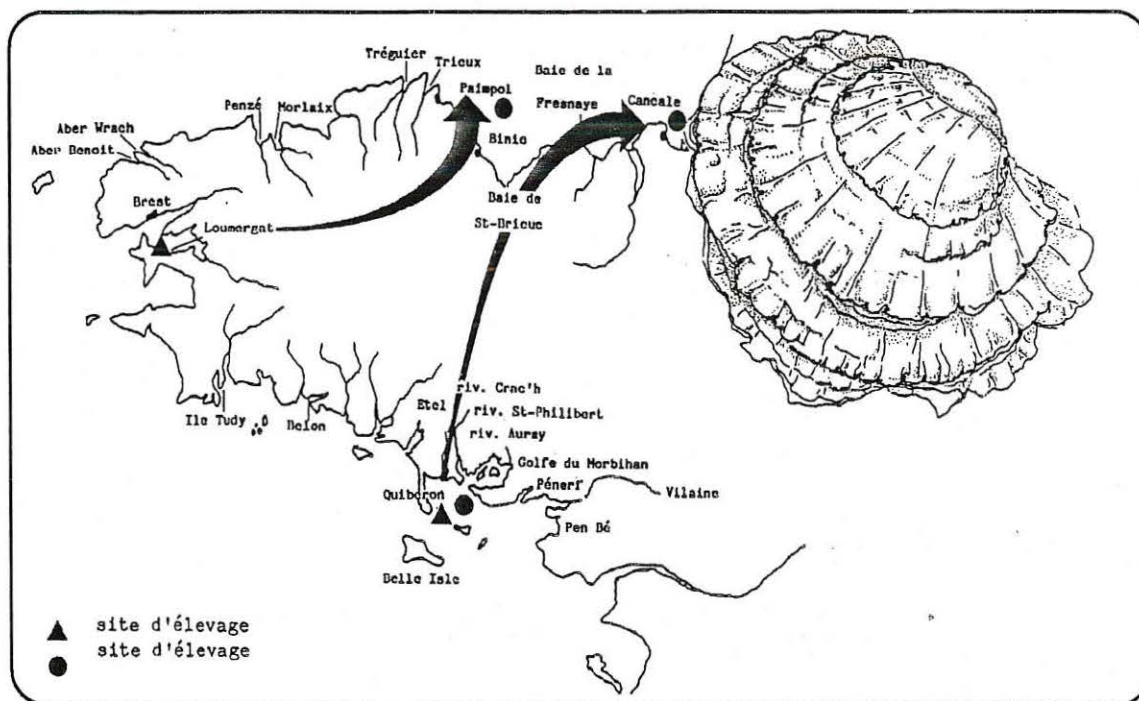


CONTRAT DE PLAN ETAT-REGION BRETAGNE
RELANCE DE L'HUITRE PLATE
RAPPORT D'AVANCEMENT DES TRAVAUX 1988

IFREMER (La Trinité-sur-Mer/La Tremblade)



INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Adresse :	
IFREMER	IFREMER
	BP 133
12 rue des résistants	Ronce les Bains
56470 LA TRINITE/MER	17390 LA TREMBLADE

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

DEPARTEMENT RESSOURCES AQUACOLES

STATION/LABORATOIRE LA TRINITE

AUTEURS (S) :		CODE :
IFREMER (LA TRINITE/MER - LA TREMBLADE)		DRV-89.005-RA/ La Trinité/La Tremblade
TITRE :		date : Février 1989
Contrat de Plan Etat-Région Bretagne		tirage nombre : 20
RELANCE DE L'HUITRE PLATE		Nb pages : 74
Rapport d'avancement des travaux 1988		Nb figures : 35
		Nb photos : 54
CONTRAT (intitulé)		DIFFUSION
N° _____		libre <input type="checkbox"/>
		restreinte <input type="checkbox"/>
		confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME

Un contrat de Plan Etat Région Bretagne a été signé en 1983 pour financer des recherches sur la période 1984-1988 dans le but de permettre la relance de l'élevage de l'huître plate, à la suite de la deuxième épizootie due à un protozaire, *Bonamia ostreae*.

Ce rapport présente les travaux réalisés et les résultats acquis durant l'année 1988, dans les domaines de la pathologie (étude de la maladie et des mécanismes de défense des mollusques) de la génétique (recherche de souches résistantes), de l'épidémiologie descriptive et de la zootechnie.

mots clés : Bivalves, *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*, épidémiologie, pathologie, immunologie, échantillonnage, élevage

key words : Shellfish, *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*, epidemiology, pathology, immunology, sampling, rearing



DEVA-CUDN° 203

Arrivato 15 JAN. 1999

Classi

Obs: 6 26.01.90

o> Publ

Classi

SOMMAIRE

A - BILAN DES ELEVAGES ET GISEMENTS NATURELS	p.	1
1.1. Résultats des semis	p.	1
1.1.1. - en découvrant	p.	1
1.1.2. - en eau profonde	p.	1
1.2. Résultats de captage	p.	11
1.3. Epidémiologie par secteur	p.	12
B - EXPERIMENTATIONS ZOOTECHNIQUES	p.	16
2.1. Effets des transferts	p.	16
2.2. Elevages en mélange huître plate/huître creuse	p.	18
2.3. Test de résistance	p.	21
C - ETUDE DES MECANISMES DE DEFENSE	p.	24
I - <u>ANALYSE MORPHOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES</u>	p.	24
1. Morphologie en microscopie photonique	p.	24
2. Ultrastructure	p.	24
3. Détermination des hémogrammes	p.	31
4. Caractérisations enzymatiques	p.	35
5. Production de radicaux libres de l'oxygène	p.	39
6. Discussion	p.	44
II - <u>RELATIONS BONAMIA OSTREAE - HEMOCYTES</u>	p.	50
1. Analyse des cellules infectées naturellement	p.	50
2. Etude des interactions <u>in vitro</u>	p.	54
3. Phénomènes de survie	p.	69
4. Discussion	p.	72
D - CONCLUSIONS	p.	76

A - BILAN DES ELEVAGES ET GISEMENTS NATURELS

1.1. Résultats des semis

1.1.1. - Semis en découvrant -----

L'élevage reste toujours très limité en terrain découvrant.

A Paimpol la prévalence en Bonamia a augmenté sensiblement en 1988 sur les lots semés, aussi bien sur les huîtres de 3 ans (26 %) que sur celles de 2 ans (18 %). Les bilans de ces élevages ne sont pas connus.

A Cancale il n'y a pas eu, à notre connaissance, de semis effectué en 1986 et 1987 après le phénomène d'envasement survenu au cours de l'hiver 1984-1985. Quatre semis de 100 Kg ont été effectués au printemps 1988 à partir de naissain de tuile ainsi qu'un semis d'huîtres captées sur coques de moules.

1.1.2. - Semis en eau profonde -----

L'élevage se poursuit dans les trois sites bretons avec des résultats très divers, consignés dans les tableaux 1, 2 et 3. Les courbes de croissance des différents semis apparaissent sur les figures 1 - 2 et 3.

1.1.2.1. - Baie de Cancale

Captage 1985 - Semis 1986

Trente trois millions six cent mille huîtres captées sur tuiles dans le Morbihan en 1985 ont été semées en 1986 sur 2 concessions à Cancale.

Dix neuf millions sept cent mille huîtres ont été réparties également dans 2 endroits d'une des concessions. Un des secteurs ayant été complètement envasé au cours de l'hiver 1986-1987 a été hersé par la suite et les lots ont été suivis séparément. Ils ont montré une évolution sensiblement différente : le lot ayant souffert, quoique présentant une meilleure croissance, s'est infesté plus rapidement avec une prévalence de 14 % contre 4 % sur l'autre lot en juin 1988.

Le relevage a été effectué en trois fois entre décembre 1987 et décembre 1988 et la recapture sur l'ensemble des 2 lots n'est que d'environ 10 % sans qu'il soit possible de déterminer la part de mortalité due à l'envasement et celle due à la maladie.

Caractéristique	Captage 1985 - Loumergat 5 tonnes - St-Quay			Captage 1986 - Loumergat 5 tonnes - Binic					
	Poids	Nombre	<u>Bonamia</u>	Poids	Nombre	<u>Bonamia</u>			
Mai	1986			1987	94	0			
Juin									
Juillet									
Août									
Septembre	5.5	100	0	14.2	100	3			
Octobre	13.9	50	0						
Novembre									
Décembre									
Janvier	1987			1988					
Février									
Mars									
Avril									
Mai	15.6	100	1	25.8	194	36			
Juin									
Juillet									
Août									
Septembre	34.5	100	4	36.1	100	33			
Octobre	47.0	100	5						
Novembre									
Décembre									
Janvier	1988								
Février									
Mars									
Avril									
Mai	52.9	42	5						
Juin									
Juillet									
Août									
Septembre	85.9	100	21						
Octobre									
Novembre									
Janvier									
Février									
Mars									

Tableau n° 1 : Evolution de la croissance et de l'infestation par Bonamia sur les élevages en Baie de Saint-Brieuc.

Caractéristique Nombre d'huître		Captage 1985 - tuiles Morbihan - 33.6 millions 3 semis différents notés 1 - 2 - 3			Captage 1986 - tuiles Morbihan - 4.8 millions		
		Poids	Nombre	Bonamia	Poids	Nombre	Bonamia
Mai		1986			1987		
Juin							
Juillet							
Août		7.0	200	0			
Septembre		9.0					
Octobre							
Novembre		16.6	50	0			
Décembre					18.4	50	0
Janvier		1987	Hersage lot 1		1988		
Février					18.4		
Mars		{ 16.4	50	0	19.4	130	2
Avril		{ 18.4	50	0			
Mai							
Juin		22.1	100	0	28.0	50	0
Juillet							
Août		42.1	100	3			
Septembre							
Octobre							
Novembre						42	3
Décembre	1	{ 59.3	50	2			
	2	{ 53.5	50	3			
	3	{ 61.5	100	3			
Janvier		1988			Relevage en cours		
Février							
Mars	1	{ 58.1	129	8			
	2	{ 50.5	130	2			
	3	{ 56.7	130	1			
Avril							
Mai	.	{ /	50	6			
	.	{ 51.8	50	1			
	3	{ 55.1	50	1			
Juin	1	{ 70.9	100	14			
	2	{ 57.7	100	4			
Juillet							
Août							
Septembre							
Octobre		106 ?	100	10			
Novembre	3	84					
Décembre							
Janvier							
Février							
Mars							
		Relevage en 3 fois des lots 1 et 2 128 tonnes - survie 10 % lot 3 survie environ 20-23 %					

Tableau n° 2 : Evolution de la croissance et de l'infestation par Bonamia sur les élevages en baie de Cancale.

Caractéristique Nb cadre B.A.	Captage 85 -B.A. 240			Captage 86 - B.A. 240			Captage 87 - B.A. 195					
Nb bêtes	11 millions + 0,5 M au sol			0,6 à 0,9 millions + captage au sol			3,8 à 5,7 millions + 0,06 M au sol					
Densité	< 100/m2			<< 100/m2			< 100/m2					
	Taille /Poids	Nb	Bo	Taille /Poids	Nb	Bo	Taille /Poids	Nb	Bo			
Janvier	1986	129	0	1987	120 44 53	0 0 0	1988					
Février												
Mars		60	0									
Avril												
Mai		86	0									
Juin		40	1									
Juillet				/								
Août												
Septembre												
Octobre												
Novembre		40	1									
Décembre												
Janvier	1987 4.4	50	0	1988 11.1	50	0	1989 9.4					
Février												
Mars		4.8										
Avril												
Mai		7.2	102							2		
Juin		7.4	50							0		
Juillet												
Août		* 13.3	50							0		
Septembre												
Octobre												
Novembre			50							2		
Décembre		* 27.3	100							0		
Janvier	1988											
Février												
Mars												
Avril		* 31.8										
Mai												
Juin												
Juillet												
Août												
Septembre		45.2	100							10		
Octobre												
Novembre												
Décembre		* 56.5										
Taux de recapture	20 T relevées en 88 relevage du reste prévu fin 1989			Mortalité très importante par perceur								

Tableau n° 3 : Evolution de la croissance et de l'infestation par Bonamia sur les élevages en baie de Quiberon - Résultats obtenus sur le banc amodié ou sur la concession IFREMER.*

CANCALE

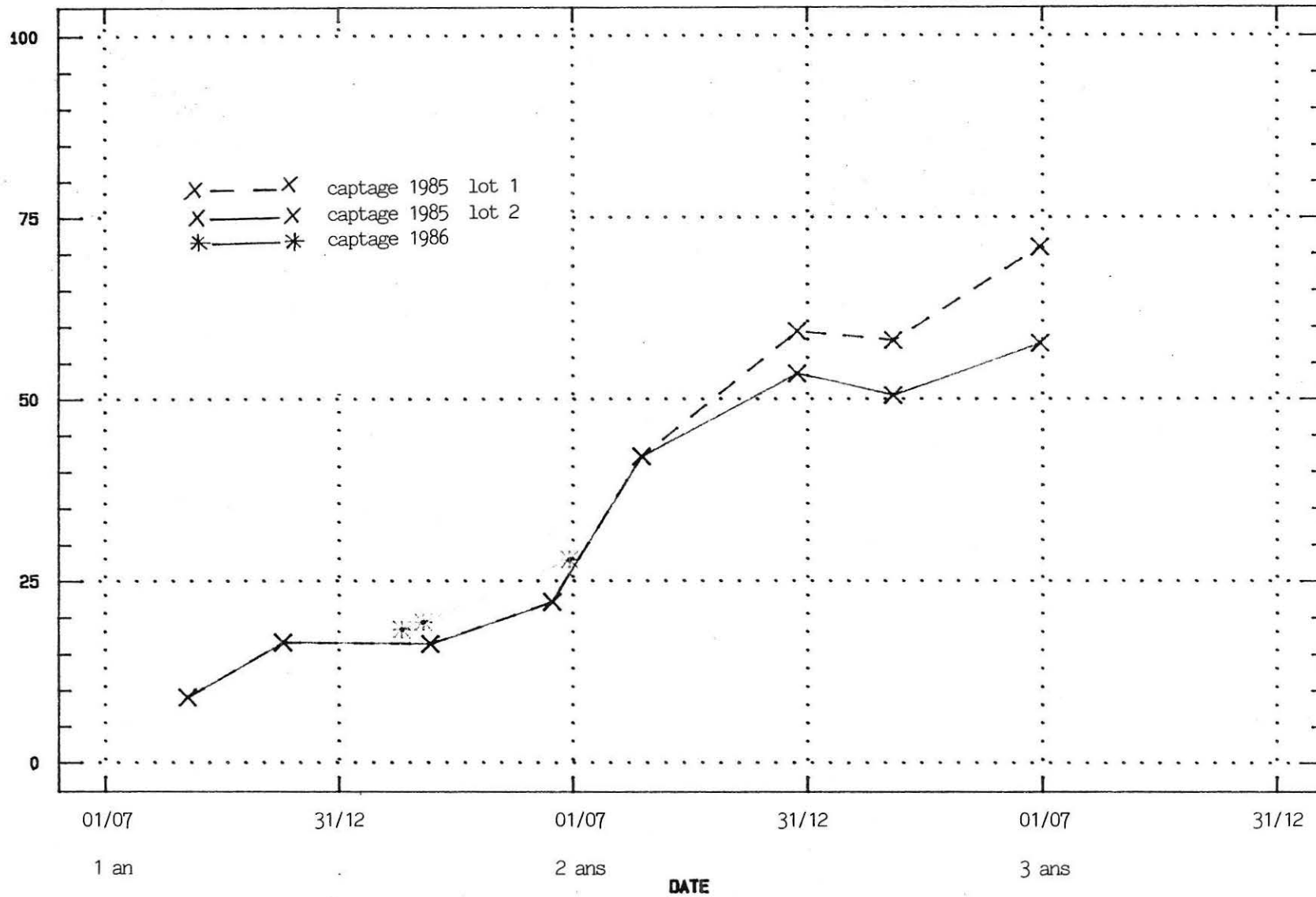


Figure 1 : semis réalisés à Cancale à partir du naissain capté sur tuiles en 1985 et 1986 : courbes de croissance

ST QUAY - BINIC SEMIS HUITRES PLATES

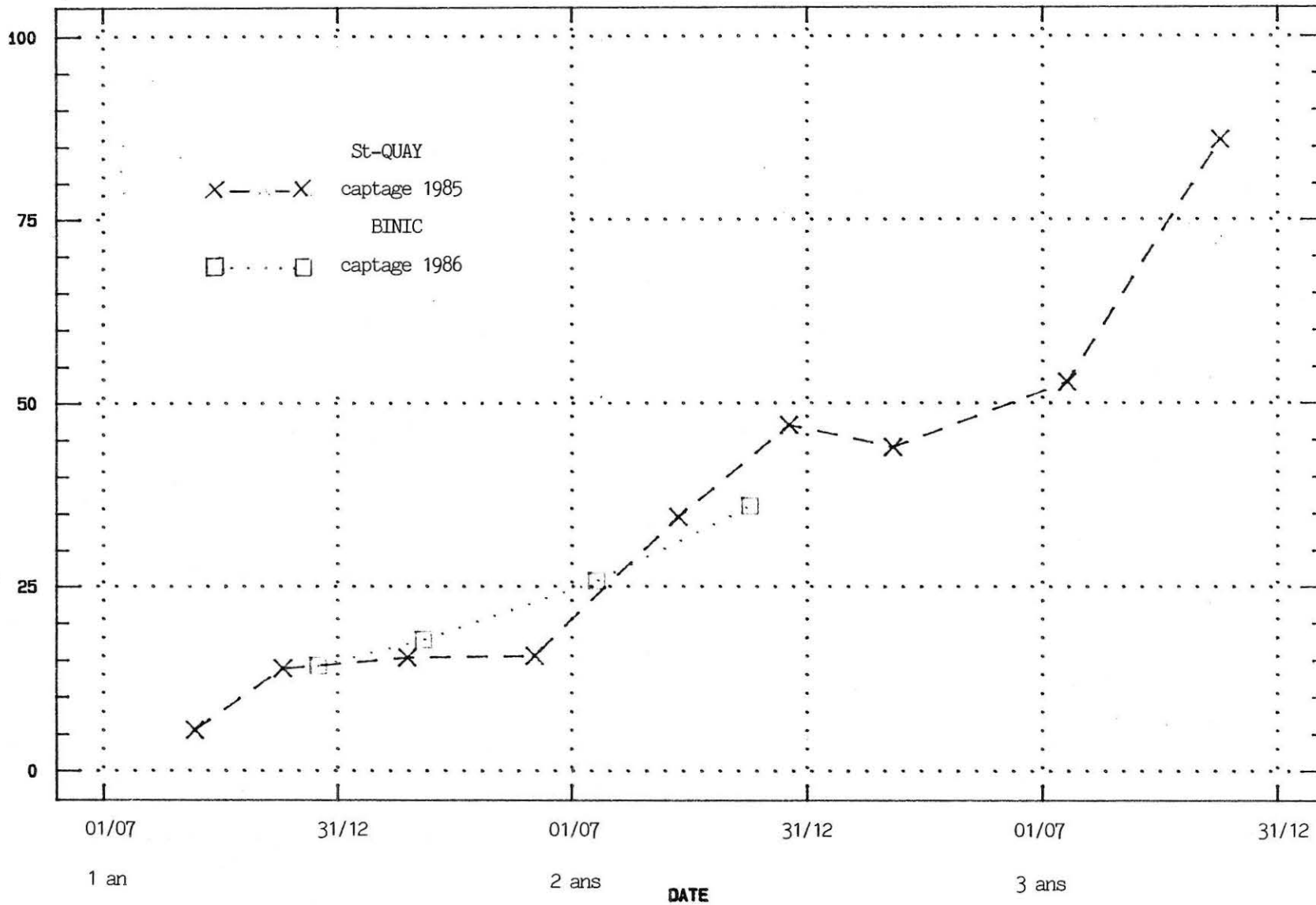


Figure 2 : semis réalisés en Baie de St-Brieuc à partir du naissain capté à Loumergat en 1985 et 1986 : courbes de croissance

QUIBERON - SEMIS HUITRES PLATES

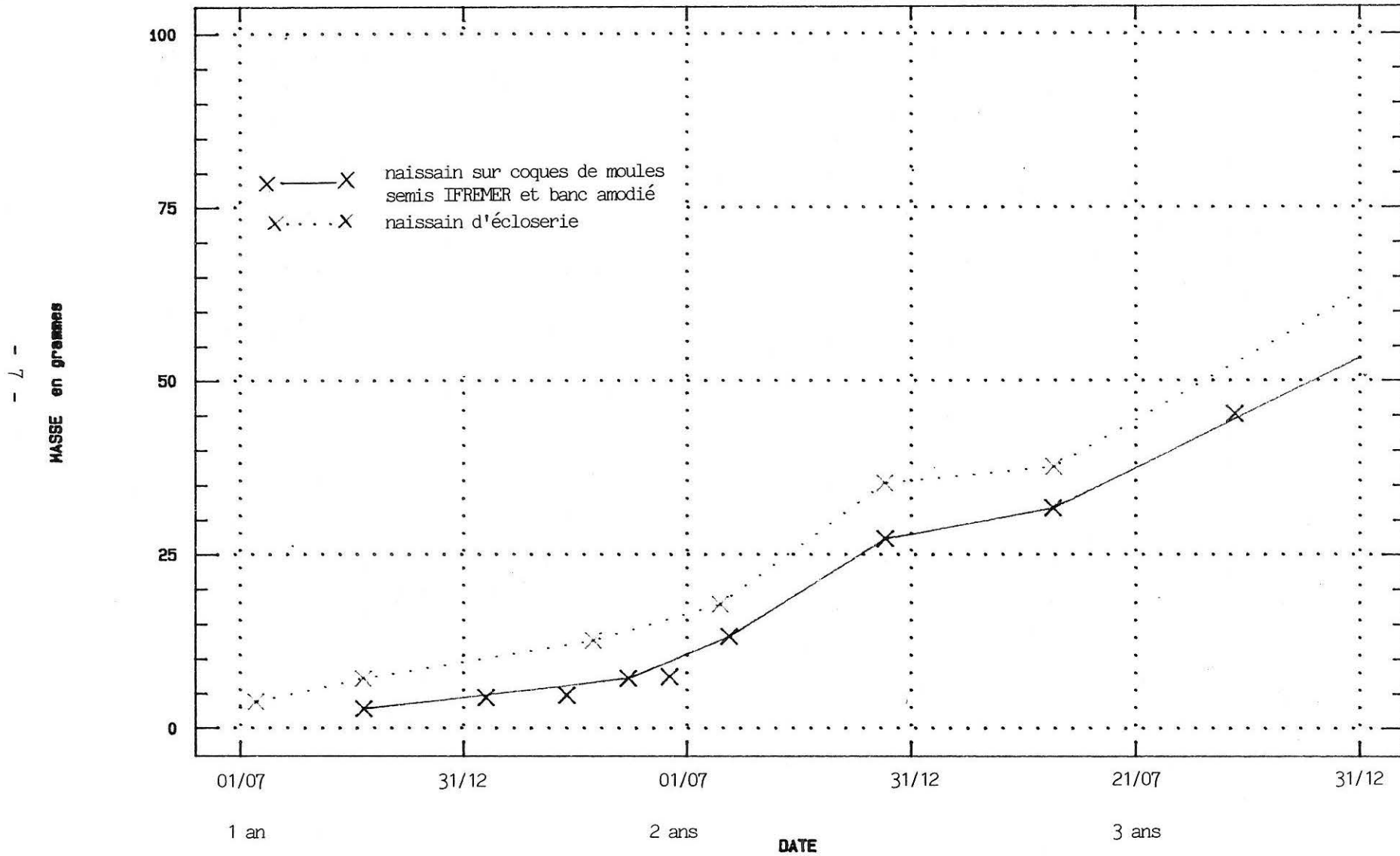


Figure 3 : semis réalisés en Baie de Quiberon à partir du naissain capté en 1985 : courbes de croissance

Treize millions neuf cent mille bêtes ont été semées par l'autre groupement. L'évolution de ce semis a été satisfaisante avec une faible infestation (2 % en avril 1988) et un poids moyen de 84 g en décembre 1988. Le relevage commencé en 1987 se termine actuellement et permet d'estimer la survie à 20 - 22 %.

