies, des muscles, dans le sang et dans la cavité coelomique.

La figure 14 rappelle la localisation des parasites des Brachyours de Méditerranée. Cette liste établie par VIVARES (1969) n'est pas exhaustive.

\* Tout au long des résultats la notation (x/y) aura pour signification : x huîtres infestées par *Bonamia ostreae* trouvées dans un lots de y huîtres.

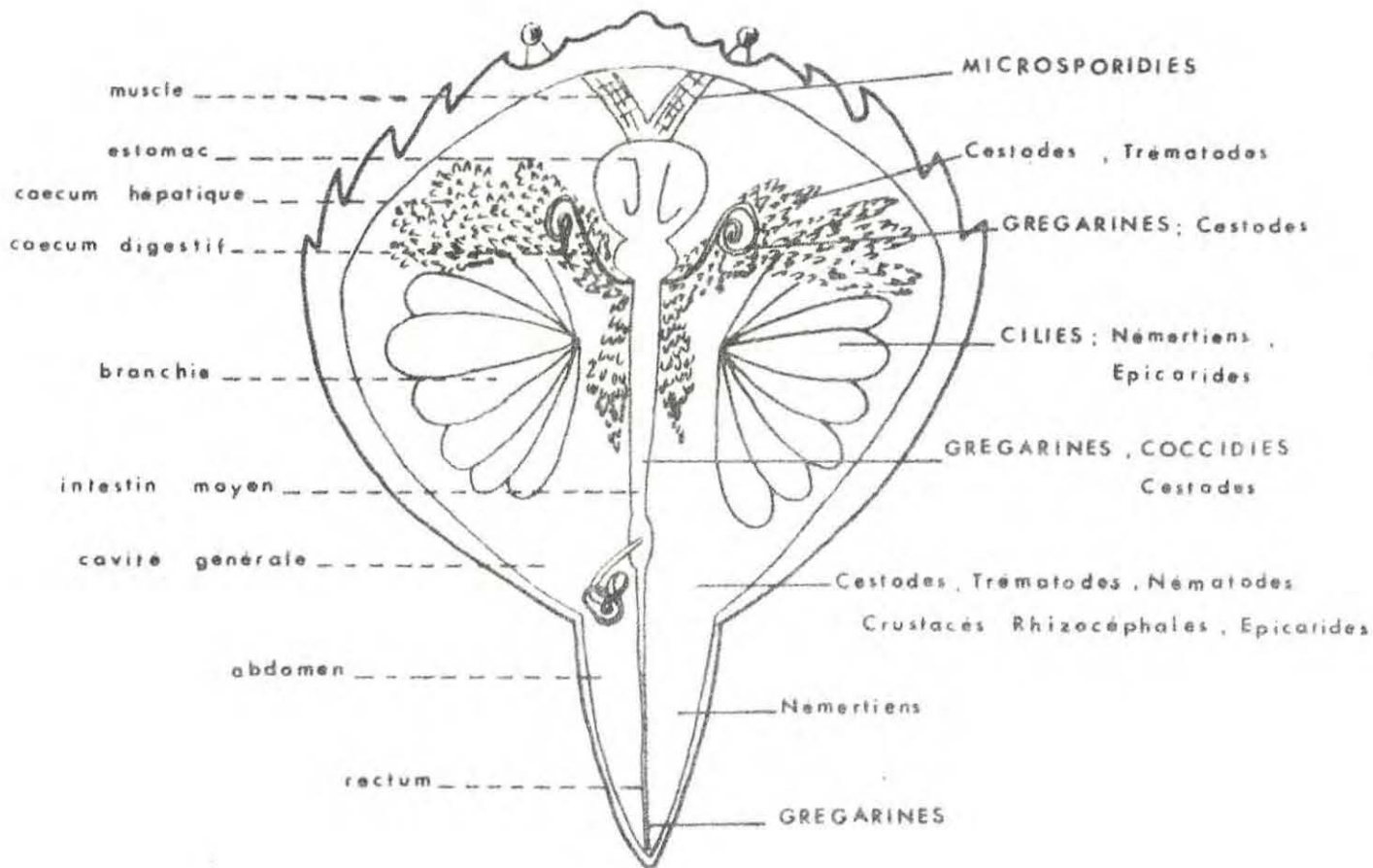


FIG : 14 Localisation des Parasites chez les BRACHYOURES ,  
(selon VIVARES ; 1969)

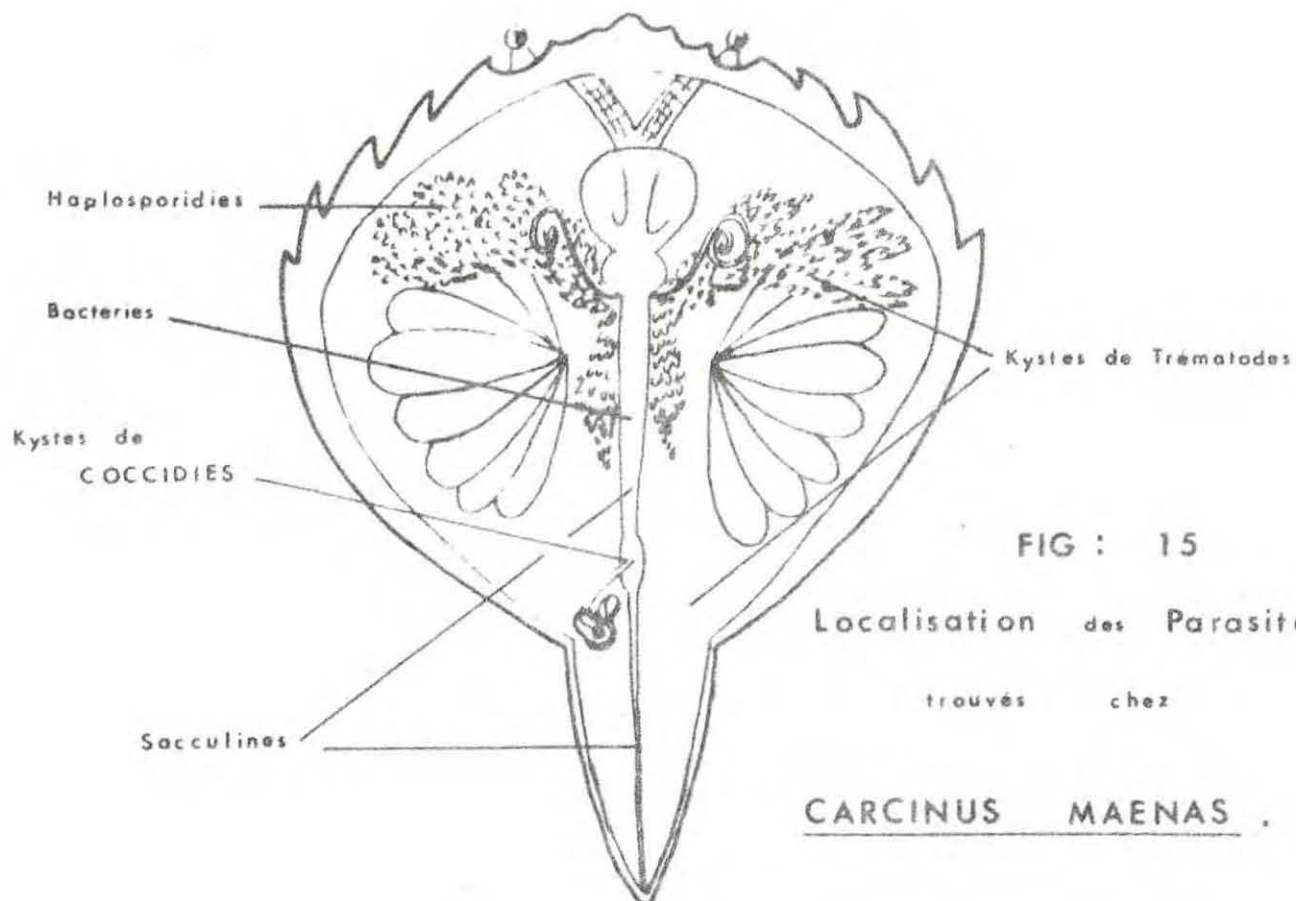


FIG : 15  
Localisation des Parasites  
trouvés chez  
CARCINUS MAENAS .