Captage 1986

Quatre millions huit cent mille bêtes captées sur tuiles en 1986 ont été semées en 1987 par un seul groupement. La croissance est bonne et le taux d'infestation est proche de 7 % en novembre 1988.

Près de 700 000 huîtres captées sur coques de moules en Baie de Quiberon ont également été semées fin 1986.

Un seul prélèvement effectué en 1988 a montré un début de croissance et l'absence de parasite sur 30 huîtres.

Par contre le semis réalisé en janvier 1987 par le C.I.C. Bretagne Sud (100 à 150 000 bêtes) n'a pas été retrouvé en plongée en juin de la même année.

Captage 1987

La diversification des sites de captage et l'agrandissement du secteur d'élevage à Cancale entraînent une multiplication des semis dont la répartition est donnée dans le tableau ci-dessous.

Site de captage	Mode de captage	Quantité semée	Nombre de semis à Cancale	Date semis
Morbihan	tuiles	19,8 millions	3	fin avril à fin juin 88
Morbihan moules	coques de moules	2,2 millions	2	?
Méditerranée	coques de moules	1,3 millions	1	novembre 87 à avril 1988
Loumergat	coques de moules	0,2 million	1	printemps 88
TOTAL	2 modes	23 - 24 millions	7 semis	entre nov. 87 et fin 1988

Tableau 4 : Résultats du captage 1987 et semis consécutifs dans le secteur de Cancale

1.1.2.2. - Baie de St-Brieuc

Captage 1985 semé en 1986

Le retard de croissance observé la première année a été rapidement comblé et le produit obtenu en fin d'élevage atteignait 86 Kg le mille. L'infestation s'est développée dès le début de la seconde année tout en restant à des taux largement inférieurs à ceux observés sur le semis précédent. En fin d'élevage la prévalence atteignait 22 % contre 46 % sur le captage 1984.

Captage 1986 semé en 1987

Environ 5 tonnes de naissain captées à Loumergat ont été semées à Binic au printemps 1987. La première année de croissance est meilleure que sur le semis précédent mais l'infestation s'est développée massivement pour atteindre 33 % en fin de deuxième année. Ce semis a été en partie relevé. Plusieurs raisons peuvent être invoquées pour expliquer cette évolution. Forte densité par endroits signalée par le professionnel, présence à proximité, lors de la première année d'élevage d'un lot de 3 ans ayant subi une tempête et lui-même fortement parasité.

Enfin, il faut se rappeler que Binic était le site le plus exploité et le plus touché lors de l'apparition de la maladie en 1979-1980. Il se peut que le nettoyage n'ait pas suffi à éliminer le parasite qui reste virulent malgré les faibles tonnages semés.

1.1.2.3. - Baie de Quiberon

En 1988 il restait en Baie de Quiberon en plus du captage naturel, essentiellement trois classes d'âge issues du captage sur coques de moules des années 1985, 1986 et 1987. Leur suivi a été réalisé sur le Banc amodié et la concession IFREMER.

En ce qui concerne les semis des professionnels, une enquête est prévue au printemps 1989 pour connaître l'état du stock correspondant.

Banc amodié - captage 1985

La prévalence observée sur le semis d'huîtres issues du captage 1985 est de 10 %, taux proche de celui observé au même âge sur les huîtres captées en 1983. L'estimation du stock restant sur le banc amodié n'a pas été effectuée en 1988 mais à partir du chiffre trouvé en mai 1987 (4,4 millions de bêtes), du poids moyen (55-60 g), et en supposant une mortalité de 50 % due en grande partie aux prédateurs on peut estimer à 100 - 150 tonnes d'huîtres de 3 ans le stock restant fin 1988. Quinze à vingt tonnes ont été relevées en décembre pour la vente. Etant donné l'état sanitaire du semis, celui-ci peut être maintenu en place pour servir de stock de géniteurs en 1989, sous réserve du maintien de cet état.

Banc amodié - captage 1986

Le peu d'huîtres captées en 1986 par le C.I.C. a été anéanti par un prédateur peut-être capté la même année à l'intérieur des collecteurs ; il s'agit du bigorneau perceur Ocenebra erinacea.

Banc amodié - captage 1987

Une partie du captage 1987 semé parmi le captage 1986 a subi le même sort que celui-ci. Sur l'autre partie estimée très approximativement à 2 millions de bêtes, le Bonamia n'a pas encore été décelé mais la première année de croissance a été plutôt faible : 6,5 g en septembre 1988 contre 9 à 11 g au même âge pour les semis précédents à l'exception du semis 1985 exceptionnellement petit (<4 g). Ce semis pourrait représenter environ 15 tonnes au moment de la reproduction 1989.

Gisement classé de Penhièvre

A l'ouest des concessions de la Baie, à la limite du zéro des cartes se trouve un gisement d'huîtres plates régulièrement exploité par les pêcheurs à pied. Une estimation du stock a été faite en plongée en octobre 1988 sur une zone d'une cinquantaine d'hectares. Six à 9 millions d'huîtres étaient présentes sur la zone, appartenant à 2 classes d'âge (captage 1986 et 1987). Totalisant à cette époque 100 à 160 tonnes, elles représentent un stock de géniteurs non négligeable, qu'il conviendrait de protéger étant donnée la pénurie actuelle de géniteurs et de naissain d'huîtres plates.

Concession IFREMER - captage 1985

Une partie du semis réalisé à partir d'huîtres captées en 1985 a été relevée laissant supposer un stock global d'environ quatre à cinq tonnes soit 68 à 85 000 bêtes sur les 784 000 semées en janvier 1986. Le taux de survie serait de 8,5 à 11 % ce qui est très en dessous du résultat espéré situé entre 20 et 30 %. La prévalence en Bonamia est passée de 2 - 3 % à 12 % durant la 3ème année d'élevage et ce taux ne justifie pas une telle perte. Celle-ci est en grande partie attribuable à la prédation par bigorneaux perceurs, surtout en début d'élevage, et par étoiles de mer durant les 2 dernières années. Malgré des nettoyages fréquents au faubert et en plongée, une trentaine de sorties ayant permis d'éliminer 30 000 étoiles, la quantité d'étoiles observée se situait entre 0,1 et 1,1 étoile au m². Le problème est d'ailleurs général à la Baie de Quiberon et a justifié l'engagement d'un technicien contractuel par le C.I.C. pour améliorer les moyens de lutte, en relation avec le laboratoire IFREMER de la Trinité/Mer.

Semis d'huîtres d'origine Méditerranéenne

A la suite d'un contrat passé avec un ostréiculteur, un semis de 2 500 000 huîtres plates d'origine méditerranéenne a été effectué sur 2,5 hectares de la concession IFREMER en Baie de Quiberon pour une première approche de l'adaptation de ce naissain et de son évolution.

Ces huîtres ayant souffert du stockage en Méditerranée ont cependant repris leur croissance et ne montrent pas d'infestation par Bonamia en septembre 1988 (15 mois). Le risque le plus important à l'heure actuelle pour ce semis est la prédation par étoiles de mer. Des opérations de nettoyage ont permis d'en éliminer déjà plusieurs milliers.

1.2. - Estimation du recrutement sur coques de moules en eau profonde

Cette année encore, les opérations de captage en eau profonde se sont développées dans les 3 centres de production de naissain : Rade de Brest, Baie de Quiberon et Méditerranée.

Les estimations des différentes récoltes ont été effectuées entre septembre et décembre 1988 et sont résumées dans le tableau 5.

En Rade de Brest, dans le secteur de Loumergat, température et développements phytoplanctoniques ont été nettement plus favorables qu'en 1987, assurant un taux de captage trois fois plus important. L'effort de captage produit par l'Association RPL ayant été doublé, l'opération a permis de récolter 7,8 millions d'huîtres destinées au secteur de Cancale. Trois ou quatre autres professionnels ont également immergé des collecteurs dans ce site, leur récolte devant être transférée sur Cancale ou sur St-Brieuc.

En Baie de Quiberon, le taux de captage est plutôt médiocre en raison de mauvaises conditions thermiques. L'effort de captage ayant cependant plus que doublé, la récolte atteint près de 43 millions d'huîtres dont 5,8 pour le C.I.C.. Une partie de cette récolte a été semée directement sur le site en automne dont celle du C.I.C.. Dix à quinze millions d'huîtres ont été ou seront transférées sur Cancale entre novembre et février.

En Méditerranée, à Port-Vendres, le taux moyen de captage est sensiblement égal à celui de l'an passé (0,7 naissain par coque) mais le relevage effectué avant la période des tempêtes a permis de semer l'intégralité de la récolte, partagée entre Cancale (19 millions d'huîtres) et le Banc amodié de la Baie de Quiberon (5,8 millions d'huîtres). Ce relevage précoce se traduit cependant par une taille au semis très faible, 37 % à 53 % des individus selon les lots mesurant moins de 3,5 mm. Un essai effectué en Baie de Quiberon sur un petit lot expérimental, a permis de montrer que le naissain de petite taille pouvait survivre après un mois de semis mais le taux de survie reste à préciser sur des lots plus importants.

A Gruissan, toujours en Méditerranée, le captage a été meilleur cette année avec 2 à 3 fixations par coque selon des sondages restreints. L'essentiel de la récolte est destiné à la Baie de Quiberon ; une partie ayant déjà été semée en automne, le transfert de l'autre est prévu au printemps.

Au total, la récolte de naissain d'huîtres plates capté en suspension s'élève à environ 90 millions d'huîtres, tous secteurs confondus, dont 20 millions pour le C.I.C.. Elle est ainsi près de 3 fois supérieure à celle de l'an dernier en raison d'une augmentation de l'effort de captage et de l'absence de tempête (tableau 5).

Des semis expérimentaux sont prévus en février sur la concession IFREMER. Ils doivent permettre la comparaison du naissain de différentes origines sur le plan survie, croissance et sensibilité à Bonamia.

1.3. - Epidémiologie dans les différents centres bretons (cf. tableau 6).

Une surveillance zoosanitaire s'exerce régulièrement sur les différentes espèces de coquillages d'importation ou indigènes : la méthode consiste à rechercher au microscope optique d'éventuels agents pathogènes, à partir de frottis ou de coupes histologiques de différents tissus.

Les nombres d'individus analysés au cours de l'année 1988 sont de :

- coquillages d'importation (toutes espèces).....	1288
- coquillages français	
. huîtres plates naturelles.....	1221
. huîtres plates d'élevage.....	4209
. autres coquillages.....	2021
 Total coquillages français.....	 7451

L'effort consacré à l'huître plate en raison de la présence de 2 agents pathogènes Marteilia refringens et Bonamia ostreae, est donc considérable.

SITE		ANNEE 1988	ANNEE 1987
		MILLIONS D'HUITRES	MILLIONS D'HUITRES
BAIE DE QUIBERON	CIC	6,7 \pm 21 %	3,8 à 5,7
	PROFESSIONNEL	environ 36	11 à 15
RADE DE BREST	CIC	7,8 \pm 44 %	environ 0,6
	PROFESSIONNEL	3,2	environ 3
MEDITERRANEE	CIC	5,8 \pm 39 %	-
	PROFESSIONNEL	20 à 40	environ 8,5
TOTAL	CIC	20,4 \pm 21 %	4,2 à 6,5
	PROFESSIONNEL	environ 70	22 à 27
TOTAL GENERAL		environ 90	26 à 34

Tableau 5 Récolte de naissain d'huître plate capté en eau profonde sur coques de moules en suspension dans les différents secteurs. Année 1987 et 1988

Année de naissance Origine	1983			1984			1985			1986			1987		
	N	%Ma	%Bo	N	%Ma	%Bo	N	%Ma	%Bo	N	%Ma	%Bo	N	%Ma	%Bo
Golfe du Morbihan				72	72.2	0	39	46.1	0	21	23.8	0			
Riv. de St-Philibert	42	2.4	30.8	31	0	22.5	31	0	29	15	0	13.3			
Rivière de Crac'h							12	50	25						
Baie de Quiberon	119	0	4.2	197	0	10.6	81	0	12.3	20	0	0	30	0	0
Odet	50	0	4	50	0	6									
Banc de Loumergat										22	90.9	9.9			
Rivière de Penzé				35	0	0	50	0	0						
Riv. du Jaudy (Tréguier)										30	3.3	0			
Rivière du Trieux	26	76.9	7.6	30	6.6	0	37	78.3	0				30	0	0
Méditerranée	51	0	21.5												
Marennes	45	0	0												
Baie de Bourgneuf	60	0	0												

Tableau n° 6 : Bilan des examens réalisés sur les huîtres naturelles de Bretagne Sud et de Bretagne Nord en 1988

N = nombre d'huîtres examinées - %Ma = Pourcentage d'huîtres infestées par Marteilia refringens

%Bo = Pourcentage d'huîtres infestées par Bonamia ostreae

1.3.1. Gisements naturels hors Bretagne

Les observations effectuées sur des lots de 4-5 ans en provenance de la Baie de Bourgneuf, et du bassin de Marennes-Oléron (sud de l'Ile d'Aix) n'ont révélé aucun parasite.

9 [Par contre un lot d'huîtres plates naturelles présentes le long de la digue du Port de Sète en Méditerranée s'est montré parasité par Bonamia.

1.3.2. Gisements naturels de Bretagne Sud

Le Golfe du Morbihan demeure très touché par la marteilliose ; par contre Bonamia, habituellement présent à des taux faibles n'y a pas été observé en 1988.

A l'inverse, la rivière de St-Philibert montre une quasi-disparition de Marteilia, mais une nette augmentation de Bonamia par rapport à l'année 1987.

Les 2 parasites sont observés à des taux élevés dans l'échantillon de la rivière de Crac'h.

1.3.3. Gisements naturels de Bretagne Nord

Le gisement naturel de Loumergat en Rade de Brest reste très affecté par Marteilia. Par contre, les gisements de Penzé et Morlaix confirment un état zoosanitaire très satisfaisant (aucun Marteilia ni Bonamia décelé dans les échantillons observés).

Les huîtres du Trieux, comme les années précédentes, présentent peu ou pas de Bonamia, mais beaucoup de Marteilia.

1.3.4. Elevages en terrain découvrant (cf. parag. 1.1.1.)

Les quelques analyses effectuées en 1988 sur le site de Paimpol ne montrent pas d'amélioration de la situation dans ce secteur.

1.3.5. Elevages en eau profonde (cf. parag. 1.1.2.)

Les résultats des élevages en eau profonde dans les Baies de Cancale, St-Brieuc et Quiberon ne permettent pas de conclure à une évolution sensible de la situation zoosanitaire de ces baies durant l'année 1988.

La situation peut être jugée satisfaisante mais sans évolution récente marquée à Cancale et Quiberon ; elle reste médiocre en Baie de St-Brieuc.

2

En résumé, l'échantillonnage réalisé tant sur les gisements naturels que sur les élevages ne permettrait en aucun cas de déceler une évolution fine. Par contre on peut affirmer que l'année 1988 n'a vu ni amélioration ni détérioration très nette de la situation des 2 épizooties de l'huître plate.

B - EXPERIMENTATIONS ZOOTECHNIQUES

2.1. Effet des transferts

Pour la 4ème année consécutive des géniteurs ont été transférés au printemps 1988 de Cancale vers la Baie de Quiberon, par le C.I.C. Bretagne Sud, pour accroître le potentiel de captage de ce secteur. Un premier lot de 30 tonnes d'huîtres triées dont 2 % des individus étaient parasités par Bonamia a dû être relevé en septembre, 28 % des huîtres étant alors parasitées. Un 2ème lot de 21 tonnes livrées en vrac s'est contaminé moins vite (13 % en septembre) pour atteindre en novembre le même taux de 28 %. Sur un échantillon témoin du lot resté sur place à Cancale, 4 % à 14 % des huîtres présentaient du Bonamia au même moment, tandis que les huîtres de Quiberon du même âge étaient touchées à 10 %. Comme les années précédentes, ce transfert de géniteurs se traduit donc par une infestation accrue par Bonamia, après la ponte, par rapport aux lots non transférés. Cependant 42,6 tonnes ont pu être relevées à l'automne sur les 51 tonnes semées.

Dans le même but, 9 tonnes de géniteurs ont été transférées en mai 1988, de Cancale à Loumergat, en Rade de Brest. La prévalence initiale en Bonamia était comprise entre 2 % et 12 %. Après la ponte, à la fin septembre 1988, 5 % des huîtres de l'échantillon observé étaient touchées par Bonamia, et 55 % par Marteilia. L'effet du transfert lui-même n'est ici pas évident, se confondant en partie avec l'effet du site de réception, dont les huîtres naturelles sont très touchées par Marteilia.

L'impact de transfert entre 2 secteurs de la Baie de Quiberon, avec ou sans passage à terre, a pu être apprécié sur quelques lots en 1988 (tableau 7). Le lot transféré au printemps avec 2 passages en chantier montre une augmentation très significative de la prévalence et un taux de mortalité important. Deux des lots ressemés directement après relevage présentent une infestation sensiblement plus importante que le lot resté en place sans que l'on ait pu vérifier toutefois le taux de contamination du secteur environnant le lot transféré. L'infestation du troisième lot n'est par contre pas significativement différente du lot du même âge non transféré.

Il est donc démontré que les transferts de géniteurs au printemps les sensibilisent à la bonamiose. Des transferts expérimentaux seront tentés en hiver en 1989. Par contre, l'impact de courts transferts, de manipulations, d'exondations, de hersages.. devra être mesuré plus précisément, et explicité.

DATE CAPTAGE	DATE TRANSFERT	CONDITIONS DE TRANSFERT	PREVALENCE INITIALE %	DATE CONTROLE	PREVALENCE AU CONTROLE %	PREVALENCE DU LOT RESTE SUR PLACE OU D'UN LOT DE MEME AGE %
Eté 1985	mars 1987	relevage chantier 1 chantier 2 semis	3/152 2 %	fin janvier 88	34/60 57 %	< 14 %
Eté 1985	automne 1987	relevage semis	— —	novembre 1988	13/100 13 %	3/50 6 %
Eté 1986	automne 1987	relevage semis	— —	novembre 1988	10/50 20 %	0/50 0 %
Captage naturel 1985	décembre 1987	relevage semis	1/46 2 %	fin juin 1988	14/81 17 %	7/50 14 %

Tableau 7 :

Evolution de la prévalence à la suite du transfert de lots d'huîtres plates de 18 mois et 2 ans d'un secteur à un autre secteur de la Baie de Quiberon.

2.2. Elevage mixte huîtres plates/huîtres creuses

L'huître creuse Crassostrea gigas est insensible aux deux épizooties qui affectent actuellement l'huître plate Ostrea edulis.

Ceci peut s'expliquer par la destruction du parasite Bonamia ostreae, à la suite de sa pénétration au niveau des hémocytes, mise en évidence au laboratoire IFREMER de la Tremblade.

Par ailleurs, des professionnels ont parfois signalé un effet bénéfique des huîtres creuses sur les huîtres plates en mélange : par exemple les semis du captage 1983 en Baie de Quiberon et à Cancale auxquels était mélangé du naissain d'huîtres creuses ont donné des résultats plutôt supérieurs à la moyenne des élevages.

Ces observations ont suggéré la mise en place en 1988 d'une série d'essais d'élevage mixte "plates-creuses" afin de vérifier l'hypothèse d'une amélioration des rendements en huîtres plates en mélange avec des huîtres creuses. Le lot expérimental d'huîtres plates de 18 mois provenait d'un secteur de la Méditerranée non contaminé par Bonamia. Deux facteurs ont été testés : la proportion optimale d'huîtres creuses et la densité d'animaux en élevage.