### Contrôle des lots témoins

Un lot de 25 crabes de zone non parasitée (CZNP, La Rochelle) a été sacrifié à leur réception. Vingt crabes de zone parasitée (CZP), pêchés dans le port de La Trinité-sur-mer, ont servi de témoins départ.

Le tableau ci-dessous résume les observations macroscopiques et microscopiques sur ces deux lots.

Parasites	Lots	Lot témoins	Lot témoins
		25 CZNP	20 CZP
Kystes de Trématodes		4 cas	0 cas
Kystes de coccidies		2 "	1 "
Sacculine		1 "	1 "
Gregarines		0 "	0 "
Nématodes		0 "	0 "
Haplosporidies		1 "	2 "
Bactéries		1 "	1 "

La localisation des parasites que nous avons trouvés sur le crabe vert *Carcinus maenas* (fig. 15) s'accorde avec celle des crabes de Méditerranée (VIVANIS, 1969).

### 5.3. Analyse des séries expérimentales

#### 5.3.1. Huitres

Le suivi histologique des huitres fixées au cours de l'essai (en particulier celles du bac 2) n'a fait apparaître aucun résultat intéressant (durée trop courte dans le bac et trop petit nombre d'huitres fixées).



Analyse macroscopique (planche 1 ; photos 1 et 2)

Seuls les lots qui présentent des indentations ou des perforations des branchies sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Lots \ Cas	Indentation	Perforation	Franchie érodée
Lot VI HNP Bac 1 (57)	1 primaire	1 secondaire	
Lot II HP Bac 5 (18)	2 primaires 1 secondaire		1 cas
Lot XV HNP Bac 12 (49)	2 primaires		
Lot XVII HP Bac 12 (19)			1 cas
Lot XXVI HNP Bac 13	3 primaires		
Lot XXVIII HNP Bac 13	3 secondaires		1 cas
Lot XXX HNP Bac 14	2 primaires		

Le diagnostic des branchies est, comme nous l'avons déjà dit, peu fiable, surtout pour les lésions légères. Sur les huîtres HNP, nous avons uniquement observé des stades primaires d'indentation et une perforation secondaire. Ce fait peut traduire une infestation peu avancée de ces lots, comparée aux lésions profondes des huîtres HP.

Analyse microscopique quantitative

Huîtres témoins

Température ambiante	Témoin HNF (I) Bac 6	Témoin HP (II) Bac 5	Témoin HNF (III) Bac 4
	0/59	2/18	0/37
20°C	Témoin HNF (XIII) Bac 16	Témoin HP (XIV) Bac 17	
	0/55	2/24	

L'analyse du tableau ci-dessus confirme l'hypothèse de départ : les huîtres de La Rochelle sont indemnes de *Bonamia ostreae* et le sont restées au cours de l'expérience, aussi bien au laboratoire que sur le gisement naturel.

Huîtres HNF (avec huîtres parasitées et suspensions)

Température ambiante	HNF (VI) Bac 1	HNF (VII) Bac 9	HNF susp. (VIII) Bac 8		
	2/57	5/58	0/55		
20°C	HNF XV Bac 12		HNF susp. XVI Bac 15	HNF XXVI (CZP) Bac 13	HNF XXX (CZP) Bac 14
	4/49		0/55	6/13	0/24

Dans ce tableau, nous avons essayé de mettre en regard les bacs présentant une composition analogue, à température ambiante et à 20°C.

## Planche 1

Photo 1 : vue macroscopique d'indentation branchiale.

Photo 2 : vue macroscopique de lésions branchiales: indentation et perforation.

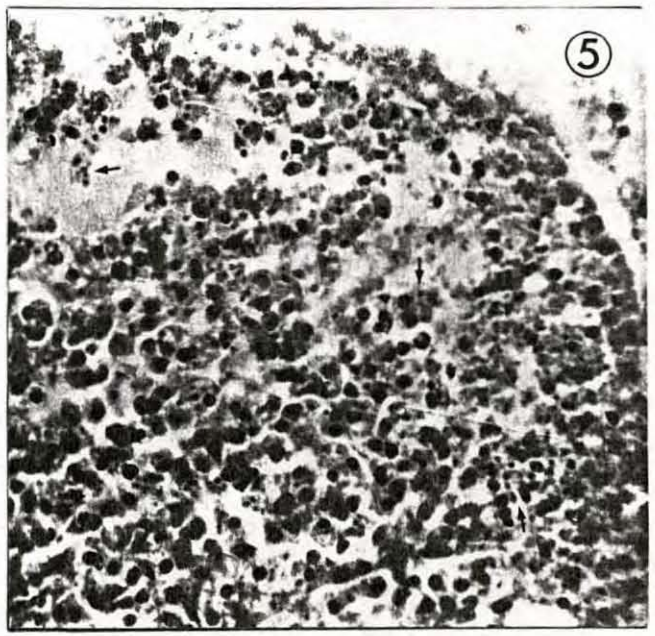
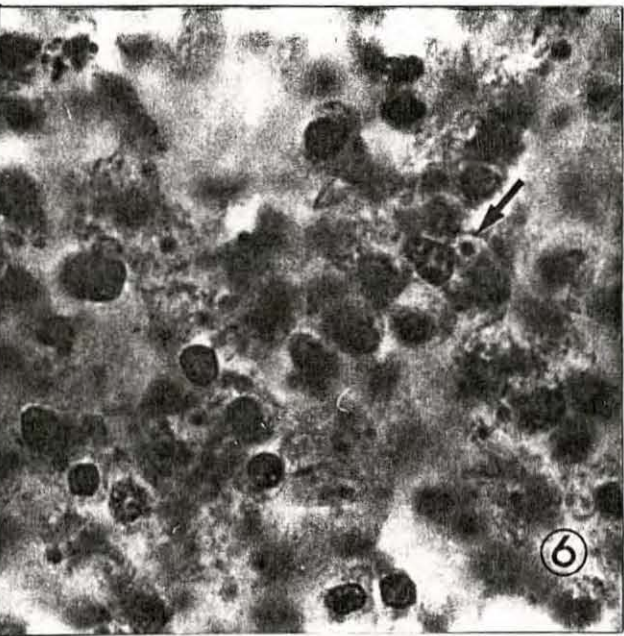
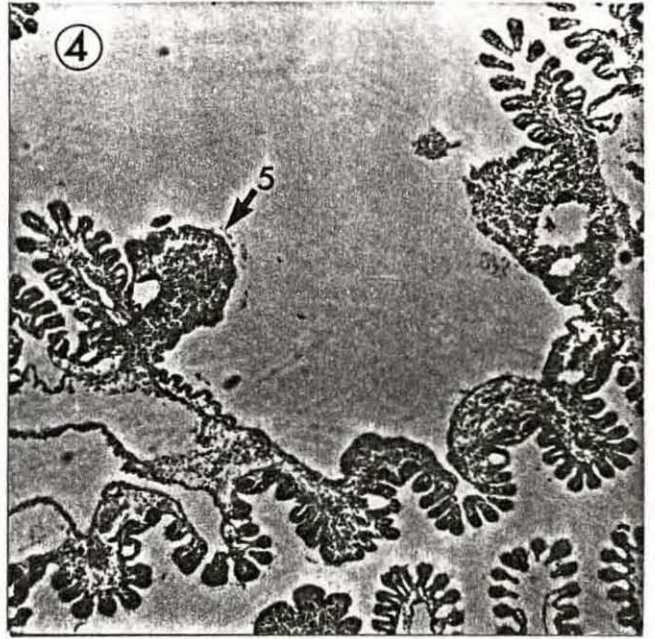
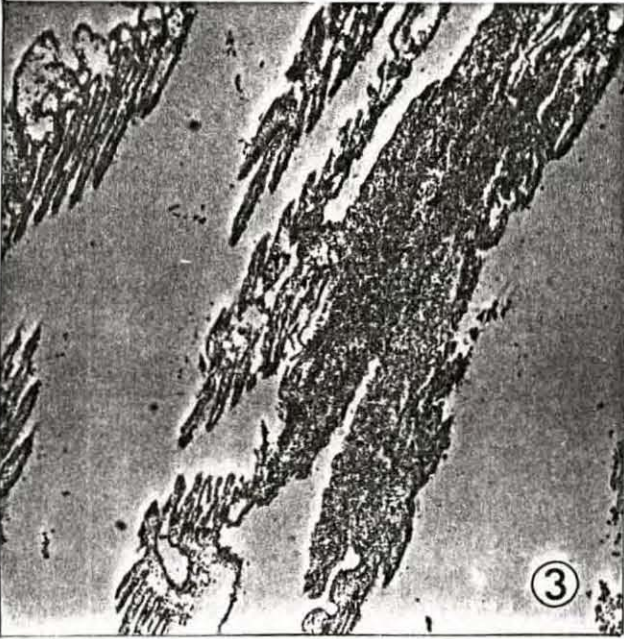
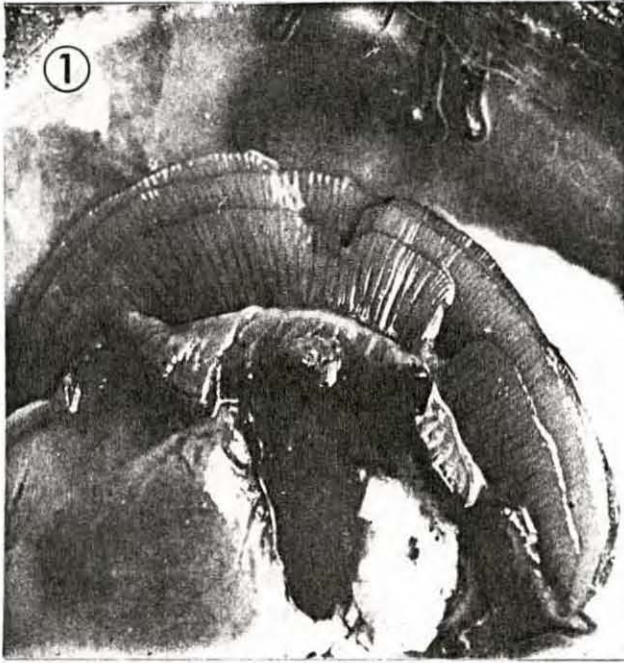
Photo 3 : vue microscopique d'une indentation branchiale. Notez la concentration cellulaire (Gr. X 4).