Pour le facteur densité, nous avons retenu deux modalités extrêmes qui sont 200 et 400 animaux par poche ostréicole. Le facteur proportion quant à lui comporte 4 modalités, soit :

- 0 % d'huîtres creuses
- 25 % d'huîtres creuses
- 50 % d'huîtres creuses
- 75 % d'huîtres creuses

Dans le but de cerner la période d'apparition d'une différence éventuelle l'ensemble de ce plan est reproduit trois fois.

Fin septembre 1988 nous avons relevé une première série de 40 poches représentant les 8 combinaisons en essais : après 6 mois d'élevage nous obtenons, pour les mortalités d'huîtres plates, les résultats suivants :

% de creuses Densité totale par poche	0	25	50	75
	:	:	:	:
200	12.7	16	18.3	12
	11.4	13.4	19.2	14.3
	18.1	16.6	17.2	20
	15.5	17.4	12.1	25.4
	17.5	46.6	15	18
400	12.6	25.5	23	19.8
	15.1	22.6	10.5	8.3
	18.1	17.3	17.3	22.3
	13	15.1	17.5	9.9
	19.3	22.3	8	6

Tableau 1 : mortalités (%/poche) en fonction des 2 facteurs étudiés.

Parallèlement l'hémolymphe de 1200 huîtres plates a été prélevée et stockée pour analyses pathologiques ultérieures.

Les mortalités moyennes sont respectivement 17,3 % et 16,1 % pour 200 et 400 huîtres par poche (figure 4).

Une analyse de variance n'a pas mis en évidence de différence significative entre ces valeurs.

De même (figure 5) les mortalités enregistrées sont du même ordre pour les différentes proportions d'huîtres creuses.

En combinant les deux facteurs testés (figure 6) on constate que quels que soient la densité ou le pourcentage d'huîtres creuses, les mortalités sont similaires d'un traitement à l'autre après 6 mois d'élevage.

Il est prévu de mener cette comparaison jusqu'à la fin 1989, date à laquelle l'ensemble des séries sera relevé.

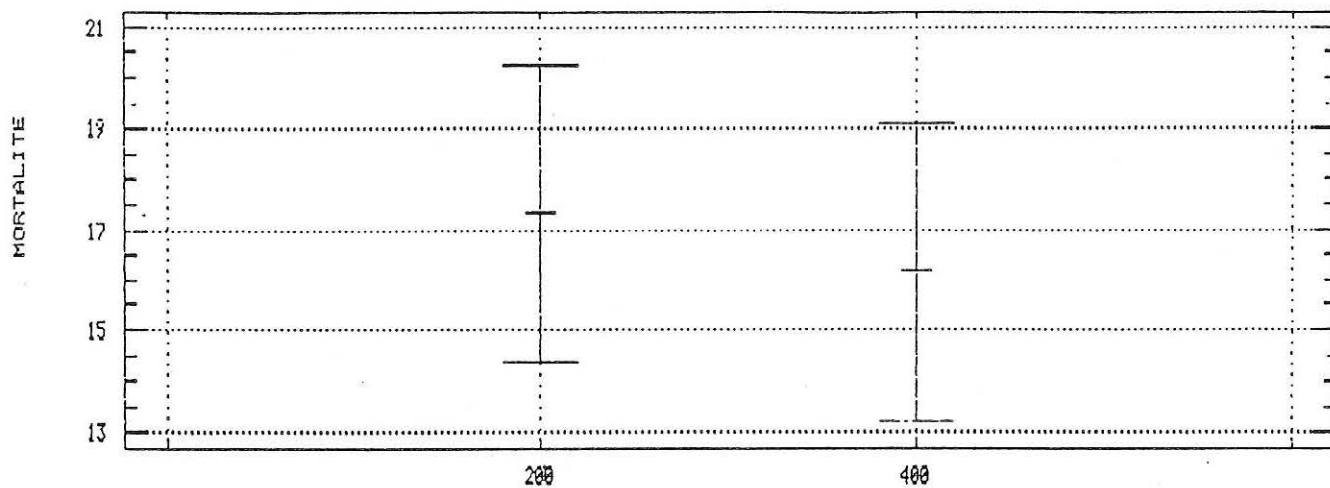


Figure 4 : Mortalités en fonction des densités d'élevage

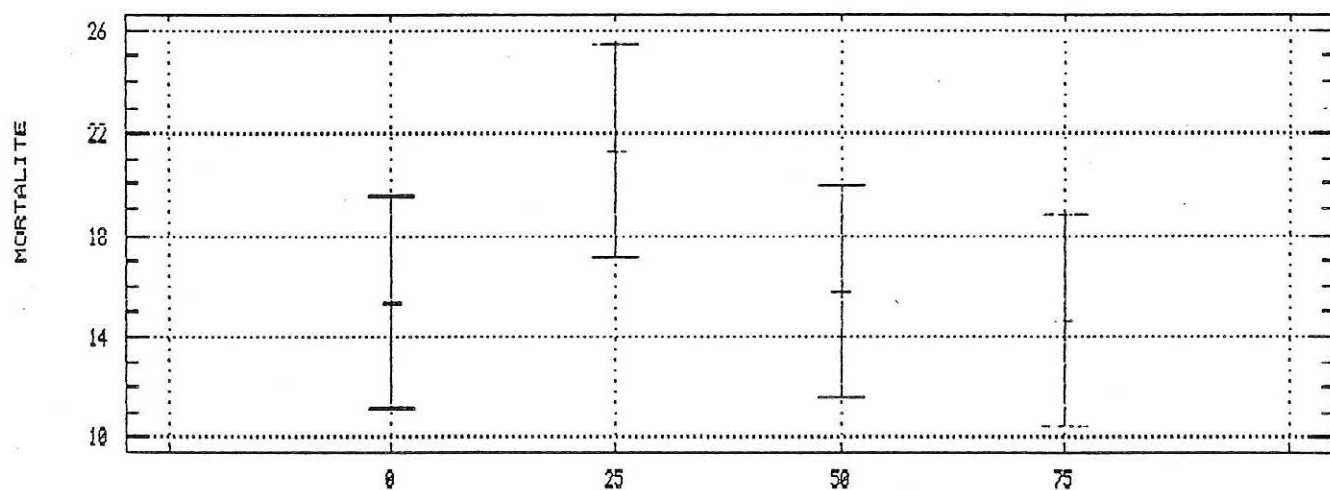


Figure 5 : Mortalités en fonction des proportions d'huîtres creuses

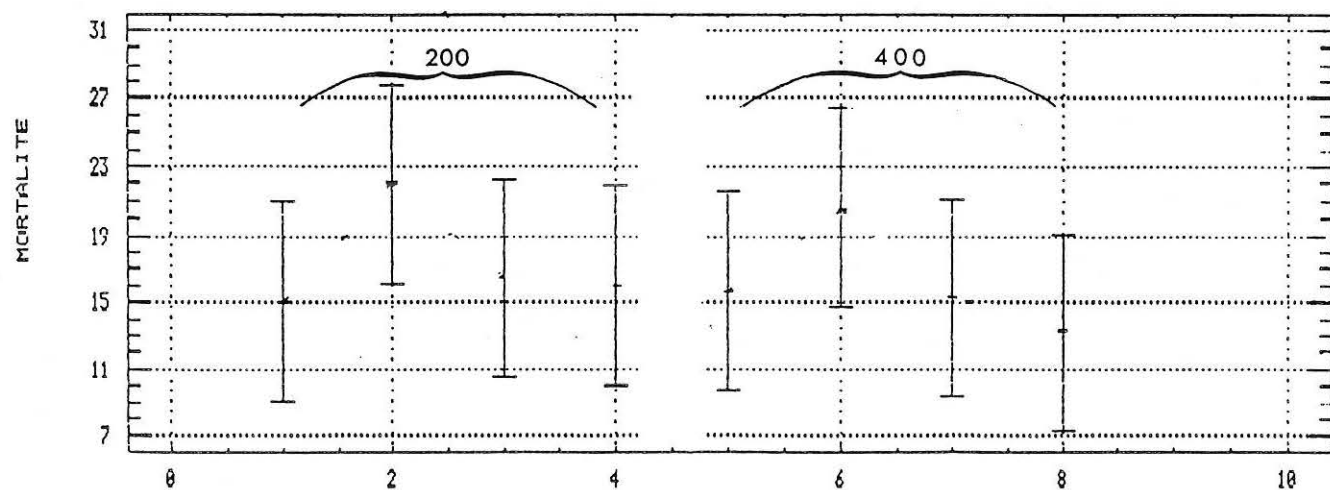


Figure 6 : Mortalités en fonction des 2 facteurs

2.3. Essai de sélection d'une souche d'huîtres plates résistante à Bonamia

Cette tentative de sélection se fait par 2 voies :

- sélection des survivantes après injection de Bonamia purifié au laboratoire : entreprise au laboratoire de La Tremblade et poursuivie à La Trinité/Mer en fin 1988, elle fournira en 1989 une 1ère génération d'huîtres à tester.

- sélection de géniteurs âgés ayant survécu dans un secteur contaminé par Bonamia ostreae.

Cette deuxième voie donne lieu depuis avril 1986 à un suivi comparatif de 2 lots d'huîtres, l'un produit en écloserie à partir de géniteurs sélectionnés et l'autre issu de captage naturel, en guise de témoin. Cette comparaison est réalisée dans 2 contextes très différents : en Bretagne Nord, en découvrant, et en Baie de Quiberon, en eau profonde.

En Bretagne Nord (Penzé et Paimpol), ce suivi a mis en évidence au cours des années 1986 et 1987 des différences marquées de mortalité et d'infestation par Bonamia ostreae, en faveur du lot sélectionné de 1ère génération (cf. rapports d'avancement des travaux 1986 - 1987). La fin de cette expérience comparative a été suivie à partir de mars 1988 en Penzé, en poches, à raison de 150 huîtres par poche, selon le protocole suivant :

- 1 poche témoin d'huîtres de captage naturel
- 4 poches de tête de lot d'écloserie
- 4 poches de corps de lot d'écloserie
- 3 poches de queue de lot d'écloserie

Les mortalités cumulées observées sur chacun de ces lots sont représentées sur la figure 7. On constate comme précédemment une mortalité moindre sur les lots sélectionnés.

En Baie de Quiberon, sur la concession IFREMER, 2 lots ont été semés au sol en 1986 :

- un lot du captage 1985 sur coques de moules en suspension, sur une surface de 1,24 hectares à la densité initiale de 60 h/m².

- 150 000 naissain d'écloserie du même lot sélectionné, que celui testé en Bretagne Nord, à la densité au semis de 150 h/m².

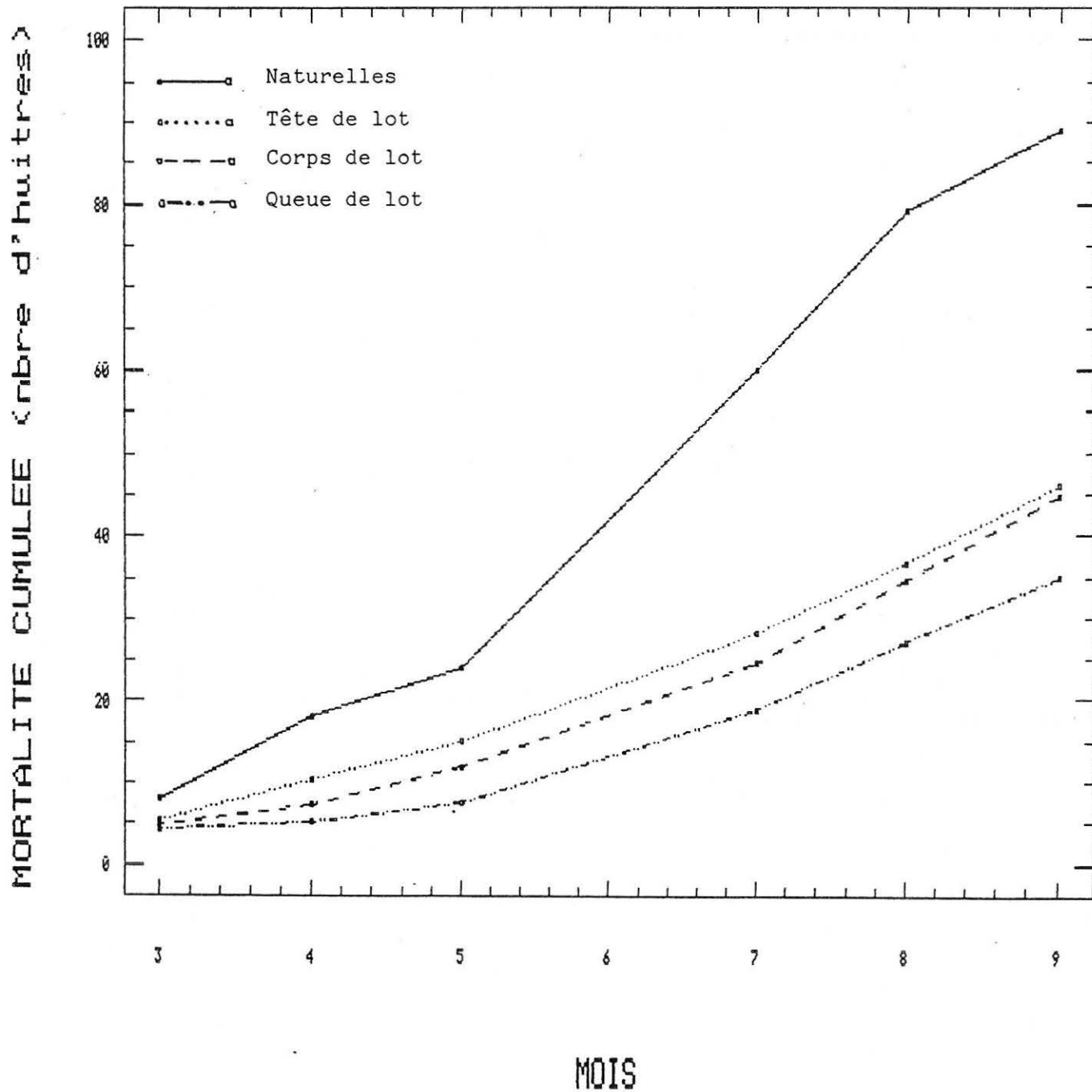


Figure 7 : Evolution des mortalités cumulées en 1988 sur les 4 lots expérimentaux

En novembre 1988, un contrôle épidémiologique par frottis a mis en évidence une différence sensible de prévalence en Bonamia ostreae sur ces 2 lots : 12 % (12 sur 100) d'huîtres parasitées sur le témoin contre 2,4 % (4 sur 166) sur le lot d'écloserie.

Ce résultat tendrait donc à conforter l'hypothèse d'une résistance transmise à une première génération d'huîtres plates.

Il convient cependant d'être prudent sur cette conclusion. L'origine des lots de naissain mis en comparaison (écloserie pour l'un, captage naturel pour l'autre) peut en effet induire certaines différences de mortalités et de sensibilité à Bonamia ostreae. Les essais en cours d'injection de Bonamia ostreae purifié devraient permettre de mieux étayer l'hypothèse de résistance. D'autre part, il reste à vérifier que cette résistance se transmet à la 2ème génération.

C - ETUDE DES MECANISMES DE DEFENSE

La mise au point de modèles in vitro et l'amélioration de techniques de laboratoire ont permis d'entreprendre l'étude des cellules effectrices de l'immunité cellulaire, de leurs relations avec Bonamia ostreae, mais également des mécanismes d'échappement employés par ce parasite.

Cette étude comparative a été réalisée avec les deux genres de Mollusques couramment élevés en Bretagne, Ostrea edulis, espèce sensible et hôte de B.ostreae, puis en fonction des molécules mises en jeu (système enzymatique, protéines particulières), tenter de provoquer leur synthèse ou de les inhiber afin d'accroître la résistance de l'huître plate.

Le rapport ci-après donne l'ensemble des résultats obtenus au cours de la réalisation du plan sur les mécanismes de défense des Mollusques, modèle Huître-Bonamia ostreae.

1 - ANALYSE MORPHOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES

1. Morphologie en microscopie photonique

Pour cette étude, sans qu'il soit possible d'avancer une explication rationnelle, la cytologie est bien meilleure avec les hémocytes préparés par empreinte de coeur (fig.8 et 9, Pl.II) qu'avec les préparations de frottis humides.

Trois types d'hémocytes peuvent être identifiés dans les deux espèces :

- les cellules de type I, de taille homogène (environ 10 µm) ont un rapport nucléocytoplasmique faible. Leur cytoplasme, chromophile, contient de nombreuses granulations brunâtres dont une affinité acidophile, basophile ou neutrophile apparaît difficile à préciser en raison de leur aut pigmentation (fig.10, Pl.II).
- les cellules de type II de taille homogène (environ 15 µm), à rapport nucléocytoplasmique faible ont un noyau souvent excentré. Leur cytoplasme se colore en gris rosé ou rose pâle et ne contient pas de granulation (fig.11, Pl.II).
- les cellules de type III sont beaucoup plus hétérogènes en taille (5 à 10 µm). Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, mais variable. Le cytoplasme, sans granulation se colore en bleu plus ou moins soutenu (fig.12, Pl.II).

2. Ultrastructure

2.1. Sur hémolymphie entière

Chez O.edulis, les hémocytes de type I apparaissent effectivement comme un type unique (fig.13, Pl.III) à contours irréguliers. Ils présentent des projections cytoplasmiques.

PLANCHE II

Morphologie des hémocytes d'Ostrea edulis et de Crassostrea gigas
en microscopie photonique : appositions de coeur.

Figure 8 :

Hémocytes d'Ostrea edulis

Figure 9 :

Hémocytes de Crassostrea gigas

t.I : Cellules de type I, à rapport nucléocytoplasmique faible.
Leur cytoplasme contient des granulations autopigmentées.

t.II : Cellules de type II, à rapport nucléocytoplasmique faible.
Leur cytoplasme ne contient pas de granulation.

t.III : Cellules de type III : petites cellules à rapport
nucléocytoplasmique élevé et cytoplasme azurophile
sans granulation.

Micrographies photoniques X 400

Figure 10 :

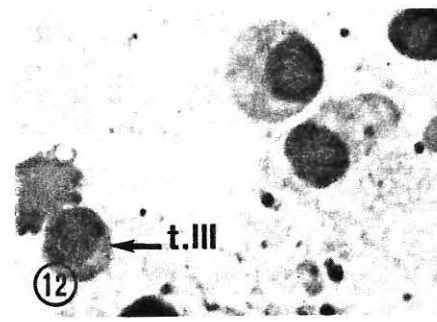
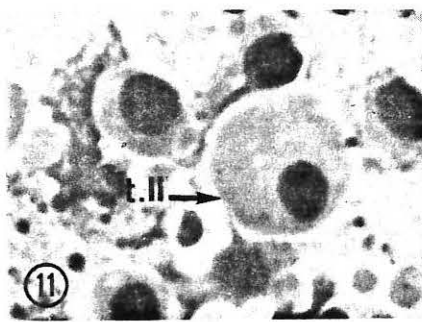
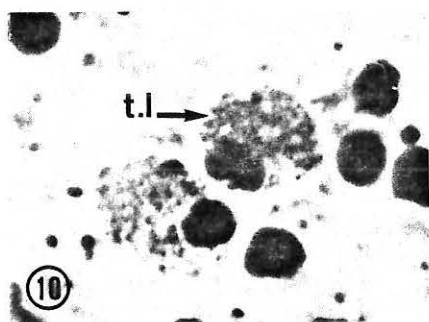
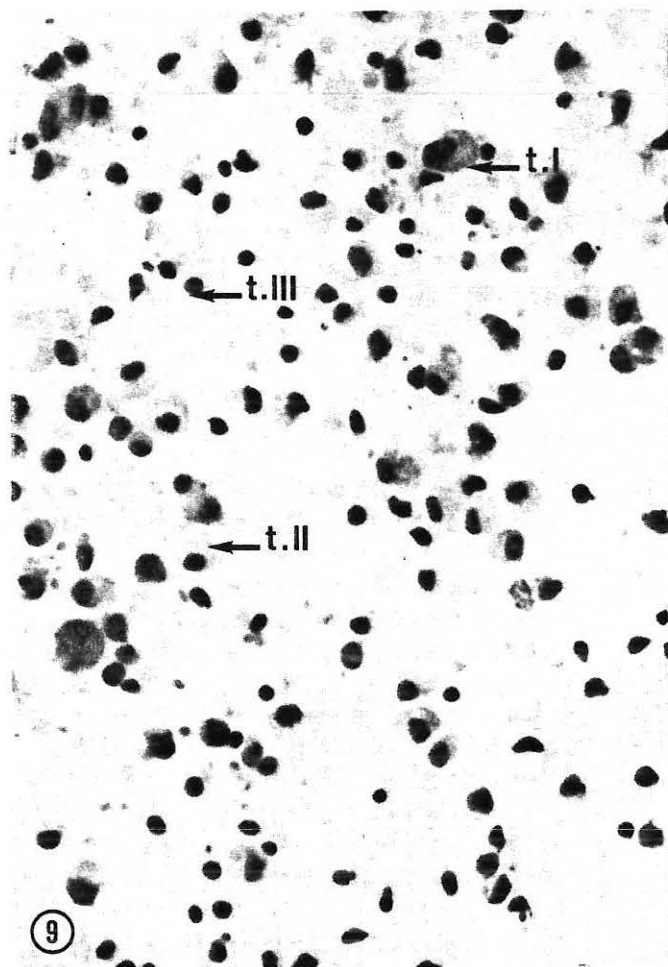
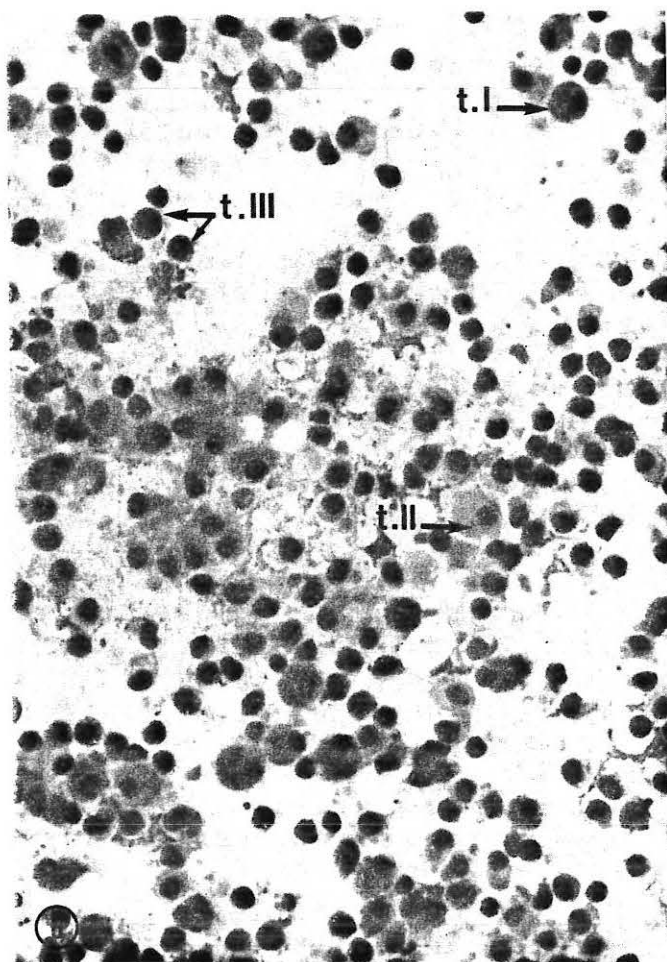
Fort grossissement d'un hémocyte granuleux de type I (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250

Figure 11 :

Fort grossissement d'un hémocyte de type II (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250

Figure 12 :

Fort grossissement d'un hémocyte de type III (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250



Dans le noyau arrondi, on observe rarement un nucléole. Le cytoplasme contient quelques mitochondries, des ribosomes libres, de rares profils de réticulum endoplasmique rugueux, des vacuoles contenant un matériel granulaire assimilable à du glycogène. L'appareil de Golgi n'est pas rencontré. La caractéristique essentielle des hémocytes de type I est la présence dans le cytoplasme de granules de structure hétérogène. Certains sont uniformément denses aux électrons (fig.13, Pl.III), d'autres ont un centre clair et un cortex dense (fig.14, Pl.III), les derniers ont un centre dense et un cortex clair (fig.15, Pl.III).