Photo 4 : coupe au niveau d'une perforation branchiale (Gr. X 4).

Photo 5 : détail d'un filament branchial lésé (Gr. X 40).

Photo 6 : cellules sanguines parasitées par *Bonamia ostreae* (Gr. X 100).







Il ressort nettement que les huîtres HNP qui ont séjourné avec des huîtres parasitées se sont infestées.

Le résultat négatif du lot (XXX) du bac 14 peut s'expliquer par la mortalité massive des huîtres parasitées de ce bac, dès la première quinzaine (annexe 9), faisant intervenir la notion de dilution minimale.

L'infestation par broyats semble ne pas avoir donné de résultat. Deux hypothèses sont alors possibles :

- l'infestation par broyats n'est effectivement pas possible dans ce cas-là : les parasites situés au niveau des branchies (tissus utilisés pour les broyats) ne sont pas suffisamment matures

- l'infestation est possible mais les quantités de parasite introduites dans nos bacs sont insuffisantes.

Huîtres HNP avec crabe uniquement

Température ambiante	HNP IX Bac 3	HNP X Bac 10
	0/45	0/16
20°	HNP XXIX Bac 11	
	0/56	

Dans le tableau ci-dessus sont regroupées les huîtres HNP n'ayant séjourné qu'avec des crabes de zone parasitée (CZP). L'infestation ne s'y est pas réalisée.

Huîtres parasitées

Température ambiante	HP XI Bac 1	HP XII Bac 9	
	0/13	0/5	
20°C	HP XVII Bac 12	HP XXVIII Bac 13	HP XXXI Bac 14
	2/19	1/13	0/2

Ce dernier tableau est à rapprocher des résultats témoins HP (II) et (XIV). Le taux d'infestation au moment du sacrifice final est faible, voir nul.

Ce résultat peut paraître paradoxal. En fait, il peut s'expliquer par plusieurs observations en accord notamment avec celles réalisées sur le terrain et au laboratoire (TIGER, communication personnelle).

Le pourcentage des lots d'huîtres parasitées n'a jamais pu être relié directement avec les pourcentages de mortalité constatée, contrairement à l'épizootie due à *Marteilia refringens*. Ceci suppose que la mortalité survient très rapidement après l'infestation du coquillage. Les essais d'infestation in situ, ont corroboré ce point. La maladie se déplace par tache et n'affecte pas toute une zone ostréicole dans un temps déterminé.

Dans le cas de notre expérience, les mortalités massives notées au début de l'essai sur les huîtres de lots provenant de zone parasitée doivent correspondre effectivement aux individus initialement contaminés. Par la suite, les huîtres restantes de ces lots, qui ne devaient pas être infestées, ont subi le même régime que les huîtres HMP, l'infestation se faisant selon les lois du hasard.

Enfin l'analyse globale de ces quatre tableaux laisse supposer que la température n'a pas de rôle majeur dans le développement de la

maladie. En fait on ne peut pas l'affirmer. Il aurait fallu comparer, par des sacrifices intermédiaires dans les deux séries, les durées nécessaires pour obtenir des infestations à température ambiante et à 20°C.

Analyse qualitative

Les cellules parasitaires sont décelées dans les cellules sanguines au niveau des branchies, de l'épithélium stomacal, du manteau et du tissu conjonctif d'emballage (planches 1 et 2).

D'autre part, nous avons relevé la présence de spores de *Nematopsis* sur deux huîtres dans le tissu conjonctif.

Enfin plusieurs leucocytoses sont notées.

3.3.2. Crabes

Analyse quantitative

Le tableau ci-après résume les observations macroscopiques et microscopiques réalisées sur les crabes fixés en cours d'essai et au moment du sacrifice final. Aucune différence n'apparaissant entre la série à température ambiante et à 20°, nous avons regroupé les résultats des différentes séries.

Parasites et micro-organismes	Lots		Crabes témoins		Crabes avec HNP		Crabes avec HNP + HP		Crabes avec HNP+HP+CZNP+CZP	
	CZNP	CZP	CZNP	CZP	CZNP	CZP	CZNP	CZP	CZNP	CZP
Bactéries										
Stade * intest.		1						1		
Sept.**		2			1		1		5	
Haplosporidies		3			2		1		1	1
Kystes coccidiens		2			2		1		1	1
Kystes trematode	1						1		2	4
Sacculines		1							1	1