Chez C.gigas, les hémocytes de type I ont des caractéristiques générales identiques à celles des hémocytes de type I chez O.edulis à l'exception des granules cytoplasmiques.

- Le type Ia (fig.16, Pl.IV) contenant des granules nombreux, sphériques, uniformément denses aux électrons et de structure amorphe, peut ainsi être identifié.

- Le type Ib (fig.17, Pl.IV) se caractérise par des granules plus ou moins sphériques uniformément clairs aux électrons.

- Un type Ic (fig.18, Pl.IV), observé assez rarement, contient à la fois des granules de type Ia et Ib.

Les hémocytes de type II se révèlent identiques dans les deux espèces (fig.22 et 23, Pl.V). Leur forme est ovoïde. Le noyau présente les mêmes caractéristiques que celui des hémocytes de type I. Le cytoplasme contient des mitochondries plus nombreuses, parfois regroupées. Un appareil de Golgi typique, ainsi que du réticulum endoplasmique rugueux sont plus fréquemment observés. Ce type cellulaire est particulièrement riche en réticulum endoplasmique lisse et comporte d'innombrables petites vésicules claires aux électrons. Quelques granules modérément denses aux électrons sont parfois présents.

La population des hémocytes de type III regroupe chez O.edulis et chez C.gigas des cellules polymorphes, arrondies ou amoéboïdes (fig.24 et 25, Pl.VI). Le noyau présente fréquemment un nucléole. Dans le cytoplasme, on rencontre un appareil de Golgi, des mitochondries le plus souvent regroupées, du réticulum endoplasmique rugueux parfois disposé en périphérie du noyau, de nombreux ribosomes libres et pas de granulation.

2.2. Sur types cellulaires séparés de C.gigas

2.2.1. Distribution des hémocytes dans le gradient de

Percoll

L'interface 10-20 % contient quelques cellules agranuleuses et des débris cellulaires. Les deuxième et troisième bandes contiennent des cellules agranuleuses de taille variable.

PLANCHE III

Ultrastructure des hémocytes de type I d'Ostrea edulis sur hémolymphe entière

Figure 13 :

Hémocyte de type I contenant trois types de granules :

- . granules à cortex dense et centre clair aux électrons (gr 1)
- . granules uniformément denses aux électrons (gr2)
- . granules à centre dense et cortex clair aux électrons (gr3)

Micrographie électronique X 16000

Figure 14 :

Détail d'un granule à cortex dense et centre clair (gr1)
Micrographie électronique X 24000

Figure 15 :

Détail des granules à centre dense et cortex clair (gr3)
Micrographie électronique X 24000

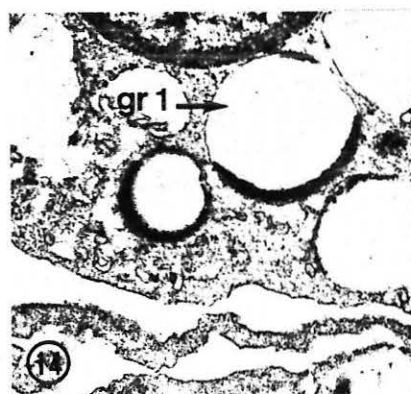
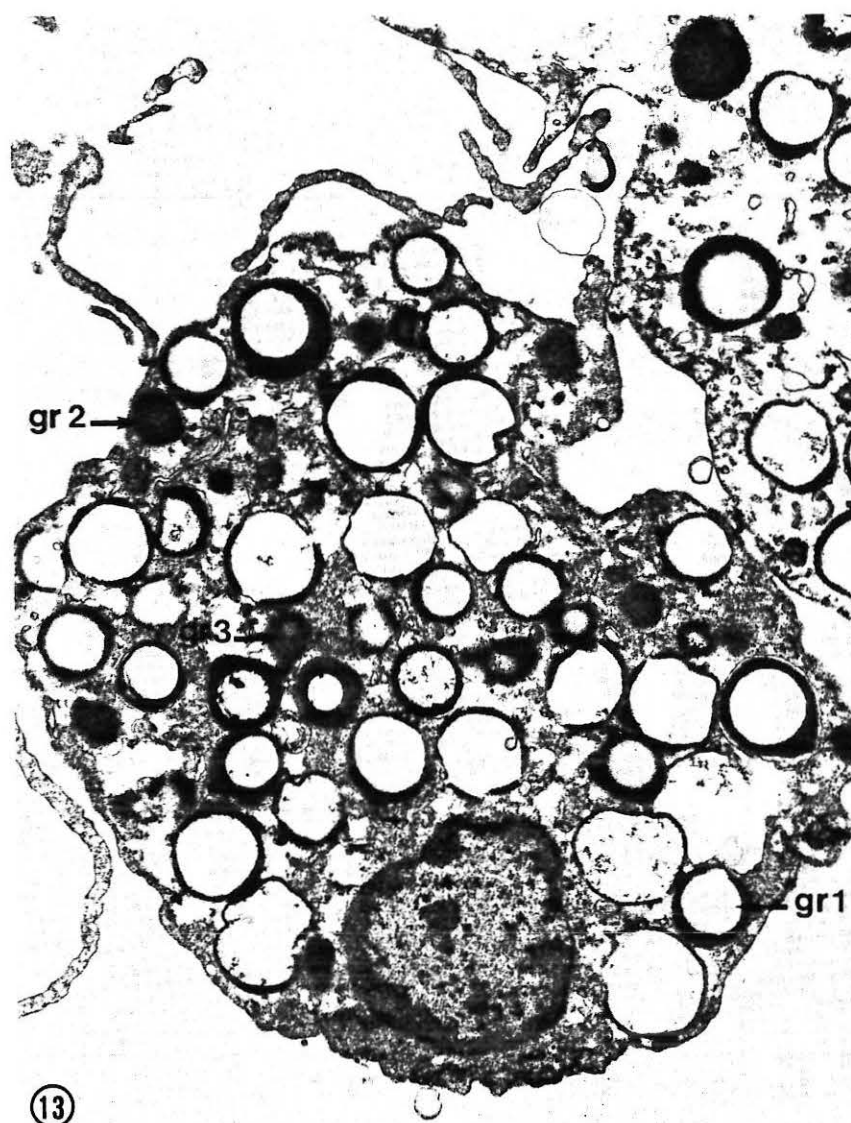


PLANCHE IV

Ultrastructure des hémocytes de type I
chez Crassostrea gigas sur hémolymphe entière

Figure 16 :

Hémocyte de type Ia contenant
de nombreux granules sphériques
uniformément denses aux électrons
(gd)
M.électronique X 20400

Figure 17 :

Hémocyte de type Ib à granules
clairs aux électrons (gc) et
quelques vacuoles contenant un
matériel assimilable à du
glycogène (gly)
M.électronique X 12500

Figure 19 :

Détail des granules denses
aux électrons entourés d'une
membrane (m)
M.électronique X 80000

Figure 18 :

Figure 20 :

Détail des granules intermédiaires
M.électronique X 80000

Hémocyte de type Ic contenant
à la fois des granules denses
et clairs aux électrons.
Certains granules apparaissent
intermédiaires (gi)
M.électronique X 25000

Figure 21 :

Détail des granules clairs
aux électrons
M.électronique X 80000

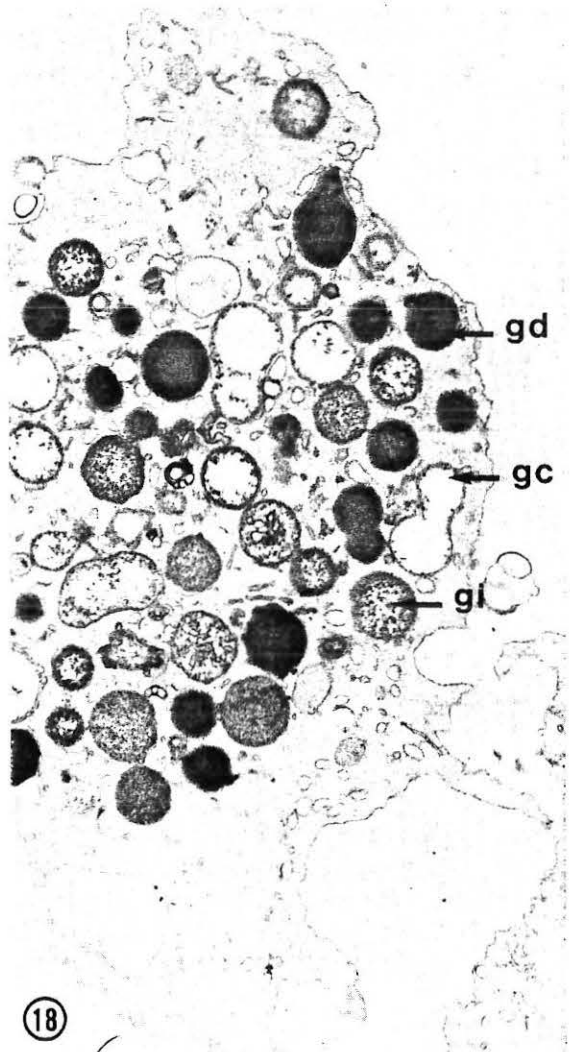
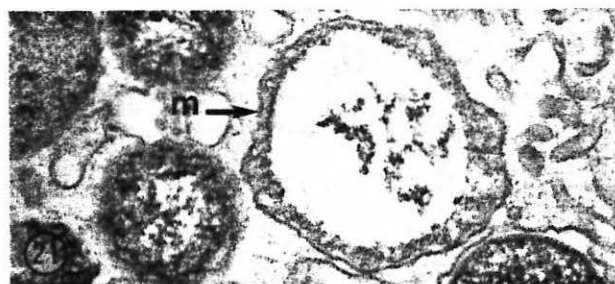
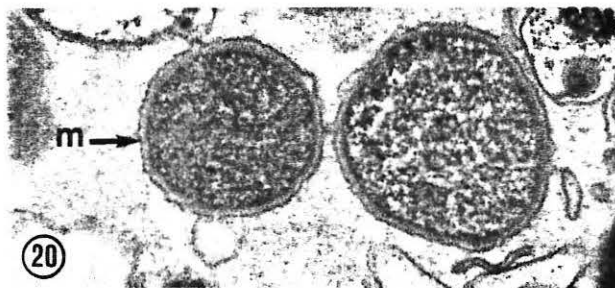
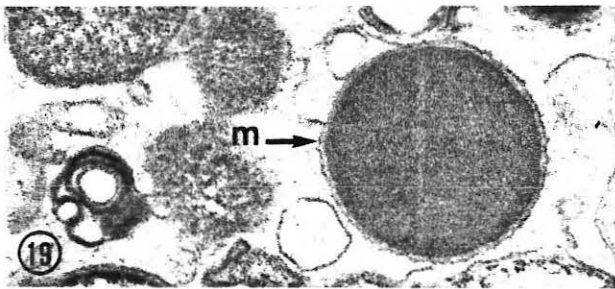
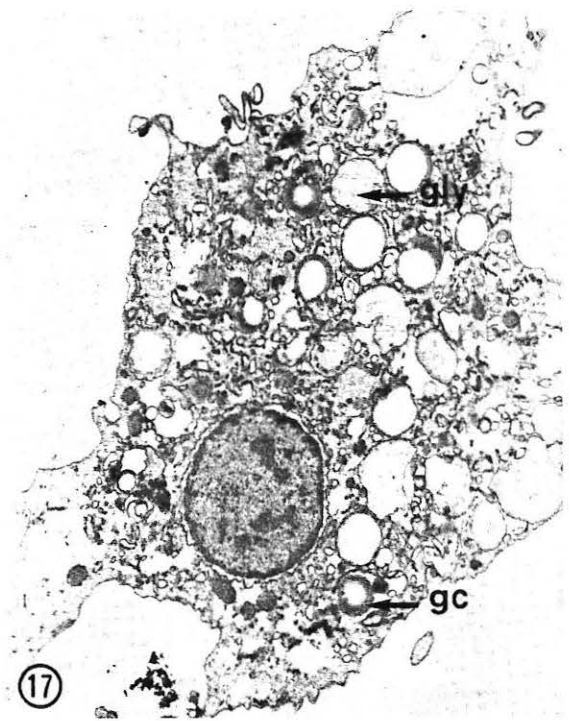
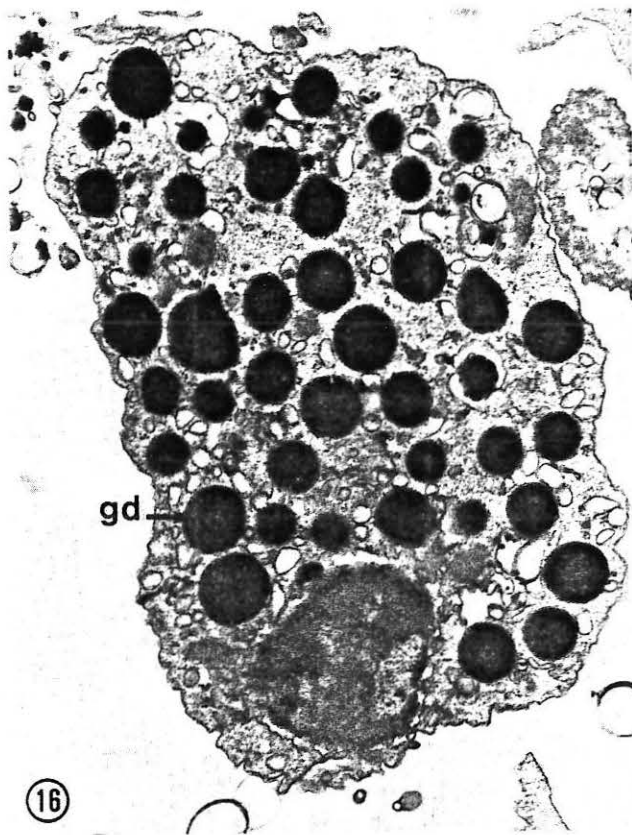


PLANCHE V

Ultrastructure des hémocytes de type II
sur hémolymphe entière

Figure 22 :

Ostrea edulis - Ce type cellulaire contient de très nombreuses vésicules (ve) claires aux électrons. Son noyau (n) présente une morphologie très similaire à celle des hémocytes de type I

Micrographie électronique X 11500

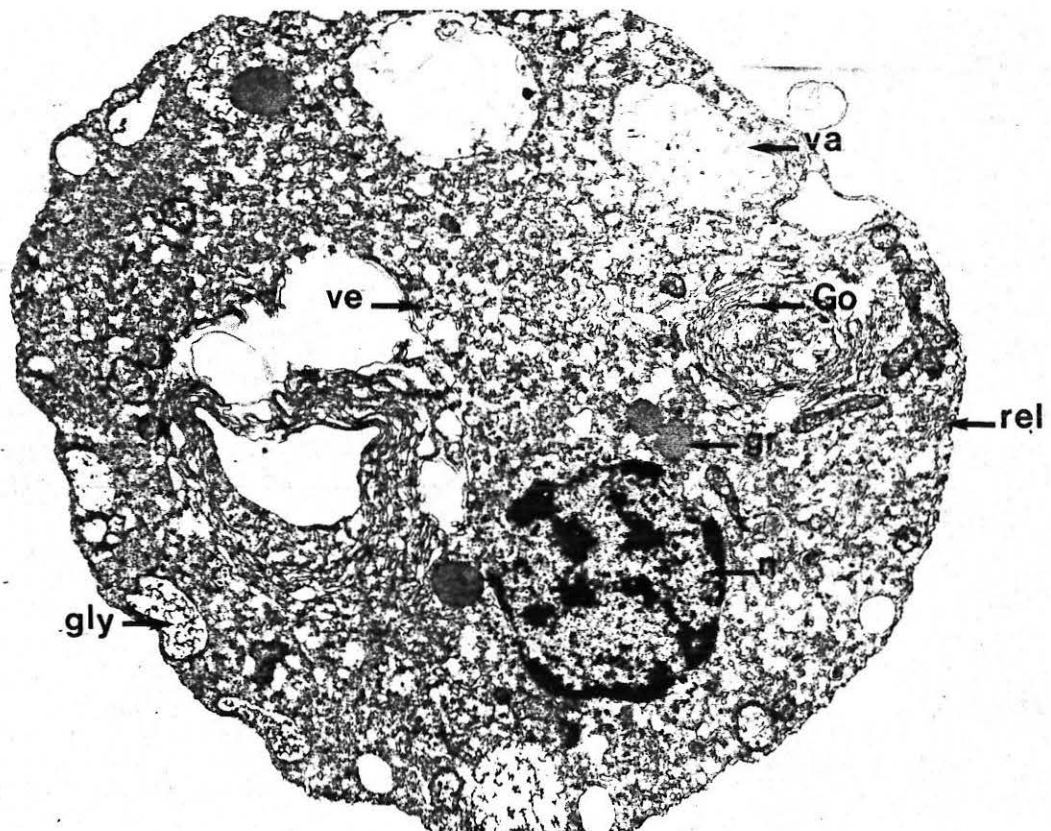
Figure 23 :

Crassostrea gigas - Sur ce cliché sont présents les typiques petites vésicules claires (ve), du réticulum endoplasmique lisse (rel), l'appareil de Golgi (Go), quelques granules cytoplasmiques (gr) modérément denses aux électrons, ainsi que des vacuoles (va) dont certaines contiennent du glycogène (gly)

Micrographie électronique X 15000



22



23

PLANCHE VI

Ultrastructure des hémocytes de type III sur hémolymphe entière

Figure 24 :

Ostrea edulis - Il faut noter le noyau (n) relativement volumineux, des mitochondries souvent regroupées (mi), du réticulum endoplasmique rugueux (rer)

Micrographie électronique X 20000

Figure 25 :

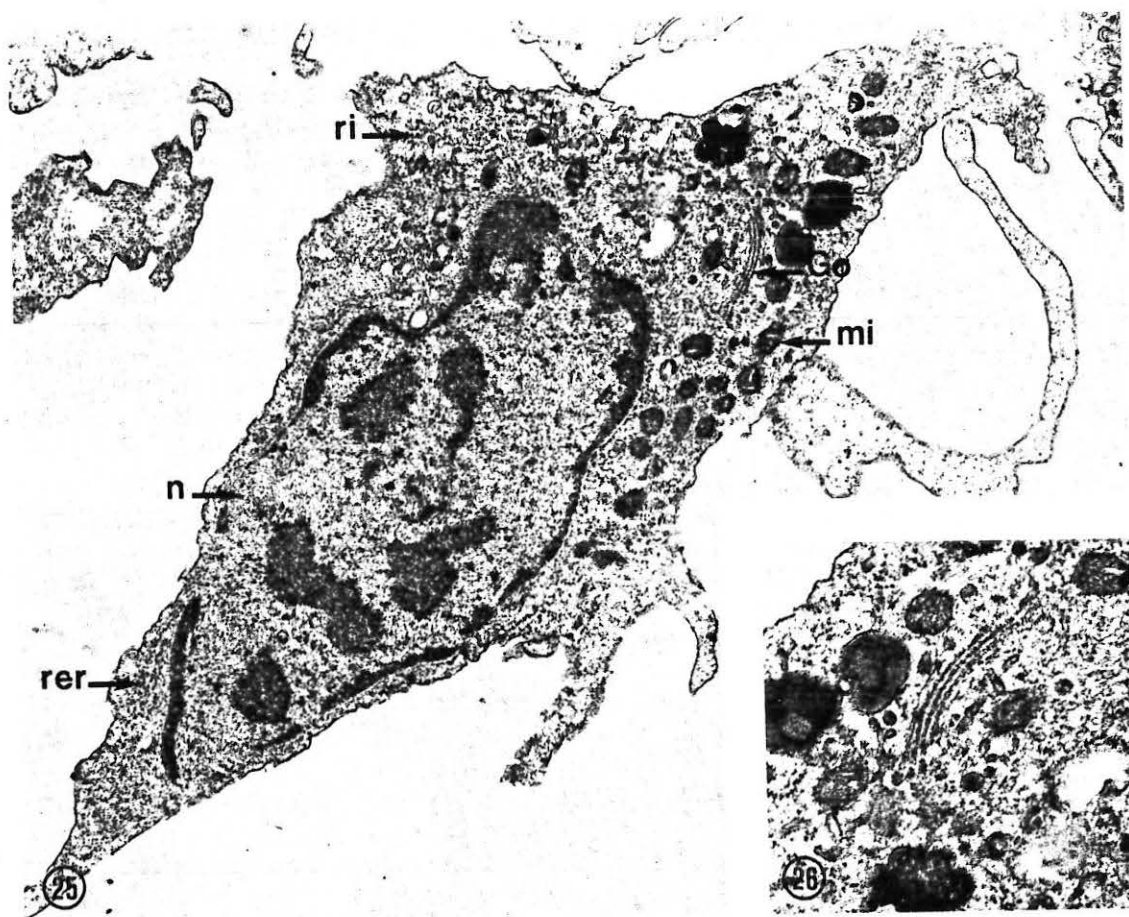
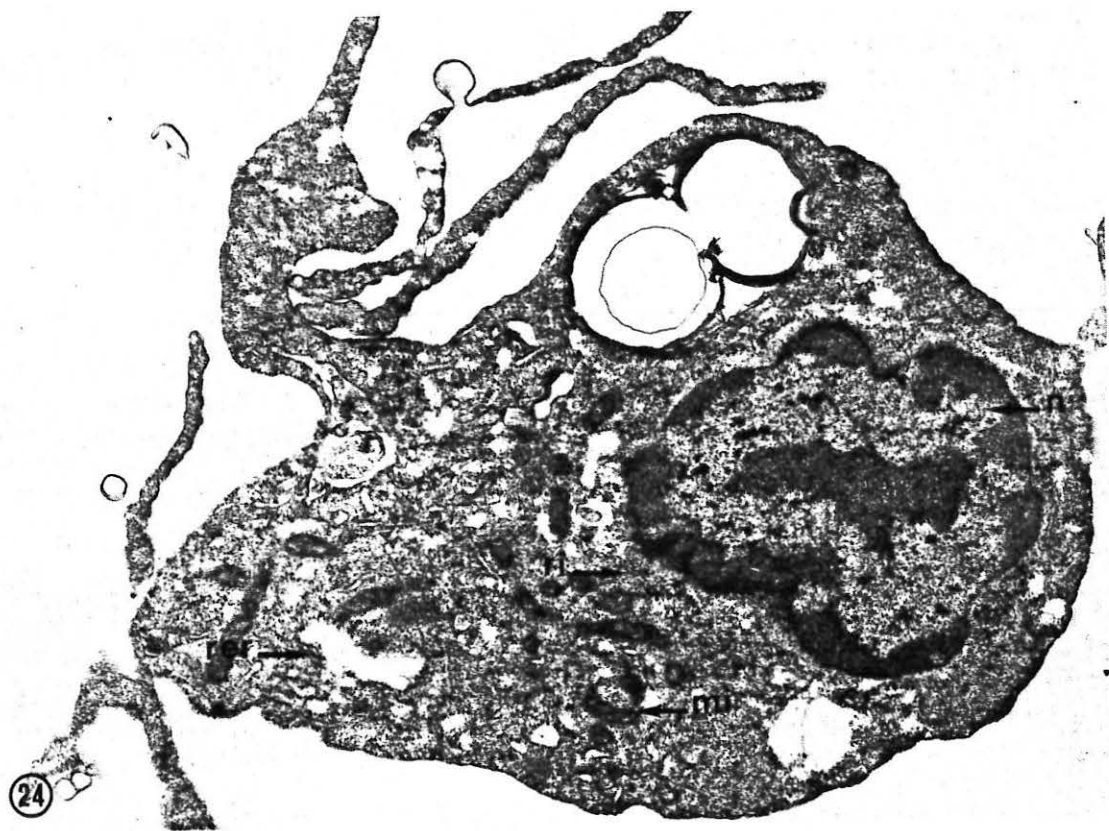
Crassostrea gigas - (n) noyau volumineux, (mi) mitochondries. Sur cette figure sont présents un appareil de Golgi typique (Go), du réticulum endoplasmique rugueux (rer) et de nombreux ribosomes libres (ri)

Micrographie électronique X 16200

Figure 26 :

Détail des saccules de l'appareil de Golgi

Micrographie électronique X 32500



La quatrième bande contient un mélange de cellules granuleuses et agranuleuses. Les interfaces 50-60 % et 60-70 % contiennent une population composée à 90 % de cellules granuleuses de type Ia et Ib (fig.27 et 28, Pl.VII) impossibles à séparer. La viabilité est estimée à 90 %.

2.2.2. Distribution des hémocytes dans les fractions

----- élutriées -----

Les hémocytes des deuxième et troisième bandes obtenues par centrifugation isopycnique sont de diamètre hétérogène. Ils sont élutriés en huit fractions correspondant à un volume cellulaire croissant. Les hémocytes des fractions F1 et F2 ont un rapport nucléocytoplasmique élevé et des ribosomes libres (fig.31, Pl.VII).

Dans les fractions F3 et F4, le cytoplasme est plus étendu et présente quelques vésicules claires aux électrons (fig.30, Pl. VII). Les cellules contenues dans les fractions F5, F6 et F7 ont un rapport nucléocytoplasmique faible, des vésicules claires aux électrons et un réticulum endoplasmique lisse étendu (fig.29, Pl. VII).

3. Détermination des hémogrammes

3.1. Numérations d'hémocytes au compteur cellulaire

Les estimations du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymphe, effectuées sur 50 individus de chacune des deux espèces sont présentées dans les figures 32 et 33. Elles mettent en évidence une très grande variabilité individuelle quelle que soit l'espèce considérée.

L'histogramme de la figure 34 fait apparaître des différences minimales de répartition entre les deux espèces, 68 % des individus se situant entre 1 et 5×10^6 hémocytes chez O.edulis contre 64 % chez C.gigas. Il y a moins d'individus à numération basse (inférieure à 1×10^6 hémocytes/ml) chez O.edulis.

3.2. Pourcentage des différents types hémocytaires

Sur la base des données morphologiques cohérentes en microscopie photonique et électronique, les cellules sont classifiées selon trois types :

- granulocytes : type I unique pour O.edulis, types Ia, Ib, Ic confondus pour C.gigas.
- grands hyalinocytes : type II pour les deux espèces
- petits hyalinocytes : type III pour les deux espèces

PLANCHE VII

Morphologie des types cellulaires séparés de Crassostrea gigas

Figure 27 :

Fraction regroupant
les interfaces 50-60 % et
60-70 % du gradient
de Percoll. Les hémocytes
à granulation claires
aux électrons (Ib)
y sont majoritaires
M.électronique X 5700

Figure 28 :

Autre champ de la même
fraction qui contient
un hémocyte de type Ia
(grains denses)
M.électronique X 10800

Figure 30 :

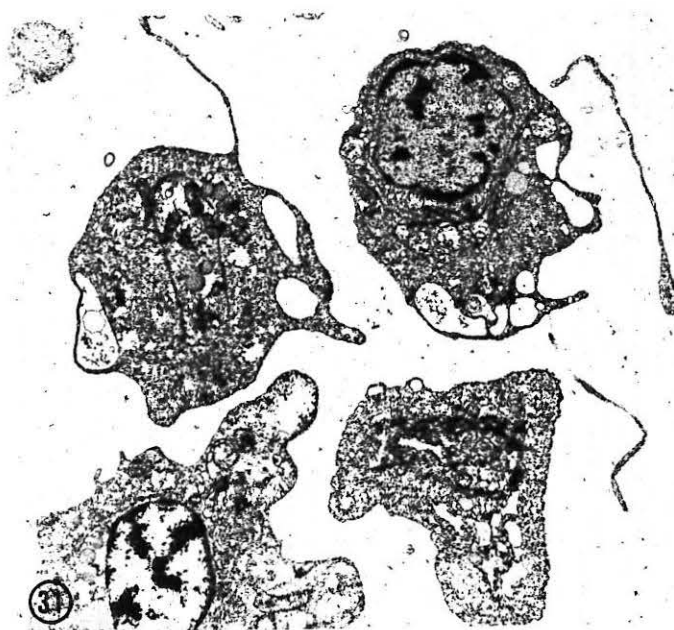
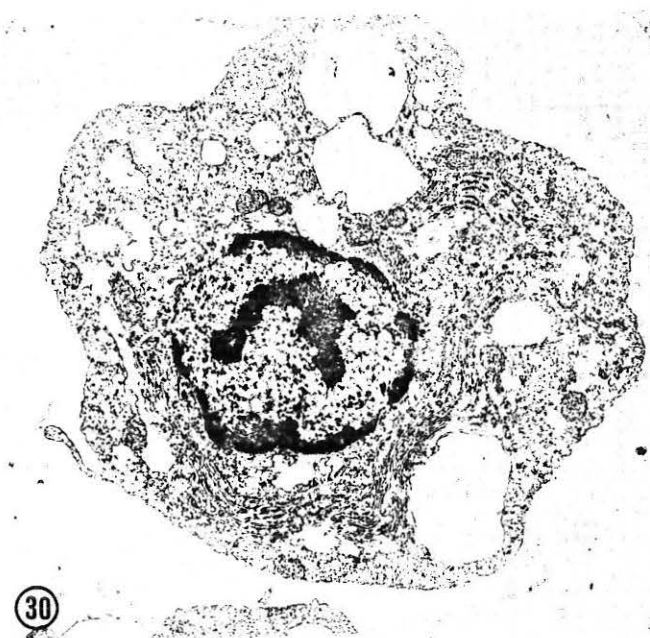
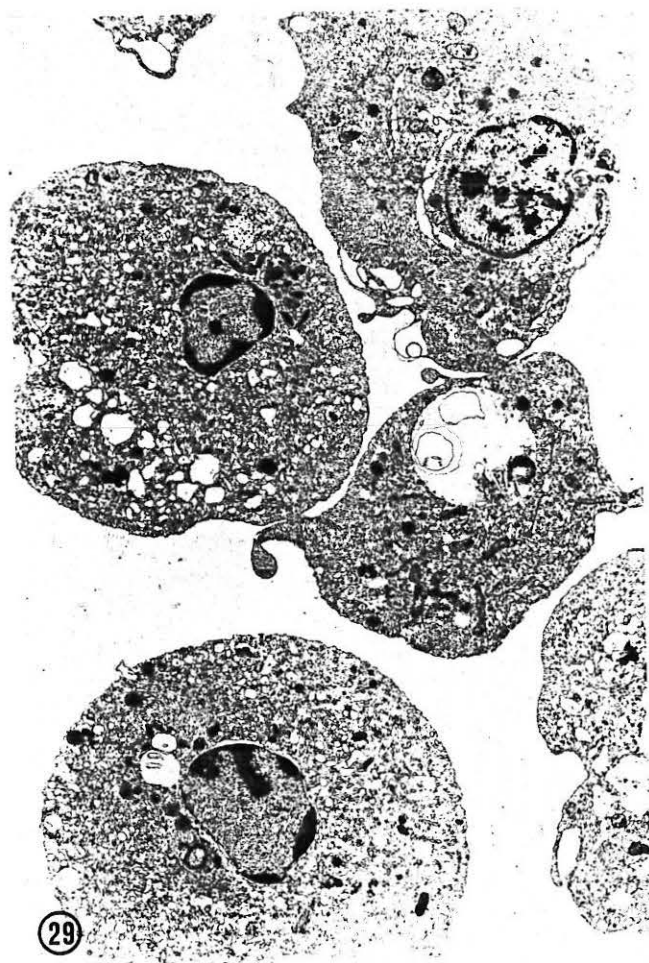
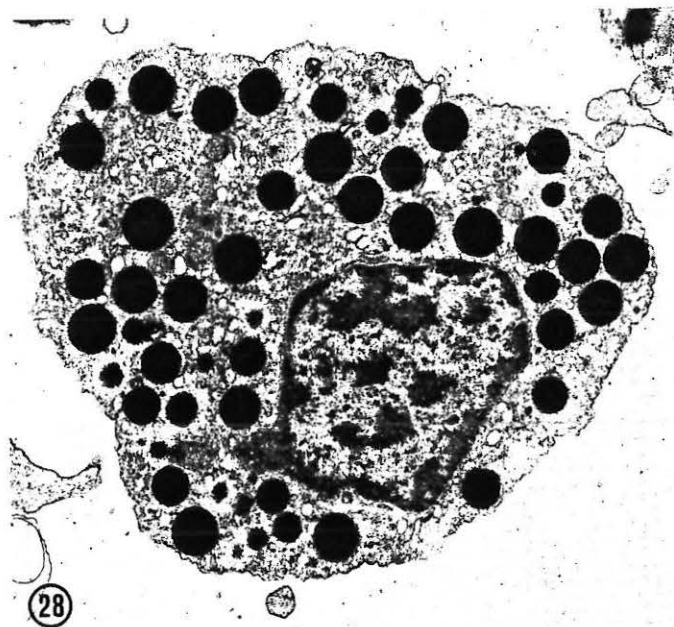
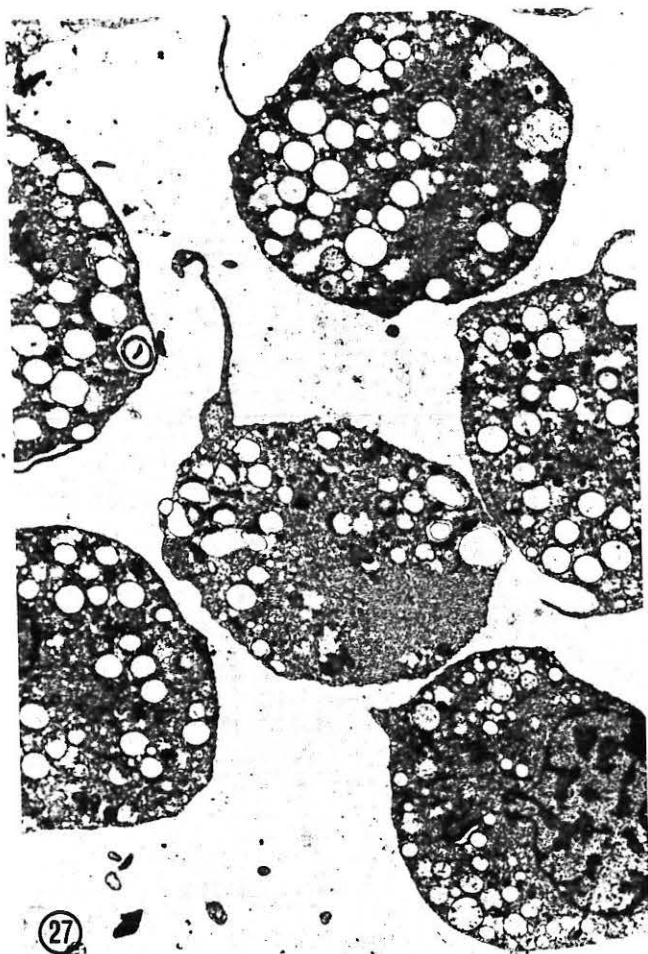
Hémocyte de la fraction
F4 éluutriée
M.électronique X 10500

Figure 29 :

Hémocytes de la fraction F6
caractéristiques des fractions
élutriées F5, F6, F7.
Ils correspondent aux hémocytes
de type II
M.électronique X 3700

Figure 31 :

Hémocytes de la fraction
F1 présentant l'aspect
typique des hémocytes
de type III
M.électronique X 4500



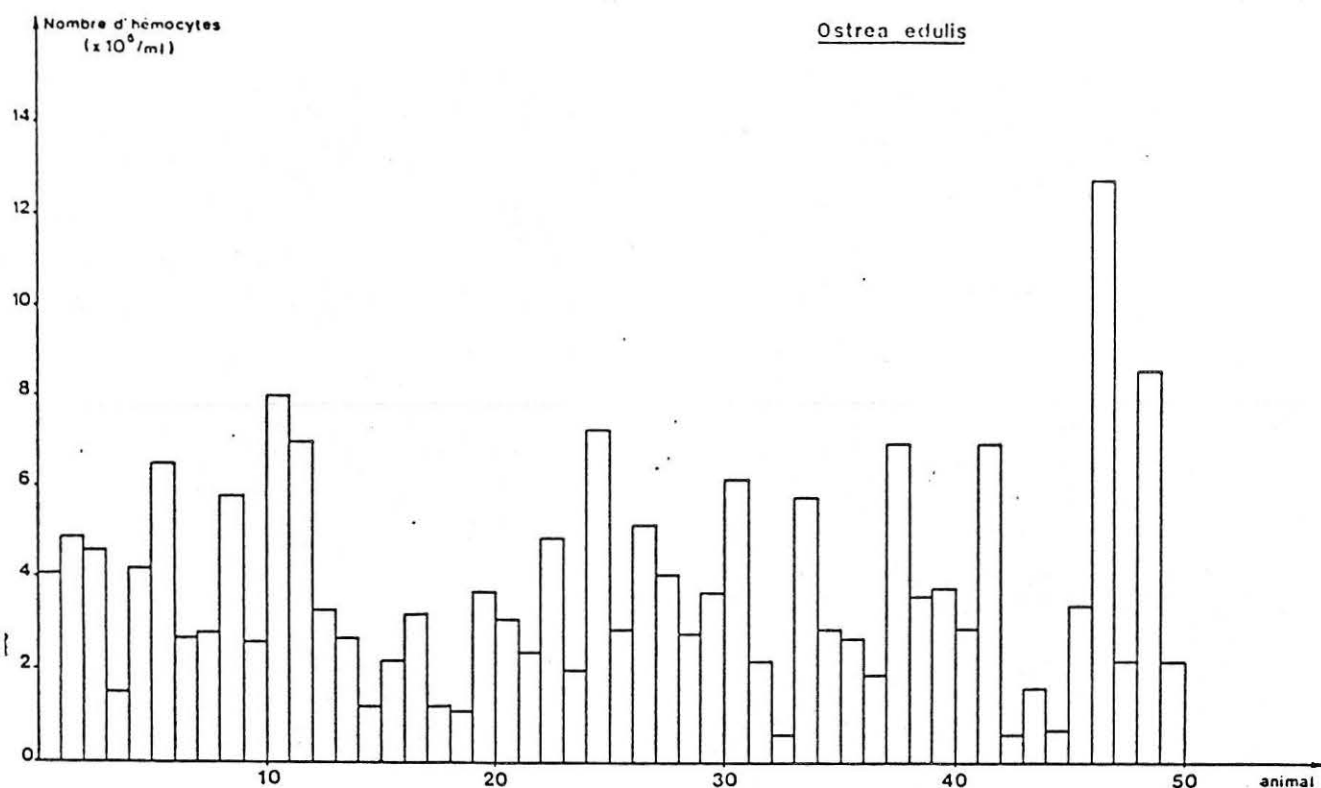


Figure 32 : Estimation du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymph pour 50 huîtres O. edulis

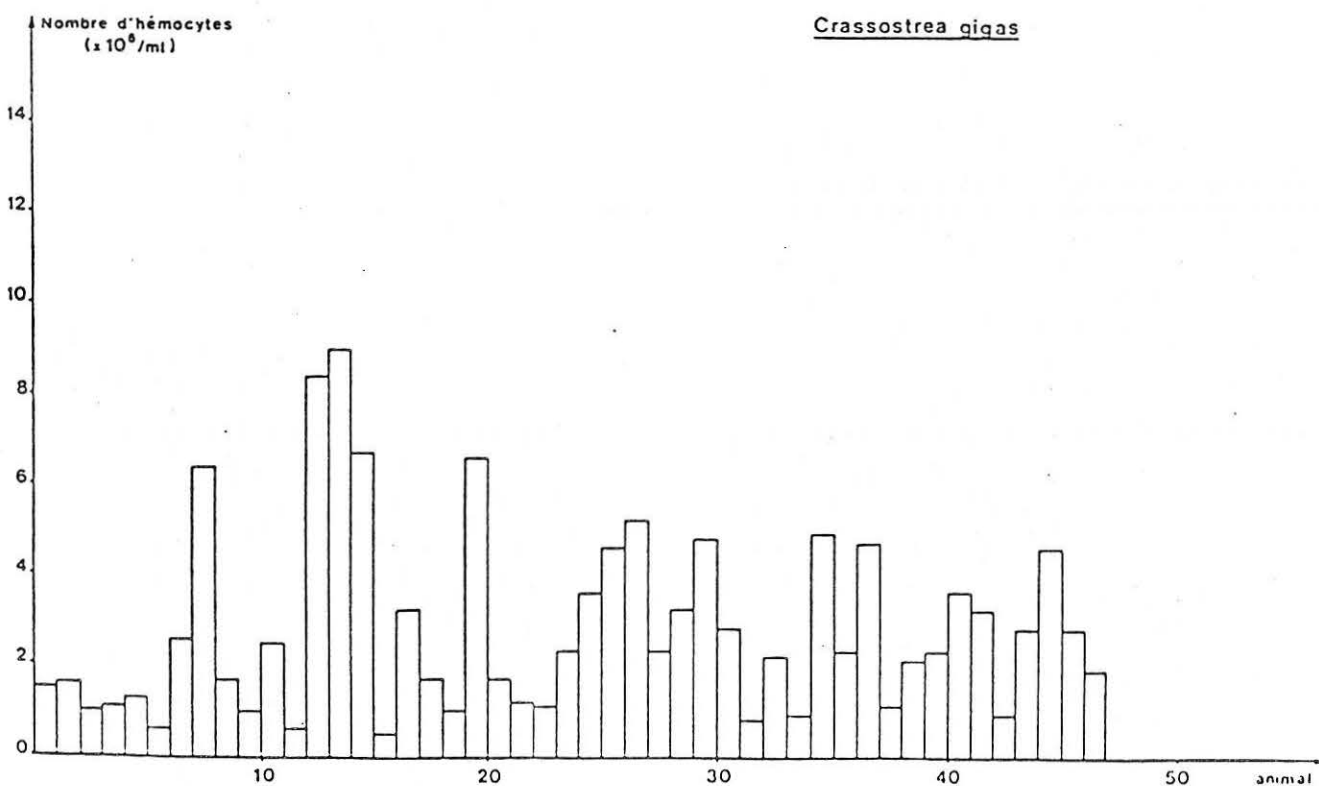


Figure 33 : Estimation du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymph pour 50 huîtres C. gigas