\*Stade intestinal

\*\*Septicémie

## Planche 2

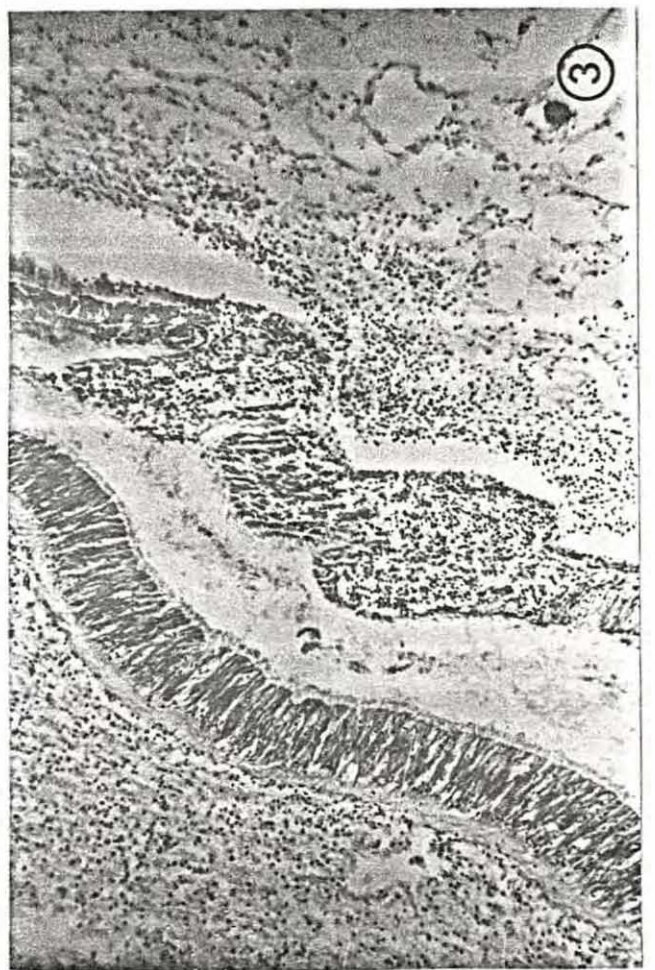
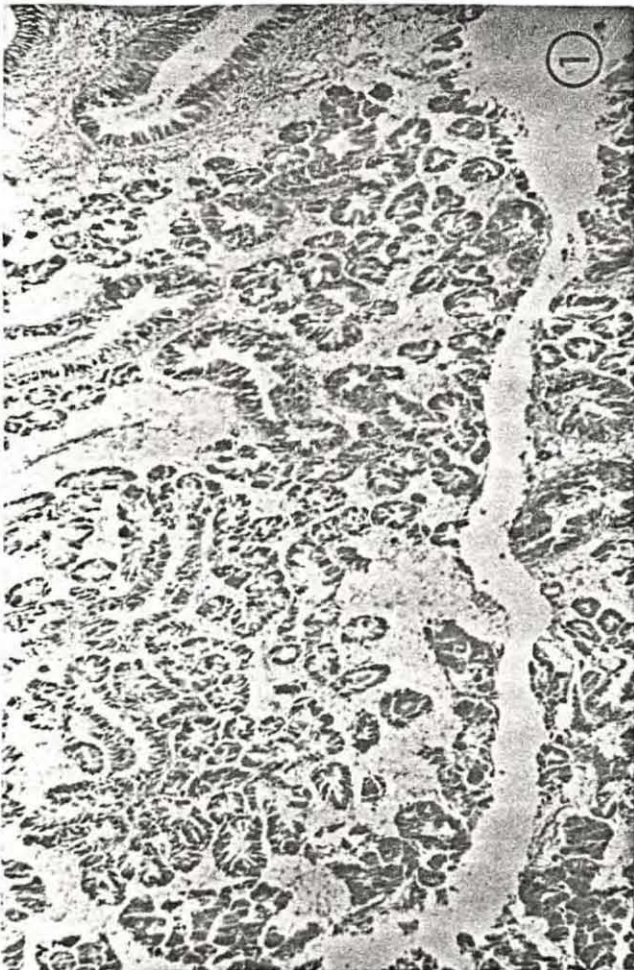
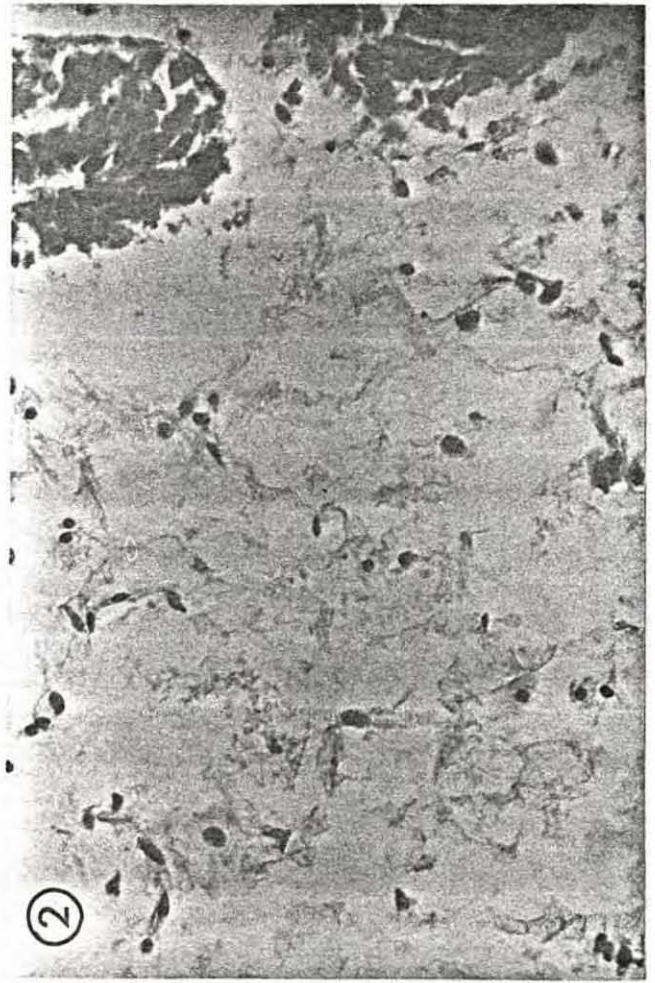
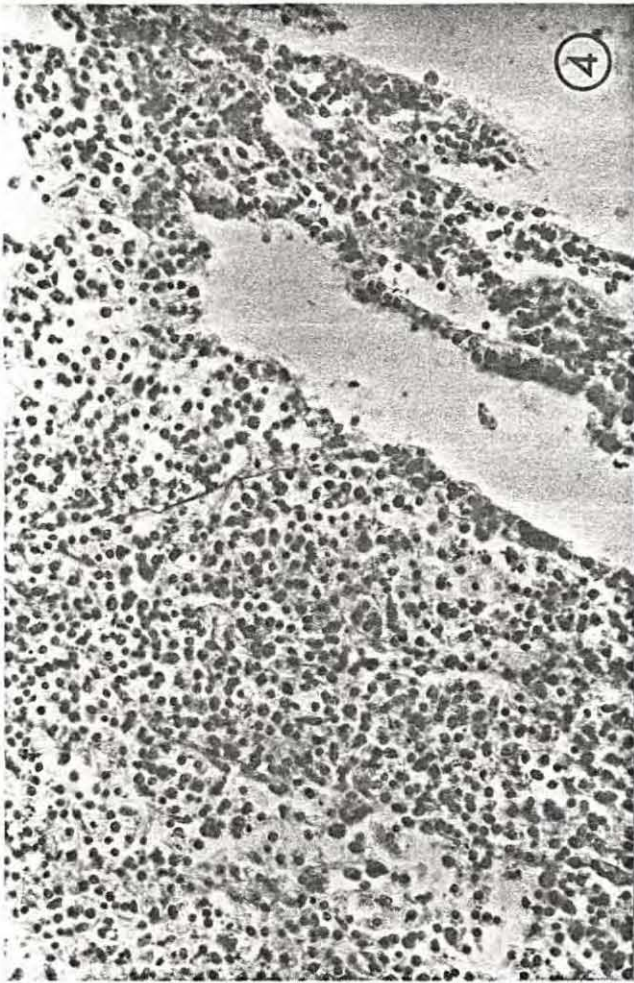
Photo 1 : vue générale des tissus sains de la glande digestive de l'huître plate (Gr. X 4).

Photo 2 : détail du tissu conjonctif sain de l'huître plate. Remarque la faible densité de cellules (Gr. X 40).

Photo 3 : inflammation au niveau de l'épithélium stomacal (Gr. X 10).

Photo 4 : inflammation au niveau du tissu conjonctif (Gr. X 10).







D'après ce tableau, nous remarquerons que :

- l'éventail de la parasitofaune est le même pour les deux provenances de crabes

l'importance numérique des parasites est plus élevée chez les crabes CZP que chez les crabes CZNP.

Parmi ces parasites, le sous-embranchement des sporozoaires est le plus représenté avec 8 cas d'Haplosporidies sp. et 7 cas de Coccidies du genre *Aggregata*.

De nombreuses infestations bactériennes (septicémie) sont notées dans le bac 2, où des mortalités précoces sont survenues.

Aucune figure parasitaire ne semble se rapprocher du parasite *Bonamia*. Le seul parasite, à systématique mal définie (Haplosporidies) qui pourrait éventuellement jouer un rôle dans le cycle de *Bonamia* est présent, dans les analyses des témoins initiaux, chez les crabes des deux origines.

#### Analyse qualitative

Notre attention sera retenue uniquement par les micro-organismes de type bactérien et par les sporozoaires (Haplosporidies et Coccidies).

#### Bactéries (pl. 3, photos 1, 2, 3)

Par deux fois, lors de la dissection de crabes, nous avons remarqué l'écoulement d'une laitance au niveau des blessures engendrées. L'observation en microscopie photonique a permis de noter la présence de très nombreuses petites particules agitées de mouvement brownien. Celles-ci ont été retrouvées sur coupes histologiques dans tous les tissus (septicémie généralisée) soit sous forme libre, soit regroupées dans des enveloppes ou encore dans des cellules.

L'étude de ces particules au microscope électronique a permis de mettre en évidence la présence de micro-organismes structurés de type bactérien (photo 1).

### Planche 3

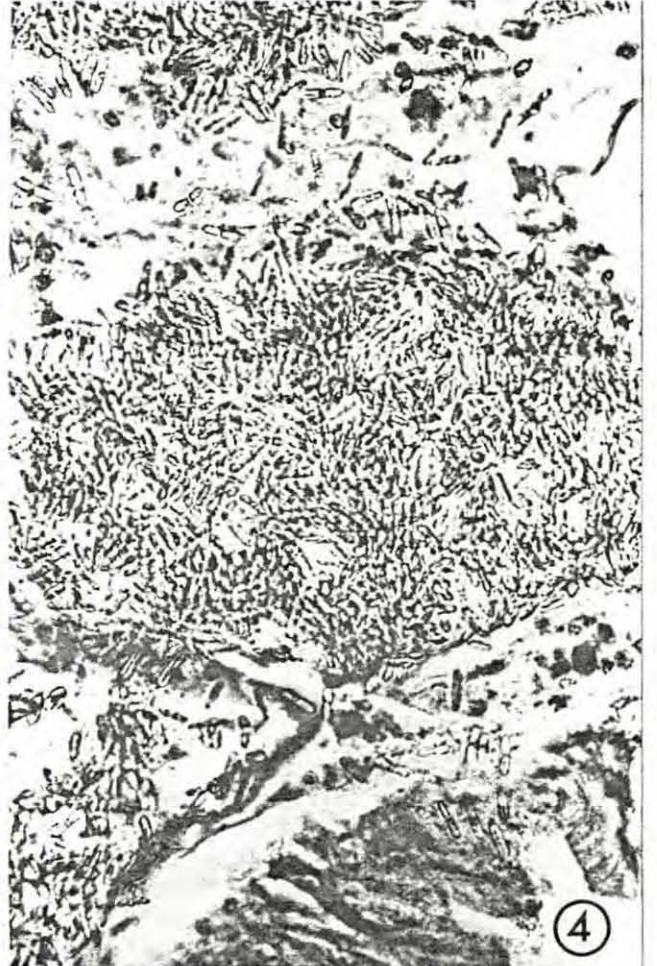
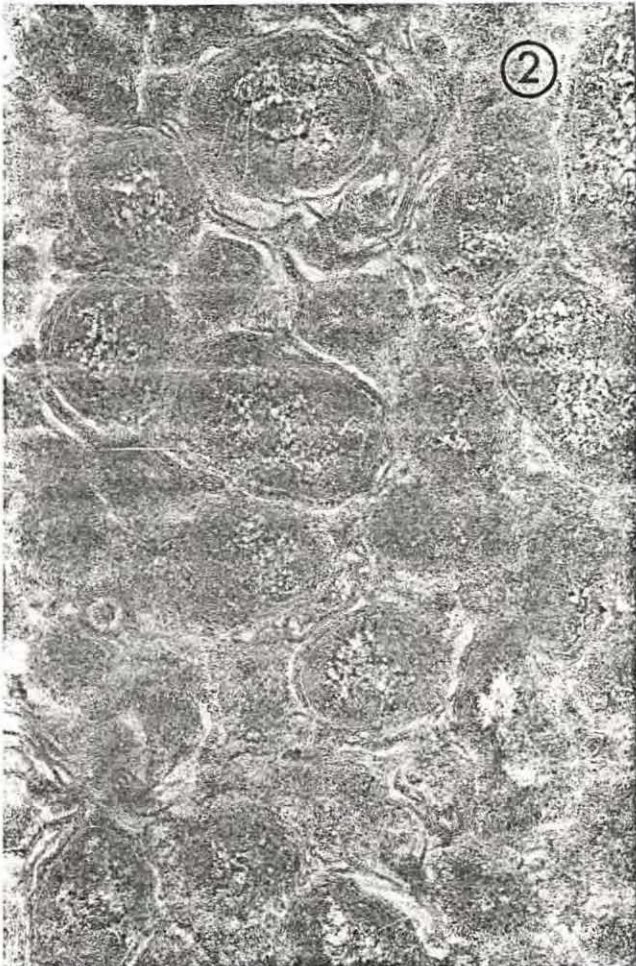
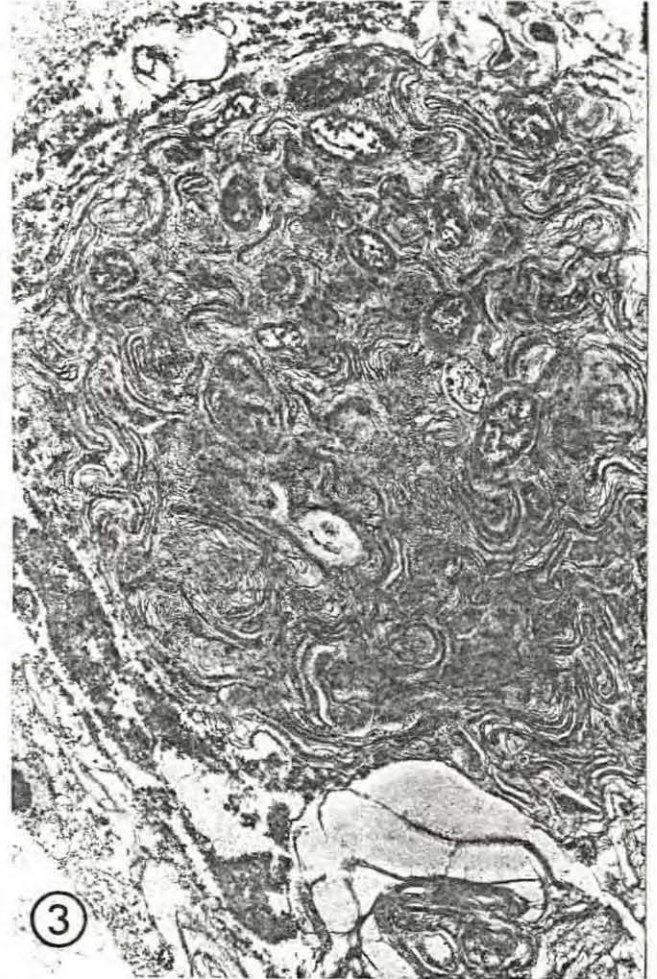
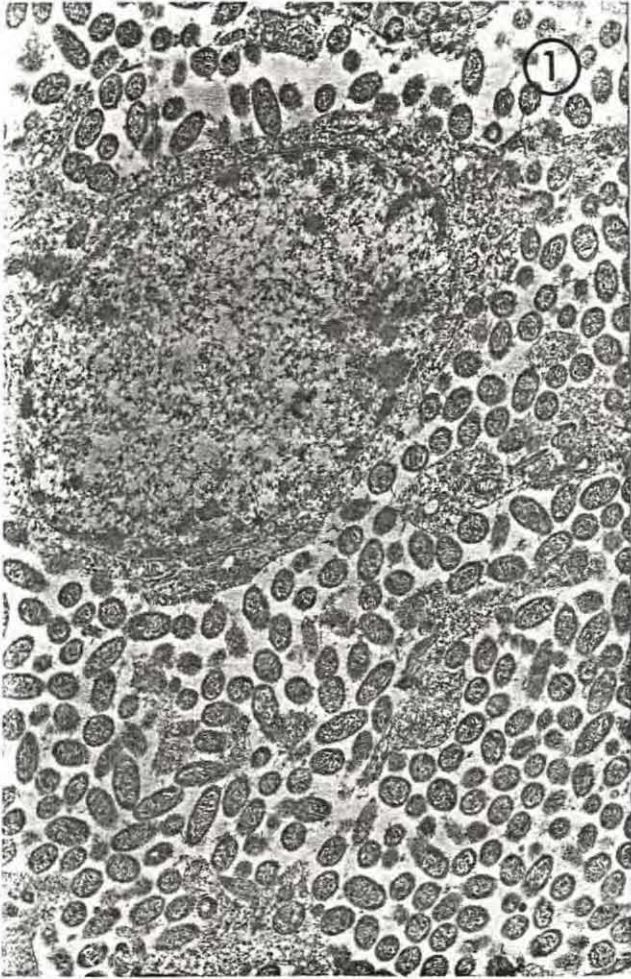
Photo 1 : tissus de crabe envahi par des micro-organismes de type bactérien (micros. élect. Gr. final = 7 050).

Photo 2 : détail des bactéries (Micros. élect. Gr. final = 40 500).

Photo 3 : détail d'une figure de réaction de l'hôte (Micros. élect. Gr. final = 12 300).