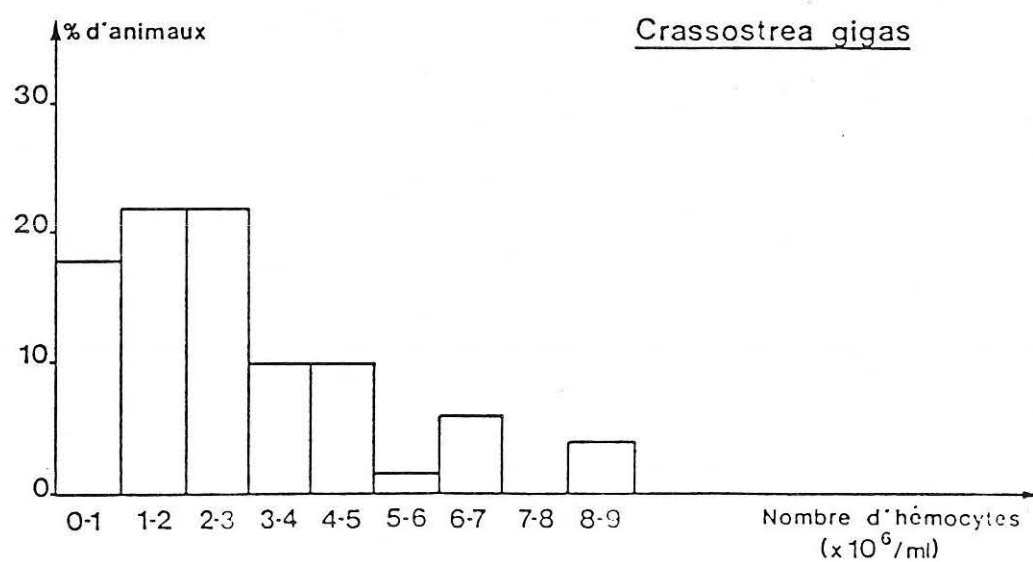
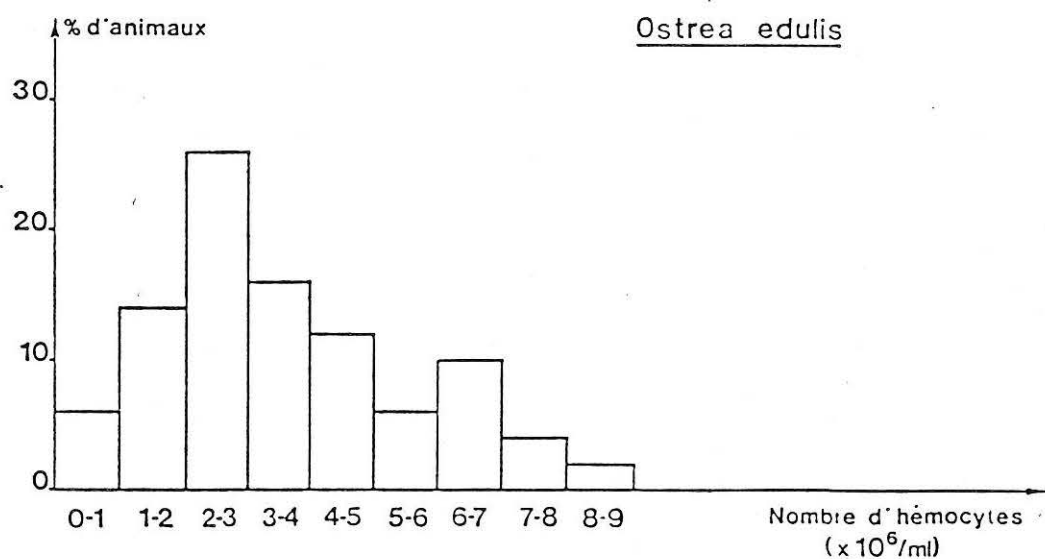


Figure 34 : Répartition en pourcentage des animaux en fonction de leur nombre d'hémocytes par ml

Une comparaison entre les deux modes de préparations hématocytaires : frottis humide ou empreinte de cœur, afin d'évaluer leur représentativité relative conduit à des pourcentages identiques. La technique des appositions de cœur est alors préférée en raison des meilleurs résultats morphologiques observés.

L'évaluation des pourcentages des trois types hématocytaires définis précédemment pour 50 individus exempts de bonamiose de l'espèce O.edulis provenant de Quiberon, 50 individus de même espèce provenant de Méditerranée, 30 individus parasités provenant de Quiberon et 50 individus de l'espèce C.gigas est présentée respectivement dans les figures 35, 36, 37 et 38.

Là encore, les "formules sanguines" montrent une grande variabilité individuelle. Cependant, les résultats obtenus permettent de mettre en évidence que contrairement aux données de la littérature (CHENG, 1981) les granulocytes ne sont pas majoritaires quelle que soit l'espèce considérée. Chez C.gigas, la moyenne se situe à 16.1 % (± 1.9). Chez O.edulis, elle est de 22.4 % (± 1.7) pour les huîtres provenant de l'étang de Thau, et de 15.2 % (± 1.8) pour celles originaires de la baie de Quiberon. La population des grands hyalinocytes représente 58.8 % (± 2.3) des cellules sanguines chez C.gigas, contre 32.1 % (± 1.2) chez O.edulis de Méditerranée, et 25.0 % (± 2.0) chez O.edulis de Quiberon. Enfin, le pourcentage moyen de petits hyalinocytes est de 25.1 % (± 2.1) pour C.gigas, alors qu'il est respectivement de 45.4 (± 1.5) et 59.8 (± 2.7) pour les huîtres plates de Méditerranée et de Quiberon.

L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) effectuée à l'aide d'un logiciel STATGRAPHICS montre que les pourcentages moyens en types cellulaires sont significativement différents pour C.gigas, et O.edulis. Les pourcentages moyens de granulocytes, grands hyalinocytes et petits hyalinocytes chez O.edulis originaire de Quiberon et faiblement parasitée sont respectivement de 7.4 % (± 1.7), 20.3 % (± 2.5), 72.2 % (± 3.2). L'analyse de variance effectuée pour comparer ces résultats à ceux obtenus sur des huîtres saines de même espèce et de même provenance montre que les granulocytes sont significativement moins nombreux et les petits hyalinocytes significativement plus nombreux chez les animaux atteints de bonamiose.

4. Caractérisations enzymatiques

4.1. Phosphatase acide

La phosphatase acide catalyse en milieu acide l'hydrolyse de la cytidine 5'-monophosphate. Les produits libérés réagissent avec le nitrate de plomb pour donner des précipités de phosphate de plomb qui diffusent fortement les électrons.

Crassostrea gigas			Ostrea edulis Méditerranée			Ostrea edulis Quiberon			Ostrea edulis Quiberon P		
G	GH	PH	G	GH	PH	G	GH	PH	G	GH	PH
5	78	17	19	41	40	10	16	74	8	31	61
8	81	11	25	24	51	7	21	72	2	17	81
23	68	9	11	32	57	43	31	26	27	47	26
16	63	21	16	42	42	51	37	12	0	14	83
12	66	22	45	25	30	15	41	44	1	14	85
12	80	8	35	15	50	11	49	40	4	12	84
43	42	15	22	38	40	11	7	82	2	14	84
22	50	28	34	30	36	9	17	74	2	4	94
35	37	28	16	40	34	9	12	79	2	4	94
10	78	12	31	27	42	1	30	69	4	8	88
43	43	14	27	23	50	15	24	61	6	31	63
6	67	27	21	41	38	17	14	69	8	53	39
7	75	18	39	31	30	7	13	70	4	52	44
9	70	21	14	43	33	33	14	53	3	13	84
7	66	27	21	39	40	11	69	20	2	15	83
8	80	12	19	41	50	7	54	39	6	13	81
21	58	21	13	43	44	4	14	82	41	16	43
16	39	23	7	27	66	27	25	48	10	21	69
18	56	26	25	33	42	7	15	78	2	10	88
16	76	8	23	43	34	41	30	29	5	40	55
5	77	18	18	24	58	9	11	80	16	21	63
31	42	27	11	39	50	7	51	42	6	8	86
5	68	27	15	37	48	20	36	34	5	17	78
7	73	21	41	30	29	11	7	82	1	17	82
45	47	8	58	15	27	9	13	78	5	40	53
9	80	11	21	27	52	12	27	61	31	13	56
12	65	23	10	33	57	3	26	71	5	8	87
4	71	25	18	40	42	9	40	51	10	13	77
10	70	20	11	31	58	7	17	76	2	37	61
37	52	11	27	27	46	9	15	76	5	17	78
41	37	22	41	33	23	20	31	49	2	8	80
5	60	35	16	37	47	36	28	36			
10	51	39	21	33	46	7	17	76			
7	63	30	21	41	38	10	21	69			
27	49	24	27	30	43	13	47	40			
11	50	39	15	39	46	15	33	52			
7	54	39	19	37	44	7	12	71			
50	37	13	13	31	56	31	9	60			
3	76	21	25	29	44	40	17	43			
9	61	30	7	41	52	3	40	57			
8	77	15	18	18	64	7	21	72			
10	34	56	43	35	22	13	33	54			
20	52	28	50	12	38	19	27	54			
25	58	17	10	40	50	27	21	52			
51	41	18	8	23	69	3	41	56			
2	80	18	21	24	55	5	18	77			
9	39	52	27	17	56	7	7	86			
4	27	69	10	38	52	17	4	79			
3	23	74	15	27	58	3	12	85			
4	45	51									

Figure 35

Figure 36

Figure 37

Figure 38

Evaluation des pourcentages de granulocytes (G), grands hyalinocytes (GH) et petits hyalinocytes (PH)

Contrairement aux données existantes (CHENG et DOWNS, 1988 ; AUFFRET, 1985) établissant la présence d'une activité phosphatasique acide, détectée à l'aide d'autres substrats, (β -glycérophosphate de sodium, p-nitrophénylphosphate de sodium) dans tous les types hématocytaires et en particulier dans les granules des granulocytes chez C. gigas, nos résultats ne mettent en évidence aucune activité de ce type quelle que soit l'espèce.

4.2. Estérases non spécifiques

Cette famille d'enzymes hydrolyse le 2-thiolacétoxy-benzanilide. En présence de ferrocyanure de potassium et de sulfate de cuivre, il se forme aux sites d'activité du ferrocyanure de cuivre qui peut alors provoquer la polymérisation de la diaminobenzidine (DAB). Le polymère est dense aux électrons.

Une telle activité est détectée dans les grands et petits hyalinocytes des deux espèces. Le produit de la réaction apparaît localisé de manière diffuse dans le cytoplasme et, dans les grands hyalinocytes, il est associé aux petites vésicules claires aux électrons (fig.40, Pl.VIII). Aucune activité n'est mise en évidence dans les granulocytes.

4.3. Peroxydase

La peroxydase catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau par un donneur d'électrons, la DAB. La DAB oxydée forme un polymère que l'on peut visualiser en microscopie électronique.

Une activité peroxydasique peut être localisée, dans les hyalinocytes seulement, chez les deux espèces. Dans les grands hyalinocytes, elle se situe dans les vésicules claires aux électrons (fig.42, Pl.VIII) et le réticulum endoplasmique rugueux. Dans les petits hyalinocytes, seul le réticulum endoplasmique rugueux est réactif (fig.41, Pl.VIII). Les mitochondries de tous les types cellulaires sont également positives. Afin de déterminer la spécificité de la réaction, des contrôles sont réalisés. L'incubation dans un milieu sans DAB, puis sans H_2O_2 ne donne aucun produit de réaction. L'incubation dans un milieu contenant du 3-amino-1,2,4-triazole, inhibiteur de la catalase donne les mêmes résultats que le milieu original. L'addition de cyanure de potassium inhibe toute réaction, y compris dans les mitochondries.

Les réactions observées dans les témoins, ainsi que le pH de travail sont compatibles avec une activité de type peroxydase. Selon ESSNER (1973a), l'activité dans les mitochondries est due, soit à l'activité du cytochrome c, soit à son oxydation.

4.4. NADH oxydase

La NADH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde O_2^- qui produit spontanément de l'eau oxygénée H_2O_2 . En présence de peroxyde, les ions cerreux forment un précipité dense aux électrons.

PLANCHE VIII

Caractérisations enzymatiques

Figure 39 :

NAD(P)H oxydase

Petit hyalinocyte (O.edulis) - Coupe non contrastée

n = noyau

ps = pseudopode

Le précipité d'ions cerreux qui signale la présence de cette activité enzymatique est localisé le long d'une partie de la membrane plasmique (mp)

Micrographie électronique X 50000

Figure 40 :

Estérases non spécifiques

Grand hyalinocyte (C.gigas) - Coupe non contrastée

Le matériel dense granuleux du cytoplasme et de certaines vésicules claires aux électrons (ve) est de la DAB polymérisée aux sites d'activité estérases

Micrographie électronique X 54000

Figure 41 :

Péroxydase

Petit hyalinocyte (O.edulis) - Coupe non contrastée

La DAB oxydée aux sites d'activité peroxydasique se localise au réticulum endoplasmique rugueux (rer) et dans l'espace périnucléaire (ep).

Noter la positivité des mitochondries (mi)

Micrographie électronique X 20600

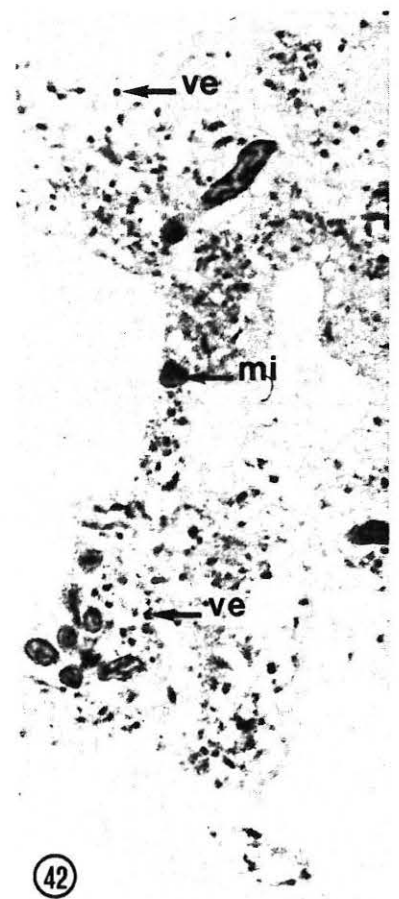
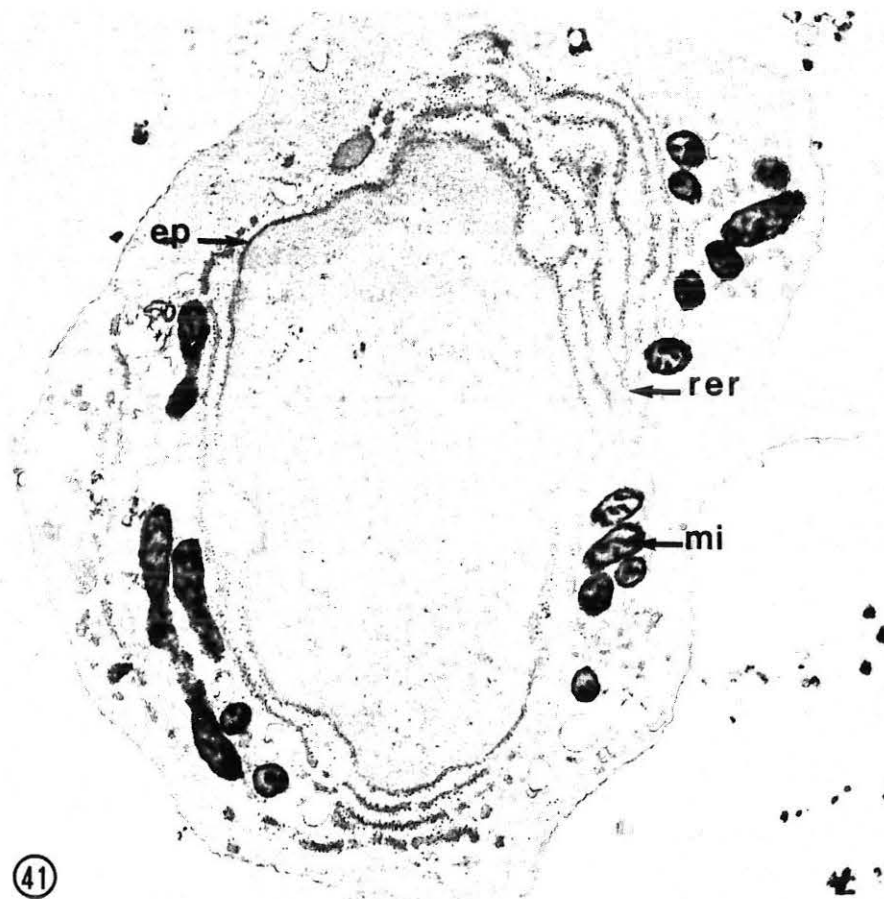
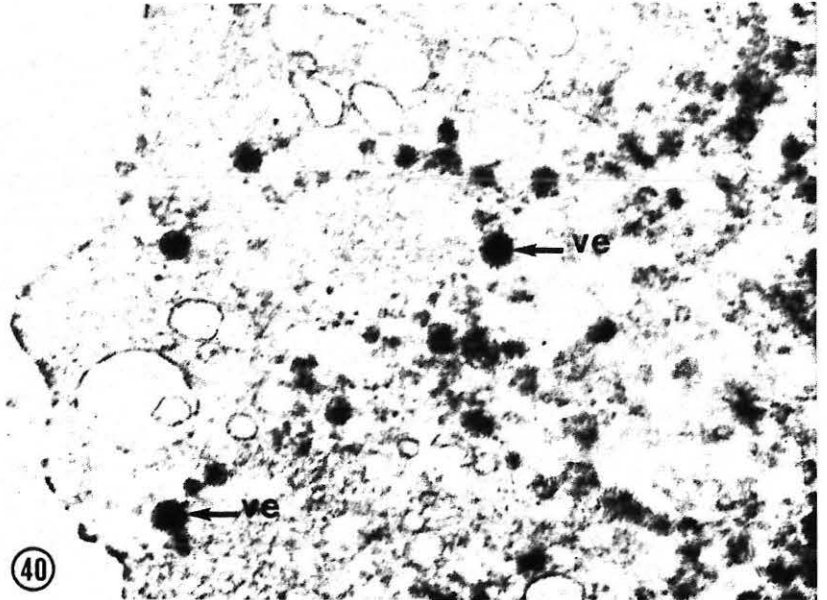
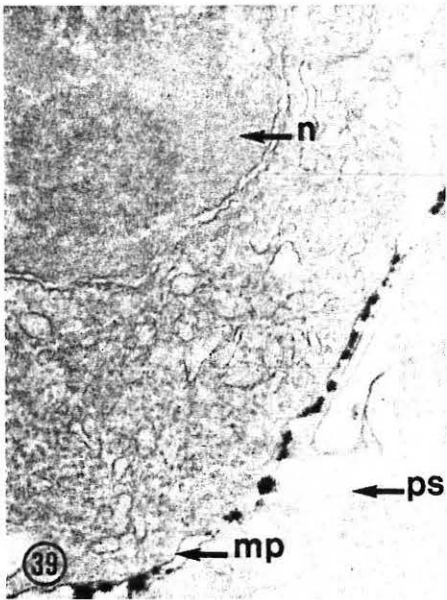
Figure 42 :

Peroxydase

Grand hyalinocyte (C.gigas) - Coupe non contrastée

Noter le produit de réaction dans les vésicules (ve) et dans les mitochondries (mi)

Micrographie électronique X 18000



Les hémocytes incubés dans un milieu contenant du α NADH et du chlorure de cérium montrent une réactivité qui se traduit par la présence de précipités discrets au niveau de la membrane plasmique, quelle que soit l'espèce et dans tous les types hémocytaires (fig.39, Pl.VIII). La réactivité ne disparaît pas lorsque le milieu d'incubation contient du cyanure de potassium.

5. Production de radicaux libres de l'oxygène

Les oxydants qui sont générés lors du processus phagocytaire réagissent avec certaines molécules des particules ingérées qui aboutissent à des intermédiaires riches en énergie, électriquement excités. Le retour à l'état de repos de ces intermédiaires provoque l'émission de lumière qui est à la base du phénomène de chimioluminescence native. Ce phénomène natif donne un signal assez bas, mais peut être amplifié par l'adjonction dans le système expérimental d'une molécule telle que le Luminol. Le nombre de coups par minute enregistré au compteur à scintillation est fonction de la concentration en phagocytes, de la concentration en stimulant, et de la concentration en Luminol.

La figure 43 présente les caractéristiques de la réponse des hémocytes stimulés par le zymosan en chimioluminescence par rapport à un témoin hémocytes non stimulés. Cette réponse est longue et dure plus de 4 heures. La hauteur maximum du pic dépend de la concentration en zymosan. Elle est aussi atteinte plus rapidement, lorsque le nombre de particules de zymosan par hémocyte augmente. Les courbes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7 correspondent à des rapports zymosan/hémocyte de 10/1, 20/1, 40/1, 60/1, 80/1, 120/1, 160/1. Les figures 44 et 45 montrent les résultats obtenus lorsqu'un nombre d'hémocytes fixé à 50 000 est stimulé par une concentration de zymosan de 80 particules par hémocyte chez trois individus d'espèce O.edulis et trois individus d'espèce C.gigas. La réponse apparaît variable selon l'individu et globalement plus élevée chez O.edulis que chez C.gigas.