Photo 4 : vue en microscopie photonique de schizozoïtes d'*Aggregata* sp. dans le tissu conjonctif péri intestinal (Gr. X 40).







Ceux-ci sont composés de deux membranes unitaires séparées par un espace clair, délimitant une trame de matériel réticulé (photo 2). Ces micro-organismes de forme ovoïde mesurent généralement de 0,50  $\mu$  à 0,75  $\mu$ .

Dans certains cas, on remarque des amas très denses (photo 3) composés de membranes unitaires allongées enveloppant des bactéries. Ces ensembles peuvent être assimilés à des figures de défense de l'hôte (action des lysosomes).

#### Maplosporidie sp.

Des kystes sont observés dans le tissu conjonctif sous l'épithélium du tube digestif, en particulier au niveau de l'intestin et du rectum, dans la lumière du rectum mais également dans l'hépatopancréas. Ils renferment de 50 à 80 petites cellules sphériques mesurant généralement de 3 à 3,5  $\mu$  de diamètre avec un noyau de 1  $\mu$ .

Seule une étude plus fine devrait permettre de mieux les situer dans la systématique.

#### Coccidies

Des kystes blanchâtres accolés à l'intestin moyen sont visibles à la binoculaire, dans la cavité coelomique.

Leur examen sur coupes histologiques révèle la présence de très nombreux achizozoïtes inclus dans une enveloppe membranaire. Leur taille et leur forme laissent penser que nous sommes en présence de deux espèces d'*Aggregata*.

Elles sont d'ailleurs observées chez des individus différents. Les plus gros de forme allongée, mesurent 7 à 10  $\mu$  de long sur 2 à 3  $\mu$  de large. La taille du noyau, en position centrale est de 2  $\mu$ . Les plus petits, de forme allongée, conoïde en un pôle, mesurent 4  $\mu$  de long sur 1,5  $\mu$  de large. Les noyaux en position polaire sont petits (0,3  $\mu$  de diamètre).

## 6. Conclusion

Cette étude nous a permis d'aborder la pratique d'élevage : maintenance d'huîtres et de crabes en bacs et culture de phytoplancton. Nous nous sommes familiarisés avec les techniques de cytologie et d'histologie. Enfin, ont été abordées deux disciplines nouvelles pour nous, la parasitologie et la pathologie (observations de diagnostics macroscopiques et microscopiques, découverte de quelques familles de parasites).

Au cours de l'expérience, des problèmes se sont posés, surtout au niveau des bacs contenant des crabes. Leur taille et leur provenance étant différentes, leur comportement n'a pas été homogène d'un bac à l'autre. Les comparaisons et les interprétations à leur sujet sont rendues de ce fait quasiment impossibles.

Le suivi histologique des huîtres fixées au cours de l'essai n'a fait apparaître aucun résultat intéressant.

C'est au terme du sacrifice final que, sur des huîtres de zone non parasitée, nous avons constaté macroscopiquement des lésions (indentation et perforations) au niveau des branchies et microscopiquement des cellules parasitaires de *Bonamia ostreae* sur 17 huîtres.

Cet essai a permis aussi de lier effectivement les mortalités observées sur parcs depuis 1979 à *Bonamia ostreae* et de vérifier la forte pathogénie du parasite.

Sur un plan pratique au vu de ces résultats, il est évident que tous transferts d'huîtres d'un centre d'élevage contaminé vers un centre indemne est à proscrire.

Si apparemment, les autres essais n'ont pas donné de résultats positifs, les constatations qui en sont retirées peuvent servir de bases à de nouvelles expériences :

le stade de maturation du parasite et la dilution minimale peuvent être étudiés soit en augmentant la densité de broyats dans la

technique de "feeding method", soit par l'injection de quantités connues, directement sur l'huître,

- le rôle de la température s'aborde aisément par des sacrifices intermédiaires des séries à différentes températures,

- enfin le rôle du crabe peut de nouveau être envisagé soit par des maintenances d'huîtres et de crabes en aquariums avec des critères stricts de taille et de charge, soit par des cultures de parasites (Kapposporidies) que l'on pourrait injecter directement aux huîtres.

# BIBLIOGRAPHIE



- ATKINS (D.), 1930-1931.- On abnormal conditions of the gills in *Mytilus edulis*. Part II. Structural abnormalities with a note on the method of division of the mantle cavity in normal individuals.- J. mar. biol. Assoc. U.K., n.s. 16 489-543, 27 fig.
- BALOUET (G.), 1976.- La maladie des Abers.-Etude pathologique et épidémiologique.- Rapport d'étude.
- BAUCHAU (A.G.), 1966.- La vie des crabes, Paul LECHEVALIER.- édit. Paris : 138 p.
- CABOUR (P.), PODER (M.) et BALOUET (G.), 1980.- Présence de *Minchinia armoricana* (Haplosporea, Haplosporida) chez *Ostrea edulis* d'origine française.- C.T. Sciences Scté Biologie.- Extrait tome 174, n° 3, p. 359.
- COMPS (M.), 1969.- Observations relatives à l'affection branchiale des huîtres portugaises (*Crassostrea angulata* LMK).- Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 33 (2) : 151-160.
- COMPS (M.) 1970.- La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*. Caractéristiques et évolution des altérations.- Processus de cicatrisation.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 34 (1) : 23-44.
- COMPS (M.) et DUTHOIT (J.L.), 1976.- Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* LMK.- C.R. Acad. Sci. Paris, Série D. 283.
- COMPS (M.) : BONAMI (J.R.), VAGO (C.) et CAMPILLO (A.), 1976.- Une virose de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* LMK.- C.R. Acad. Sci., Paris, Série D 282 : 1 991-1 993.
- GALTSOFF (P.S.), 1964.- The American Oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin - Fish Bull., 64, 480 p.
- GRIZEL (H.) et TIGE (C.), 1973.- La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis*, Linné.- Cons. Int. Explor. Mer, K/13, 7 p.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (R.), COUSSEMERIS (F.) et VAGO (C.), 1974.- Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate.- C.R. Acad. Sci., Paris, Série D 279, p. 783.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (J.R.), COUSSEMERIS (F.), DUTHOIT (J.L.) et LE PELANEC (M.A.), 1974.- Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis*, Linné.- Science et Pêche. Bull. Inst. Pêches marit., n° 240 : 7-30.
- GRIZEL (H.), TIGE (C.) et BABOUIN (M.A.), 1976.- Données sur la situation de la maladie de l'huître plate, *Ostrea edulis*, Linné.- C. Int. Explor. Mer.- C.V. K/18.

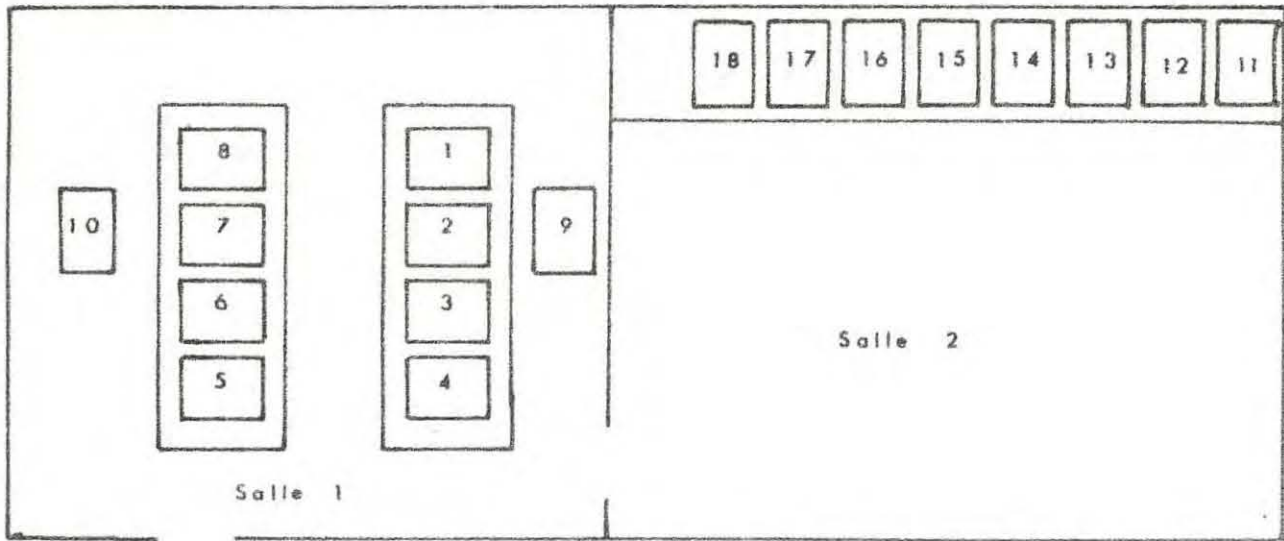
- HERBACHE (B.), 1971.- Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis*, Linné.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35 (1) : 64-74.
- HIS (E.), 1969.- Recherches d'un test permettant de comparer l'activité respiratoire des huîtres au cours de l'évolution de la maladie des branchies.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 33 (2) : 171-175.
- HIS (E.), 1977.- Aspects biologiques du stockage des huîtres en bassin. Conseils pratiques aux ostréiculteurs.- Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 272 : 1-11.
- LAMOTTE (W.), 1971.- Initiation aux méthodes statistiques en biologie, 2ème édition.- Masson et Cie, édit., Paris : 144 p.
- LE BORGNE (Y.), MARIN (G.) et VERGONZAIN (G.), 1978.- Culture et élevage de masse dans le contexte d'une éclosérie-nurserie de mollusques bivalves : les productions phytoplanctoniques et le grossissement des post-larves.- Publ. Sci. Tech. CEEKO : Actes colloque n° 7 p : 105 - 154.
- LEIBOWITZ et GRIZEL (R.), 1981.- (sous presse).
- MARTEL (L.) et coll. 1976. La conchyliculture française, deuxième partie.- Biologie de 2 huîtres et de la moule.- Inst. Sci. et Tech. Pêches Marit.
- PAULMIER (C.), 1972.- Seston, phytoplancton et phytobenthos en rivière d'Auray. Leur rôle dans le cycle biologique des huîtres *Ostrea edulis* L.- Thèse de doctorat de l'Université de Provence, mention Sciences.
- PERKINS (F.O.), 1975.- Fine structure of the haplosporidiant Kernstals, a persistent intranuclear mitotic apparatus. J. cell. Sci., 18 : 327-346.
- PERKINS (F.O.), 1979.- Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Inchinia*, *Grosporidium*, *Haplosporidium* and *Marteilia*.- Taxonomic implications.- Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 25-37.
- PICHOT (Y.), COUPE (G.), TIGE (C.), GRIZEL (R.) et SABOUIN (M.A.), 1980.- Recherches sur *Bonamia ostreae* Gen. N., Sp. N. parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L.- Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 (1) : 131-140.
- RAY (S.H.), 1954.- Biological studies of *Ermocystidium Marinum*.- The rice Institute Pamphlet, Special Issue, XI, 1 vol., 114 p.

- RICCI (E.), 1957.- Contribution à la biométrie, à la biologie et à la physicochimie de la moule commune *Mytilus galloprovincialis* LMK.- Ann. Inst. nat. Sci. Tech. Océanogr. Pêche Salammbô, 11, p : 1-163.
- SCHWARTZ (D.), 1975.- Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.- 3ème édition Flammarion Médecine.- Sciences, édit. Paris.- 307 p.
- TIGE (G.) et GRIZEL (H.), 1975.- Essais d'infestations expérimentales entre *Crassostrea rhizophorae* et *Carcinus maenas*.- Cons. Int. Explor. Mer.- C.M. K/21.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.) et COSES (M.), 1980.- Données sur le nouveau parasite de l'huître plate.- Situation épidémiologique.- Com. Cons. Int. Explor. Mer.- Ren. Spéci. Copenhague 1980, n° 39 - 9 p. ronéo.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.), MARTIN (A.C.), LANGLADE (A.) et FABOUIN (M.A.), 1981.- Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite *Bonamia ostreae* en Bretagne.- Evolution au cours de l'année 1980 (sous presse).
- TIXIER (A.) et GRILLARD (J.M.), 1957.- Anatomie animale et dissection.
- VIVARES (C.), 1969.- Etude du parasitisme des crustacés décapodes brachyours en Méditerranée occidentale.- Thèse de Docteur de spécialité - Faculté de Montpellier.
- YONCE (C.M.), 1960.- Oysters-Collins, édit. Londres : 260 p.

# ANNEXES



Annexe 1 : répartition et nature des lots dans les  
différents bacs, à température ambiante  
et à 20°C.



<u>Série à t° ambiante</u>			<u>Série à 20°</u>		
		Lots			Lots
Bac 1	-60 HNP	(VI)	Bac 11	-60 HNP	(XXIX)
	-20 HP	(XI)		-15 CZP	(XXV)
	-60 HNP	(XVIII)	Bac 12	-60 HNP	(XV)
Bac 2	-20 HP	(XIX)		-20 HP	(XVII)
	-15 CZP	(XX)		-60 HNP	(XXVI)
	-15 CZNP	(XXI)	Bac 13	-20 HP	(XXVIII)
Bac 3	-60 HNP	(IX)		-15 CZ	(XXIII)
	-15 CZP	(XXII)		-60 HNP	(XXX)
Bac 4	-60 HNP	(III) Pécioin	Bac 14	-20 HP	(XXI)
	-15 CZNP	(XXLII)		-15 CZ	(XXXII)
Bac 5	-60 HP	(II) Témoin	Bac 15	-60 HNP	(XVI) Suspension
Bac 6	-60 HNP	(I) Témoin	Bac 16	-60 HNP	(XIII) Témoin
Bac 7	-20 CZNP	(IV) Témoin	Bac 17	-60 HP	(XIV) Témoin
Bac 8	-60 HNP	(VIII) Suspension			
Bac 9	-60 HNP	(VII)			
	-20 HP	(XII)			
Bac 10	-60 HNP	(X)			
	-15 CZP	(XXIV)			
Bac 18	-20 CZP	(V) Témoin			

## COMPOSITION DU MILIEU ES de PROVASOLI ADAPTE

Ce milieu comporte la préparation de trois solutions composées comme suit :

SOLUTION I

Fe $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$ .....	35,1 g
Na <sub>2</sub> EDTA .....	33 g
H <sub>2</sub> O distillée q s p .....	5 l

SOLUTION II

H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> .....	57 g
Fe Cl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O .....	2,45 g
Mn SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O .....	3,2 g
Zn SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	1,1 g
Co SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O ou CoCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O .....	0,24 g ou 0,20 g
Na <sub>2</sub> EDTA .....	50 g
H <sub>2</sub> O distillée q s p .....	5 l

SOLUTION III

Na SiO <sub>3</sub> , 5 H <sub>2</sub> O .....	100 mg
H <sub>2</sub> O distillée q s p .....	1 l

Ces trois solutions servent à la préparation du milieu de culture proprement dit après adjonction de nouveaux produits.

SOLUTION DEFINITIVE

Na NO <sub>3</sub> .....	700 g
Na <sub>2</sub> glycérophosphate .....	100 g
Vitamine B 12 .....	0,02 g
Thiamine .....	1 g
Biotine .....	0,01 g
TRIS .....	1 000 g
Solution I .....	5 l
Solution II .....	5 l
Solution III .....	20 ml
H <sub>2</sub> O distillée q s p .....	20 l

Le pH est ajusté à pH 7,9 avec HCL fumant. Cette solution est autoclavée 20 mn à 120°C.

L'eau de mer est enrichie à raison de 2 ml de cette solution par l. Le milieu de culture ainsi obtenu peut être autoclavé à 120° : 10 à 30 mn suivant les volumes ; le liquide prend alors une légère coloration jaunâtre et il peut se former un léger précipité signalé par certains auteurs (PROVASOLI et MAC LAUGHLIN, 1957 ; BERLAN, 1966).

DESHYDRATATION

Opération suivant la fixation et précédant l'inclusion

- 1 bain d'une demi-heure dans l'éthanol à 70°
- 1 bain d'une demi-heure dans l'éthanol à 80°
- 1 bain d'une demi-heure dans l'éthanol à 90°
- 1 bain d'une demi-heure dans l'éthanol à 95°
- 2 bains d'une heure dans l'éthanol absolu
- 2 bains d'une heure dans le butanol

REHYDRATATION

C'est une opération qui suit la coupe et qui précède la coloration

- 2 bains de toluène de 10 mn
- 1 rinçage à l'éthanol absolu
- 1 bain de quelques instants à l'éthanol à 95°
- 1 réhydratation à l'eau courante pendant 15 mn



TRIPLE COLORATION DE A. PRENANT, VARIANTE DE GABE  
(Martoja, 1967)

---

Réactifs

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

Mode opératoire

- 1 - Déparaffiner, hydrater
- 2 - Colorer par l'hématoxyline pendant 2 à 5 mn
- 3 - Laver à l'eau courante
- 4 - Colorer par le mélange d'éosine vert-lumière pendant 5 à 10 mn
- 5 - Rincer rapidement ou mettre en attente dans l'eau acétique
- 6 - Déshydrater
- 7 - Monter

C'est une bonne coloration pour les noyaux, les cytoplasmes, les sécrétions, le tissu conjonctif et ses dérivés.