5.1. Effet des inhibiteurs

5.1.1. Superoxyde dismutase (S.O.D.)

La S.O.D. catalyse la formation d' $H_2 O_2$ à pH neutre au détriment de l'ion superoxyde selon une réaction de dismutation :



Lorsque de la SOD exogène est ajoutée dans le milieu réactionnel, la réponse des hémocytes de C.gigas stimulés par le zymosan n'est pas modifiée, celle des hémocytes d'O.edulis montre une légère inhibition (fig.46).

5.1.2. Azide de sodium et cyanure de potassium

Ajoutés au moment du pic d'activité, ces inhibiteurs métaboliques, connus comme inhibiteurs de peroxydase font chuter très rapidement la réponse des hémocytes chez les deux espèces (fig.46).

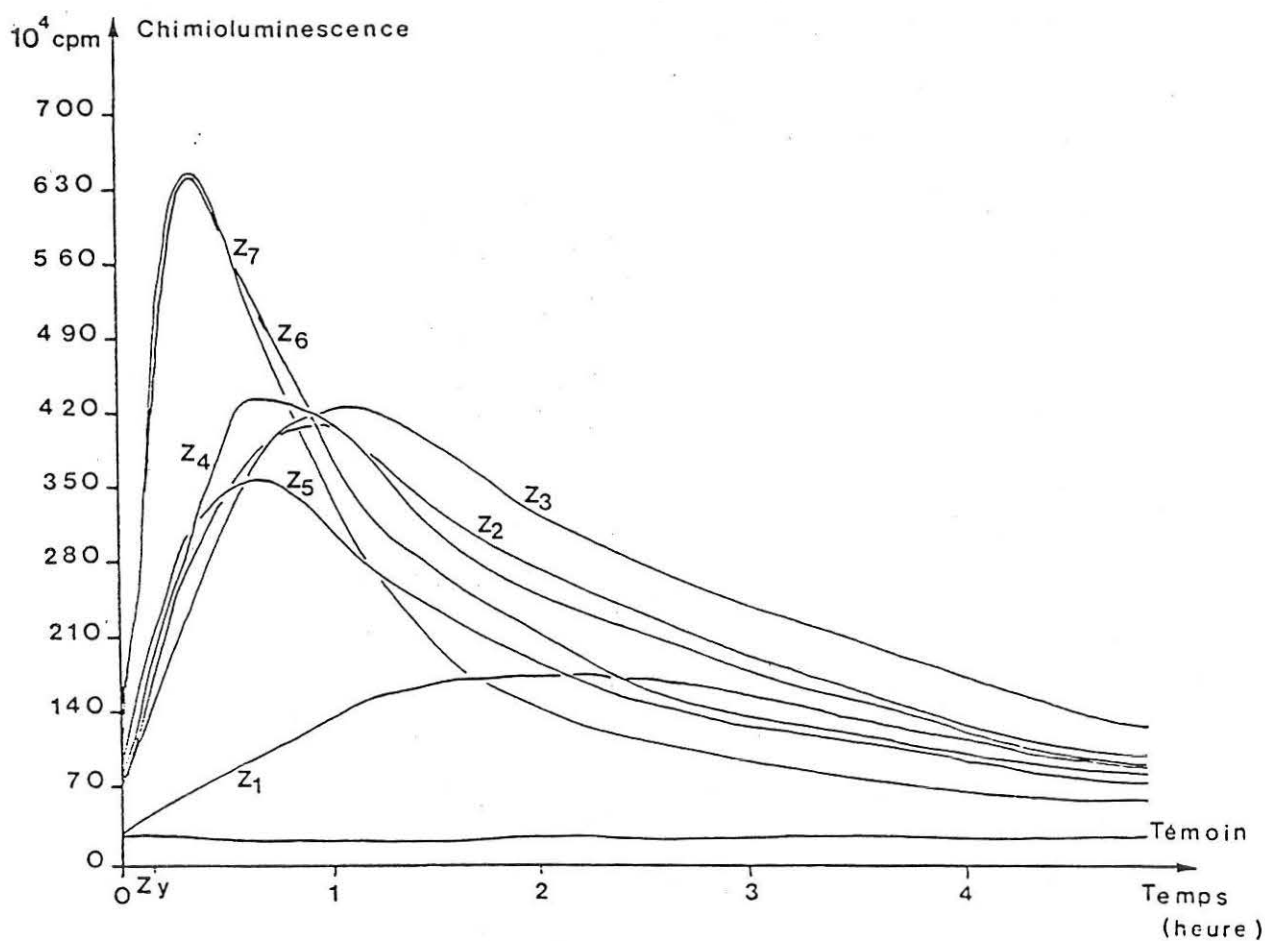


Figure 43 : Effet de différentes concentrations de zymosan sur la chimioluminescence des hémocytes d'*O. edulis* par le luminol
 Z : rapport particules de zymosan / hémocyte

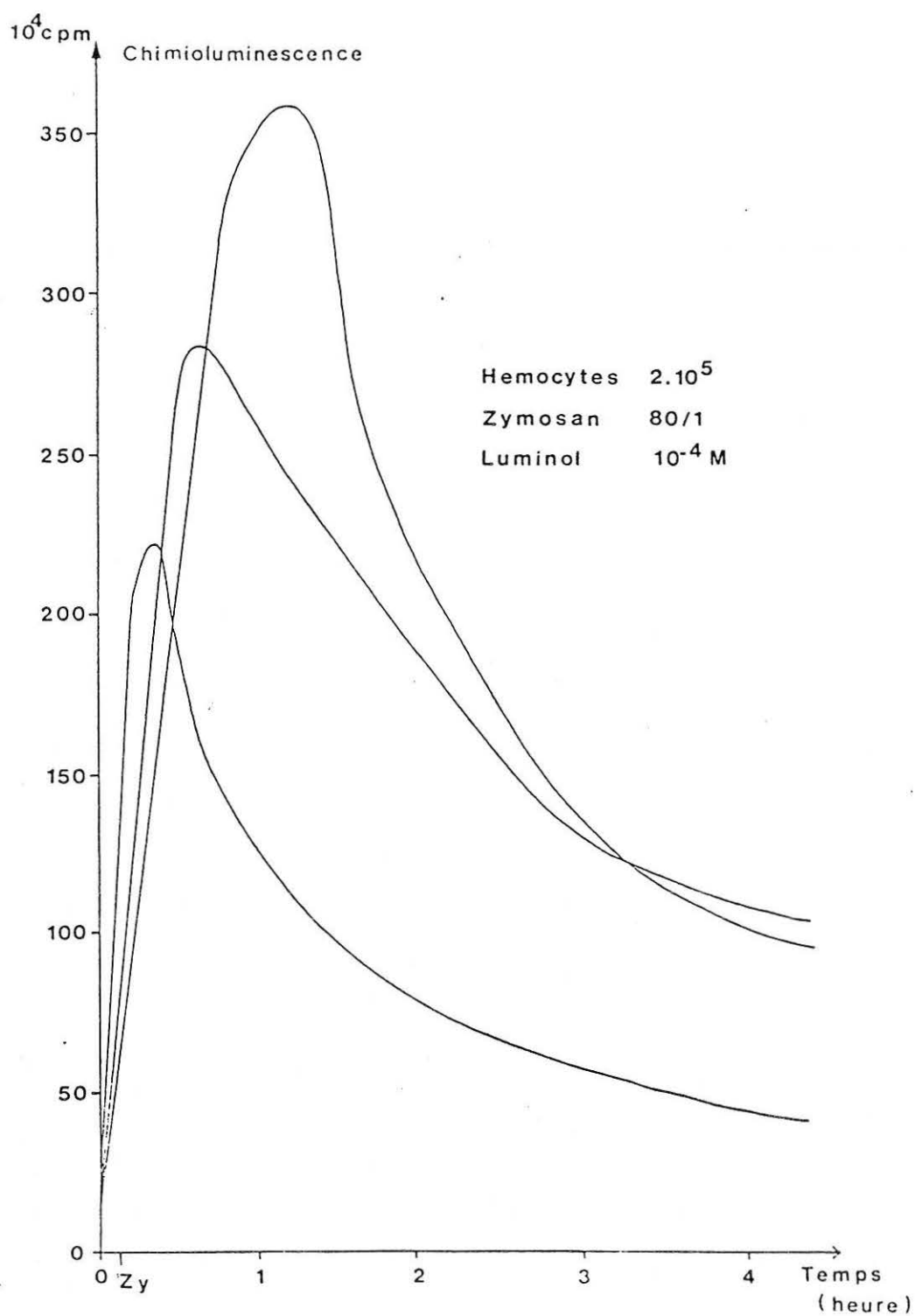


Figure 44 : Chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes d'*O. edulis* provenant de trois individus différents

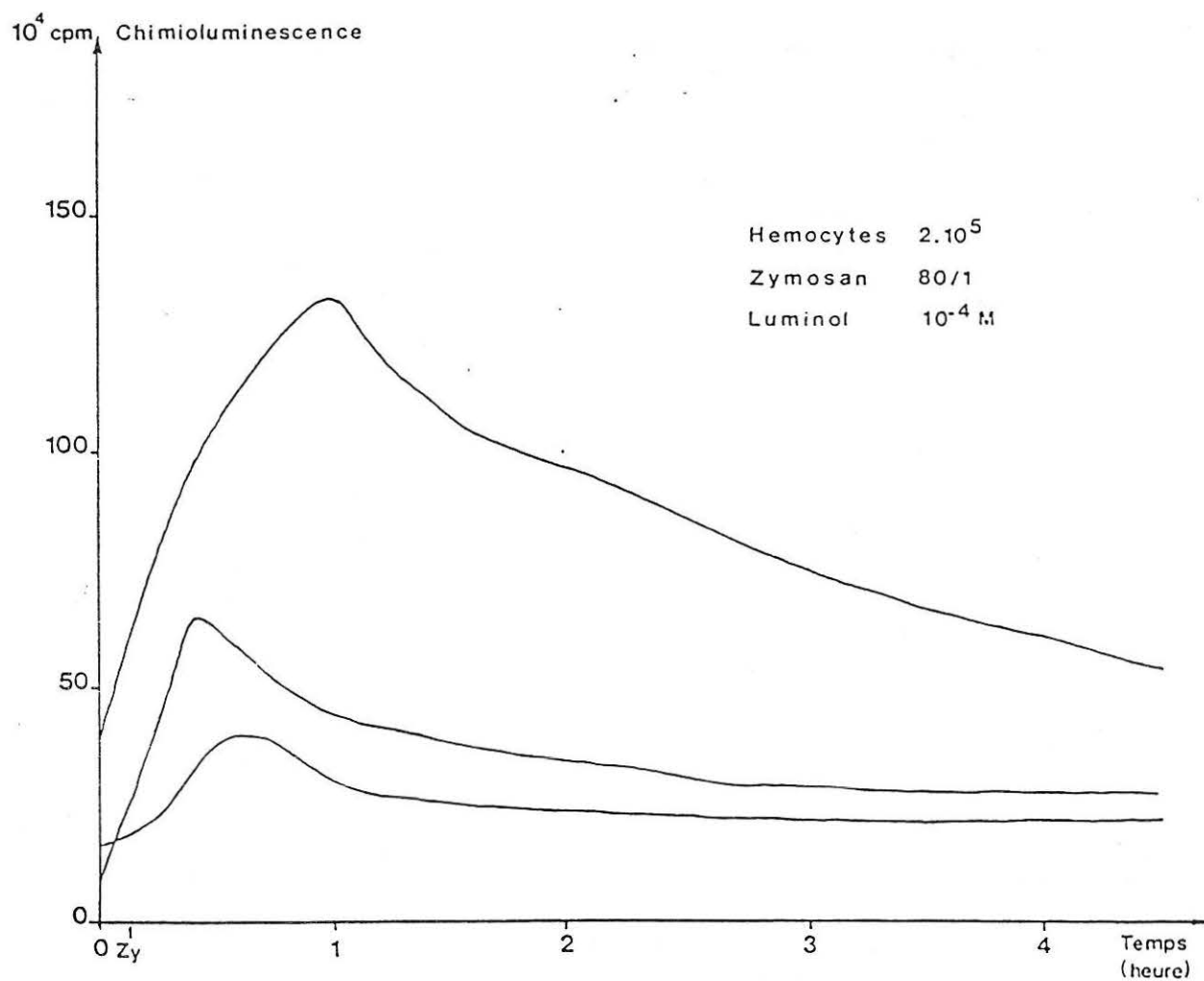


Figure 45 : Chimioluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes de C.gigas provenant de trois individus différents

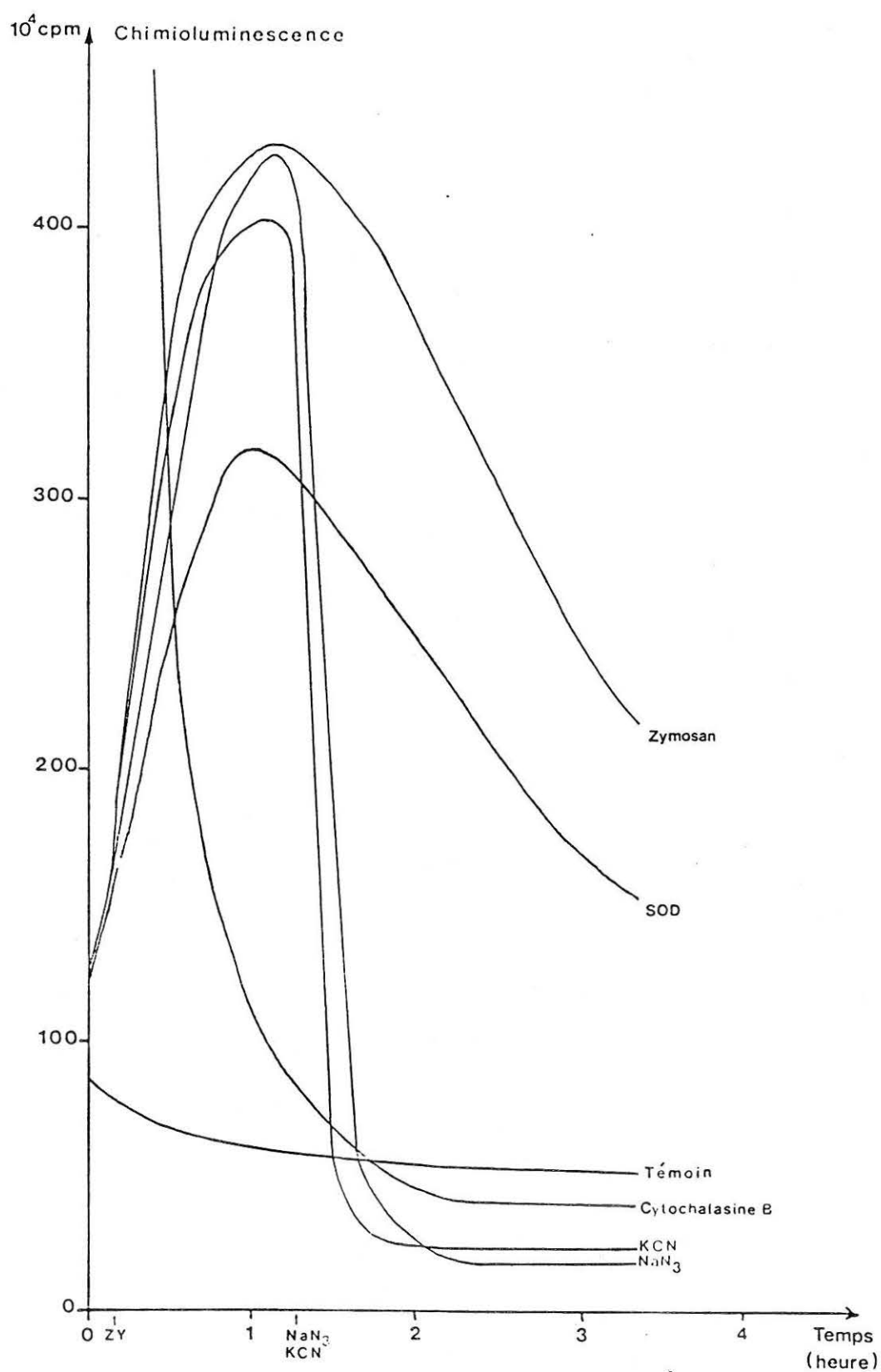


Figure 46 : Effets de différents inhibiteurs sur la chimioluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) des hémocytes d' O. edulis
 S O D : superoxyde dismutase
 KCN : cyanure de potassium
 NaN₃ : azide de sodium

5.1.3. Cytochalasine B

La cytochalasine B empêche la fermeture des vacuoles de phagocytose et provoque le relarguage extracellulaire des enzymes lysosomiales, en particulier celui de la peroxydase. Les phénomènes membranaires ne sont pas inhibés, et du peroxyde d'hydrogène, substrat de la peroxydase est aussi présent extracellulairement, ce qui explique le flash précoce de chimioluminescence suivi d'une chute brutale puisque le zymosan n'est pas internalisé (fig.46).

5.2. Hémocytes séparés

La réponse obtenue par stimulation d'une population homogène de granulocytes avec le zymosan apparaît au niveau du bruit de fond observé sans stimulation. Au contraire, la population des hyalinocytes donne une réponse élevée (fig.47). Le Percoll n'interfère pas avec l'activité des hémocytes (fig.48).

6. DISCUSSION

Trois principaux types cellulaires, granulocytes, grands hyalinocytes, petits hyalinocytes peuvent être définis sur la base des données morphologiques obtenues en microscopie photonique et électronique. L'existence de sous-types de granulocytes chez C.gigas pourrait être interprétée comme des variations fonctionnelles d'un type unique, dans la mesure où les granules clairs et denses aux électrons qui servent à les définir sont parfois observés dans la même cellule.

L'analyse ultrastructurale des fractions obtenues par l'élutriation-centrifugation de la population des hyalinocytes conduit à envisager qu'elle constitue une série évolutive. Cette hypothèse est renforcée par la localisation subcellulaire de l'activité peroxydasique : observée dans le réticulum endoplasmique rugueux des deux types hyalinocytaires chez O.edulis et C.gigas, elle est également détectée dans les vésicules claires aux électrons des grands hyalinocytes, qui pourraient ainsi avoir valeur d'organites de stockage et de lysosomes primaires : le grand hyalinocyte serait alors la forme plus mature du petit hyalinocyte. Ces résultats s'intègrent dans le schéma général proposé par CHENG (1981) pour la classification des hémocytes des Mollusques bivalves et qui distingue deux catégories : les cellules granuleuses et les cellules non granuleuses, les types multiples observés représentant des stades de maturation ou des stades fonctionnels de ces deux classes principales.

L'analyse des hémogrammes, tant en ce qui concerne le nombre des hémocytes circulants que leur répartition fait apparaître une grande variabilité et rend difficile l'établissement d'une norme bien définie comme chez les Vertébrés.