Hemalum - Picro-indigocarmin

---

Réactifs

- Hemalum de Masson
- Picro-indigocarmin de Calleja

Mode opératoire

- 1 - Déparaffiner
- 2 - Colorer pendant 2 à 5 mn par l'hemalum
- 3 - Laver à l'eau courante jusqu'à obtention d'un virage au bleu-noir (2 à 5 mn)
- 4 - Colorer pendant 30 secondes par le picro-indigocarmin
- 5 - Monter

## AZAN DE HEIDENHAIN

\*\*\*

### Réactifs

- Azan de G
- Bleu de Heidenhain
- Solution d'aniline à 1 % dans l'alcool à 70°
- Solution d'acide acétique à 1 % dans l'alcool à 95°
- Solution aqueuse à 5 % d'acide phosphotungstique

### Mode opératoire

- 1 - Déparaffiner, 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 mn dans l'alcool aniliné ; laver à l'eau distillée
- 3 - Colorer pendant une 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 considérablement prolongé.
- 7 - Laver à l'eau distillée
- 8 - Traiter par l'acide phosphotungstique pendant 1/4 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 poussé que le temps de mordantage choisi sera plus long.
- 9 - Laver à l'eau distillée
- 10 - Colorer par le bleu de Heidenhain pendant 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
- 12 - Monter

FIXATEUR

- . Liquide de Bouin aqueux
  - solution aqueuse saturée d'acide picrique ..... 75 ml
  - formol ..... 20 ml
  - acide acétique ..... 5 ml
  
- . Liquide de Carnoy 2
  - alcool absolu ..... 60 ml
  - chloroforme ..... 30 ml
  - acide acétique ..... 10 ml

COLORANTS ET REACTIFS

- . Azocarmin G : préparation à chaud
  - azocarmin G ..... 0,1 g
  - eau distillée ..... 200 ml
  
- . Bleu de Heidenhain : préparation à froid
  - bleu d'aniline ..... 0,2 g
  - orangé G ..... 0,5 g
  - eau distillée ..... 100 ml
  - acide acétique ..... 1 ml

Cette solution est utilisée après dilution

- solution mère ..... 1 vol.
  - eau distillée ..... 2 vol.
- 
- . Eosine vert-lumière : préparation à froid
    - éosine jaunâtre ..... 1 g
    - vert lumière ..... 0,2 g
    - acide phosphotungstique ..... 0,5 g
    - eau distillée ..... 100 ml
- Agiter et ajouter
- acide acétique ..... 0,5 ml

. Hémalum de Masson : préparation à chaud

- hémateïne .....	0,2 g
- alun de potassium .....	5 g
- eau distillée .....	100 ml
Faire bouillir, laisser refroidir et filtrer, ajouter :	
- acide acétique .....	2 ml

. Hématoxyline solution mère : préparation à froid

- hématoxyline .....	10 g
- alcool à 95° .....	100 ml

Solution qui doit être "mûrie" pendant 3 mois



Nature des lots	Mois		Mai			Juin			Juillet			Août		% global des mortalités	N° des lots
	19	31	1	15	16	1	15	16	1	20					
Témoin HNF Sac 6 (60)											2 % (1)	2 % (1)		I	
Témoin HF Sac 5 (60)	23 % (14)		15 % (9)	5 % (3)		8 % (5)	13 % (8)		5 % (3)		70 % (42)		II		
Témoin HNF Séjour avec CZP Sac 4 (60)			13 % (8)	3 % (2)		12 % (7)	5 % (3)		5 % (3)		35 % (23)		III		
Témoin CZP Sac 7 (20)			15 % (3)	30 % (6)		5 % (1)	10 % (2)		25 % (5)		65 % (17)		IV		
Témoin CZP Sac 18 (20)			20 % (4)						5 % (1)		25 % (5)		V		
HNF Sac 1 (60)									5 % (3)		5 % (3)		VI		
HNF Sac 9 (60)			2 % (1)						3 % (2)		5 % (3)		VII		
HNF Suspension Sac 8 (60)						2 % (1)	3 % (2)		5 % (3)		10 % (6)		VIII		
HNF Suspension avec CZP Sac 3 (60)					22 % (13)				3 % (2)		25 % (15)		IX		
HNF séjour avec CZP Sac 10 (60)	2 % (1)		2 % (1)				13 % (8)	47 % (20)	15 % (9)		78 % (47)		X		

Annexe 7 : tableau récapitulatif du constat des mortalités dans les bacs à température ambiante.

Nature des lots	Mois	Mai		Juin			Juillet			Août		% global des mortalités	N° des lots	
		19	31	1	15	16	1	15	16	1	20			
HP Bac 1 (20)		15 % (3)		15 % (3)		5 % (1)						35 % (7)	XI	
HP Bac 9 (20)		20 % (4)		30 % (6)				20 % (5)				75 % (15)	XII	
HP Bac 2 (50)		30 % (18)		70 % (42)								100 % (60)	XVIII	
HP Bac 2 (20)		70 % (14)		30 % (6)								100 % (20)	XIX	
CZP Bac 2 (15)		13 % (2)				26,6 % (4)						40 % (6)	XX	
CZNP Bac 2 (15)		46,6 % (7)		33,3 % (5)		6,6 % (1)						86 % (13)	XXI	
CZP Bac 3 (15)		33 % (5)		6 % (1)		13 % (2)		13 % (2)		13 % (2)		93 % (14)	XXII	
CZNP Bac 4 (15)				13 % (2)		33 % (5)				20 % (3)		6 % (1)	73 % (11)	XXIII
CZP Bac 10 (15)				6 % (1)		13 % (2)		6 % (1)		40 % (6)		6 % (1)	73 % (11)	XXIV

Annexe 3 : tableau récapitulatif du constat des mortalités dans les bacs à température ambiante (suite et fin).

Nature des lots	Mois		Juin			Juillet			Août		% global des mortalités	N° des lots
	19	31	1	15	16	1	15	16	1	20		
Témoin HNC Sac 16 (60)			1,6 % (1)						5 % (3)		6,6 % (4)	XIII
Témoin HP Sac 17 (60)	10 % (9)		10 % (6)	2 % (1)		10 % (6)	8 % (5)		3 % (2)		40 % (29)	XIV
HNP Sac 12 (60)			1,6 % (1)						5 % (3)		6,6 % (4)	XV
HNP suspensions Sac 15 (60)					1,6 % (1)		1,6 % (1)				3,3 % (2)	XVI
HP Sac 12 (20)	6 % (3)		5 % (1)	5 % (1)		5 % (1)					30 % (6)	XVII
CZNP Sac 11 (15)	6 % (1)		40 % (6)	13 % (2)		6 % (1)	13 % (2)				80 % (12)	XXV
HNP Sac 13 (60)	6 % (4)		16 % (10)	8 % (5)		1,6 % (1)	11,6 % (7)		33 % (20)		78 % (47)	XXVI
CZNP Sac 13 (15)			26 % (4)			13 % (2)			20 % (3)		50 % (9)	XXVII
HP Sac 13 (20)	25 % (5)		30 % (6)	5 % (1)		10 % (2)			10 % (2)		80 % (16)	XXVIII
HNP Sac 11 (60)			1,6 % (1)						5 % (3)		6,6 % (4)	XXIX
HNP Sac 14 (60)	23 % (14)		10 % (6)	1,6 % (1)		1,6 % (1)			21,6 % (13)		58 % (35)	XXX
HP Sac 14 (20)	70 % (14)			5 % (1)							75 % (15)	XXXI
CZNP Sac 14 (15)	13,3 % (2)		20 % (3)	13,3 % (2)		6,6 % (1)			13,3 % (2)		66,6 % (10)	XXXII

Annexe 9 : tableau récapitulatif des constats de mortalités observées dans les bacs à 20°C.