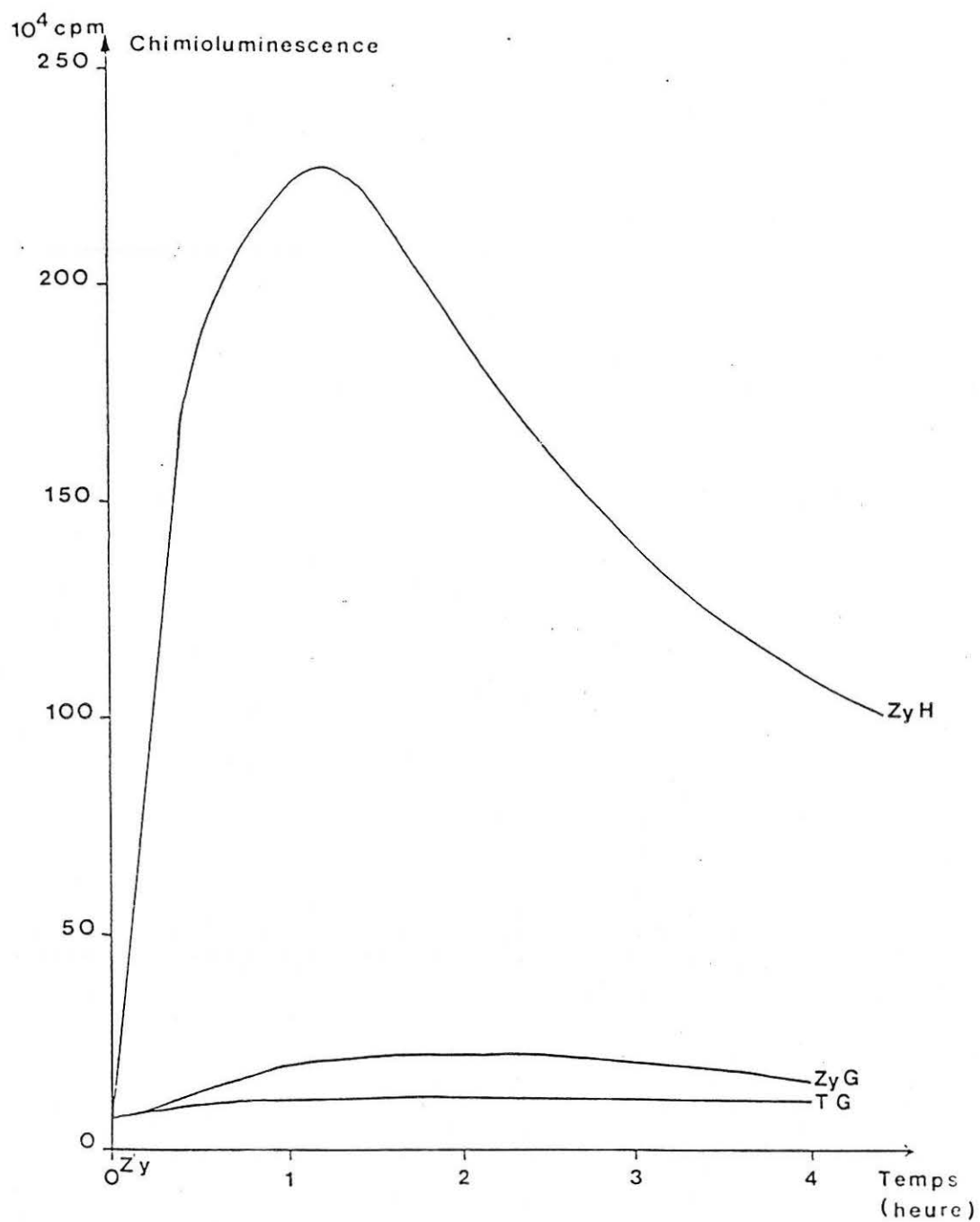


Figure 47 : Chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) des hémocytes séparés sur Percoll d'*O. edulis*
 ZyH : hyalinocytes
 ZyG : granulocytes

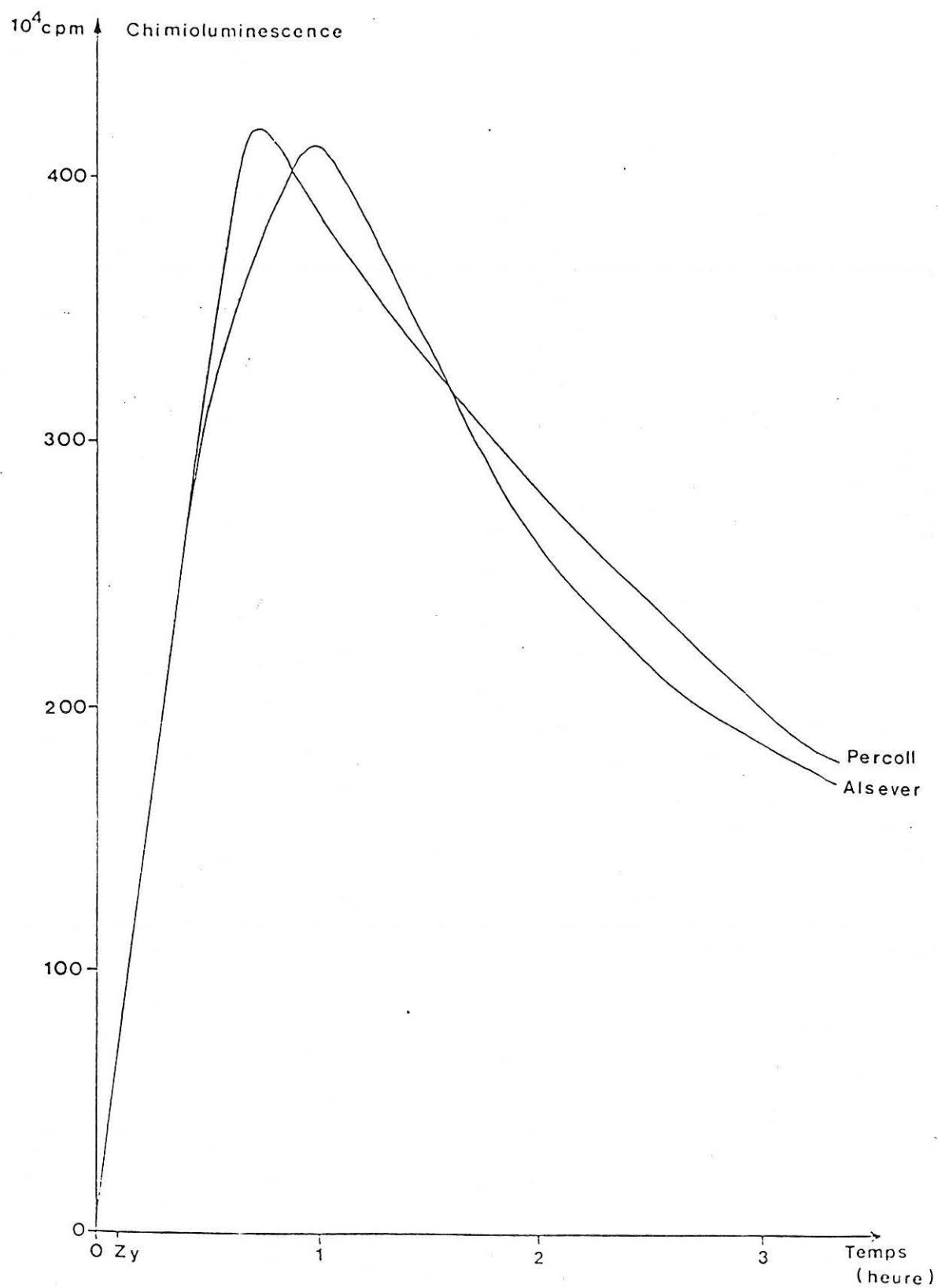


Figure 48 : Chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes maintenus dans le Percoll ou dans la solution modifiée d'Alsever

Les numérations hématocytaires sont globalement très élevées (de 1 à 5 x 10⁶ cellules/ml) par rapport à celles de ces derniers (4000 à 10000 leucocytes/ml) et ne font pas apparaître de différence entre les deux espèces considérées.

Malgré la variabilité observée au niveau des pourcentages en types cellulaires, les granulocytes ne sont pas majoritaires contrairement aux données établies chez C.virginica, espèce pour laquelle CHENG (1981) rapporte 87 % de granulocytes. Les populations les plus représentées sont respectivement les grands hyalinocytes chez C.gigas et les petits hyalinocytes chez O.edulis. La faible proportion de granulocytes chez C.gigas est d'ailleurs confirmée par les dénombrements cellulaires effectués sur les fractions hématocytaires séparées. Cette différence d'observation peut s'expliquer soit parce qu'il s'agit d'espèces différentes, soit plus probablement parce qu'aucune étude de la répartition des types hématocytaires n'avait été réalisée sur un grand nombre d'échantillons.

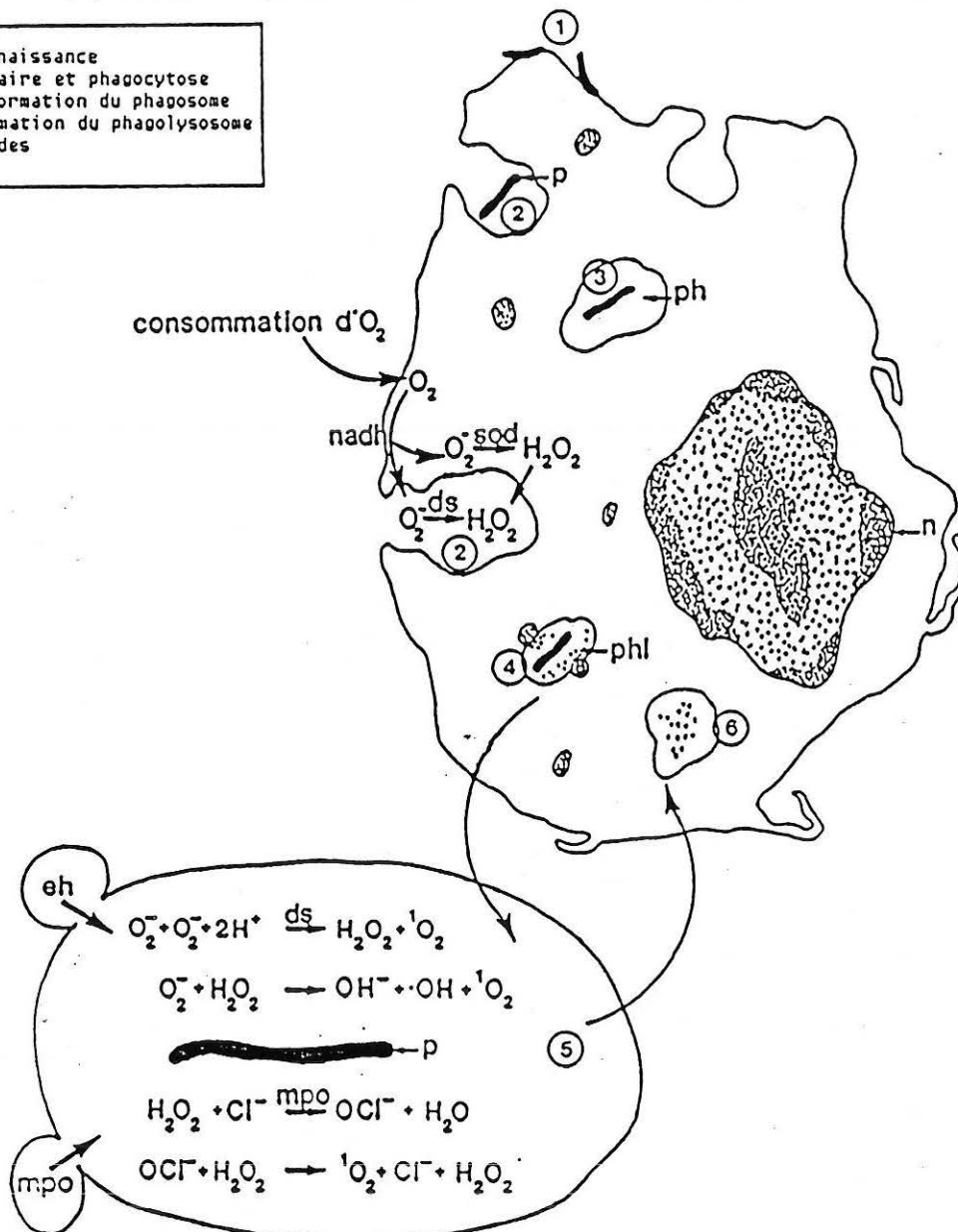
La valeur des évaluations des numérations et des "formules sanguines" chez les Mollusques a été discutée (AUFFRET, 1985) dans le sens où elles ne représentaient que le "pool circulant" de cellules sanguines, et ne tenaient pas compte des cellules associées aux tissus. Cette réserve pourrait aussi bien s'appliquer aux Vertébrés où de telles estimations sont pourtant utilisées en routine à des fins de diagnostic. Les problèmes se situent plutôt au niveau de l'interprétation qui peut être faite de ces éléments dans des espèces où ne sont connues ni la fonction, ni l'hématopoïèse, ni les modifications pathologiques associées aux maladies. Une étude de l'évolution des hématocytes au cours de l'infection expérimentale d'O.edulis par B.ostreae est actuellement en cours au laboratoire. D'autre part, la mise au point d'une technique de séparation de cellules viables permet d'envisager des études fonctionnelles type par type.

Les activités enzymatiques mises en évidence dans les hématocytes des deux espèces sont un autre élément précisant la fonction de ceux-ci.

La phagocytose, chez les Vertébrés donne lieu à des phénomènes membranaires et intracellulaires décrits dans la figure 50.

La reconnaissance d'une particule étrangère peut provoquer une stimulation du métabolisme oxydatif connu comme "Respiratory Burst" ou activation métabolique respiratoire (BADWEY et KARNOSKY, 1980). Le métabolisme du glucose est augmenté par la voie du shunt des hexoses monophosphates, ce qui conduit à la génération de NADPH qui active une NADPH oxydase membranaire. La consommation d'oxygène est augmentée et la NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en ion superoxyde, servant d'intermédiaire dans des réactions d'oxydo-réduction qui produisent de l'eau oxygénée et des oxydants énergiques tels que le radical hydroxyle .OH et l'oxygène singulet O₂.

- ① Attachement et reconnaissance
- ② Invagination membranaire et phagocytose
- ③ Internalisation et formation du phagosome
- ④ Dégranulation et formation du phagolysosome
- ⑤ Evénements bactéricides
- ⑥ Digestion



légende

ly : lysosome
 n : noyau
 p : particule
 ph : phagosome
 phl : phagolysosome
 ds : dismutation spontanée

enzymes impliquées

eh : enzymes hydrolytiques
 mpo : myéloperoxydase
 nad(p)h : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
 sod : superoxyde dismutase

molécule cytotoxique : H_2O_2

radicaux libres toxiques de l'oxygène : O_2^- , 1O_2 , $\cdot OH$, OCl^-

Figure 50 : Activation métabolique respiratoire accompagnant la phagocytose

Ces oxydants sont potentiellement cytocides (LOCKSLEY et KLEBANOFF, 1983) et se retrouvent dans le phagosome. Les lysosomes fusionnent alors avec le phagosome. La présence dans les lysosomes de la myéloperoxydase, jointe à celle d'H₂O₂ et d'ions Cl⁻ donne lieu à des phénomènes cytocides puissants. D'autre part, les hydrolases lysosomiales entraînent la digestion du matériel phagocyté. Parmi ces dernières, les estérases phagocytes mononucléaires (VAN FURTH, 1986).

Les petits et grands hyalinocytes des deux espèces étudiées possèdent des estérases non spécifiques. La détection histochimique d'une activité peroxydasique, jointe à celle d'une NADPH membranaire pouvait laisser supposer l'existence de mécanismes de cytotoxicité oxygène dépendants. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence en chimioluminescence d'un métabolisme de type "Respiratory Burst". Les conditions expérimentales, (stimulant particulaire, Luminol comme amplificateur), et les réponses aux inhibiteurs renforcent l'implication de la peroxydase dans le phénomène (ALLEN, 1986 ; DE CHATELET et al., 1982). Les hyalinocytes peuvent ainsi être assimilés à des "macrophages" d'Invertébrés. La production de radicaux libres de l'oxygène n'avait jusqu'ici été démontrée que chez les gastéropodes (DIKKEBOOM et al., 1988) et chez le bivalve Patinopecten yessoensis (NAKAMURA, 1985).

Les résultats obtenus sur les granulocytes posent le problème de leur fonction par rapport à la bibliographie existante, mais aussi dans l'absolu.

L'absence d'activité phosphatase acide confirme les données établies pour les granulocytes de Ruditapes decussatus (HENRY, 1987), mais contredit celles présentées par d'autres auteurs pour C. virginica (CHENG et DOWNS, 1988), C. gigas et O. edulis (AUFFRET, 1985). L'utilisation du substrat cytidine 5'-monophosphate au lieu du β -glycérophosphate de sodium pourrait expliquer la différence des résultats obtenus comme l'a noté ESSNER (1973b). Cependant, des recherches complémentaires devront être effectuées car la nature lysosomiale des granules ne peut pas être établie sur le seul critère de positivité de la phosphatase acide. Les autres activités enzymatiques lysosomiales étudiées, estérases et peroxydases ne sont pas présentes dans les granulocytes alors qu'elles le sont dans les hyalinocytes. D'autre part, les granulocytes ne semblent pas intervenir dans l'activation métabolique respiratoire, malgré la présence membranaire de NADPH oxydase.

Les granulocytes à grains denses et clairs aux électrons de C. gigas ont une morphologie qui pourrait rappeler celle des granulocytes basophiles des Vertébrés, cellules à grosses granulations sphériques denses aux électrons, devenant claires après dégranulation et libération extracellulaire de médiateurs.

A part des différences dans la répartition des types cellulaires, aucune différence qualitative entre les hémocytes de C. gigas et ceux d'O. edulis ne peut être mise en évidence sur la base des fonctions étudiées.

II - RELATIONS BONAMIA OSTREAE - HEMOCYTES

1. ANALYSE DES CELLULES INFECTEES NATURELLEMENT

1.1. Microscopie photonique

L'examen de frottis de coeur d'O. edulis parasitées met en évidence la capacité de B. ostreae de se développer dans les trois types cellulaires définis comme granulocytes (fig.51, Pl.IX), grands hyalinocytes (fig.52, Pl.IX) et petits hyalinocytes (fig.53, Pl.IX). Dans certains cas, le parasite apparaît nettement auréolé d'un halo chromophile assimilable à une vacuole. Des parasites libres peuvent être observés, provenant de la lyse spontanée des hémocytes pathologiques ou de l'éclatement de ces cellules, fragilisées lors de la confection du frottis.

1.2. Microscopie électronique

Elle confirme les données précédentes quant aux types cellulaires parasités et met en évidence, même lorsque l'infection est faible, des effets cytopathiques drastiques (fig.54) en particulier au niveau du cytoplasme où il devient difficile d'identifier les structures. Le parasite semble généralement enclos dans une vacuole parasitophore, souvent intimement accolée à sa propre membrane plasmique (fig.55, Pl.X), et dans laquelle, il est capable de se diviser par scissiparité (fig.58, Pl.X). Des formes binucléées, de signification incertaine dans le cycle de développement sont aussi rencontrées (fig.57, Pl.X).

L'ultrastructure de B. ostreae a été décrite dans le détail par COMPS (1983). Le parasite apparaît généralement sous forme d'une cellule arrondie de 2 à 3 μ de diamètre (fig.56, Pl.X), mais peut présenter un certain polymorphisme (fig.55, Pl.X). Son noyau entouré d'une enveloppe nucléaire contient une chromatine finement granuleuse et répartie de façon homogène. Dans le cytoplasme, on note une forte densité de ribosomes libres, une ou deux grosses mitochondries à crêtes tubulaires et des organites particuliers limités par une membrane unitaire, les haplosporosomes. La présence de ces organites, de taille, de forme, et de densité aux électrons variables a conduit à apparenter le parasite aux protozoaires de la classe des Stellatospora (Phylum des Asctospora). La nature des haplosporosomes n'est pas connue avec précision, bien que leur soient attribués une origine Golgienne et un contenu en ADN (COMPS, 1983). Une observation mérite cependant d'être mentionnée : le parasite libère ces organites dans la vacuole parasitophore par un processus d'exocytose (fig.59 et 60, Pl.XI). Ce phénomène est décelé lors d'infections naturelles mais aussi lors d'infections expérimentales in vitro.

PLANCHE IX

Infections naturelles

Figure 51 :

Apposition de coeur
Granulocyte (G) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 52 :

Apposition de coeur
Grand hyalinocyte (Gh) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 53 :

Apposition de coeur
Petit hyalinocyte (Ph) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 54 :

Culot d'hémocytes d'Ostrea edulis
La cellule infectée contient quatre parasites (B.o).
Elle est considérablement dégradée, le noyau (n) de l'un
des parasites présente un nucléole (nu) excentré

mi = mitochondrie
h = haplosporosome
va = vacuole parasitophore

Micrographie électronique X 18750

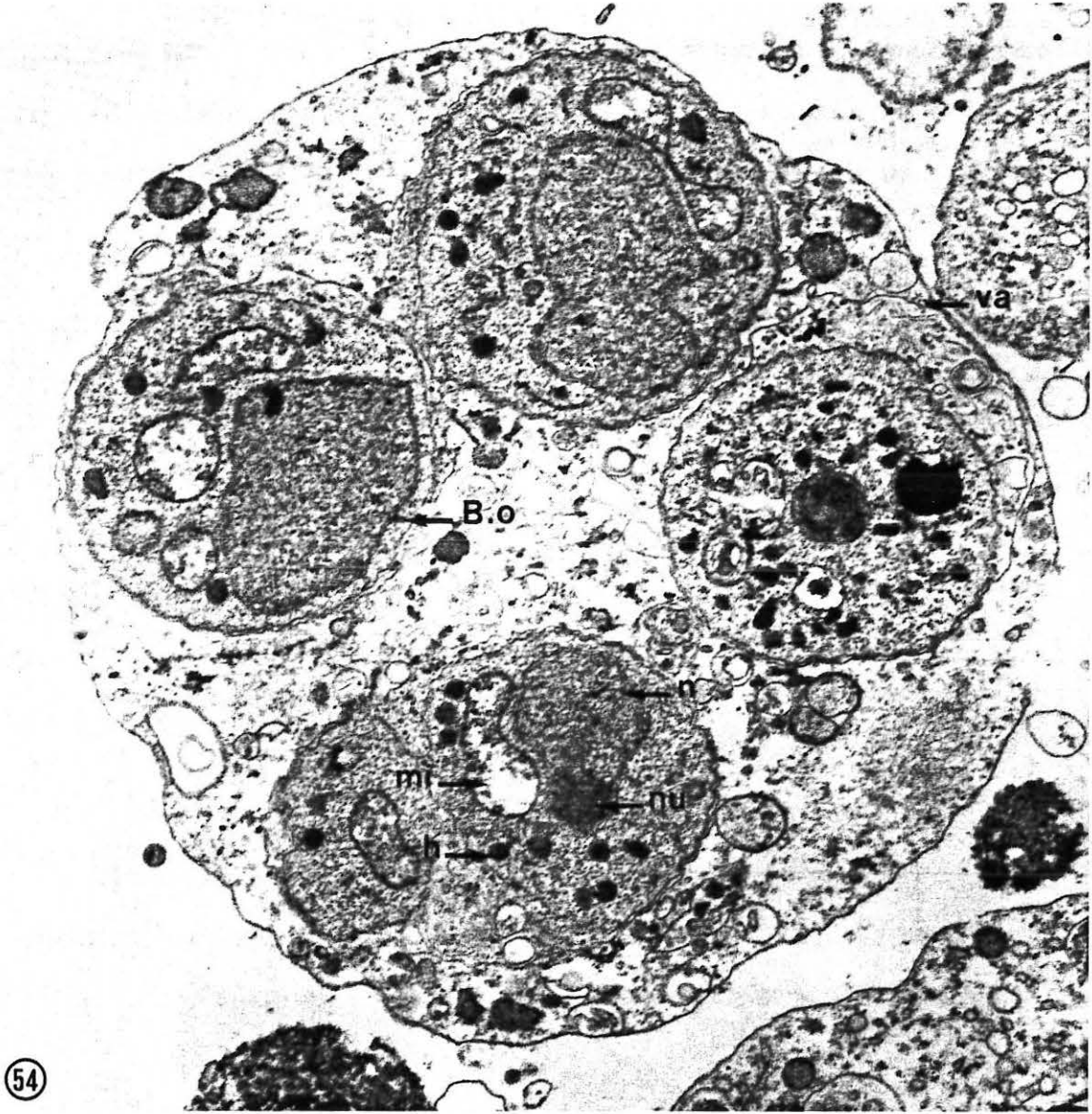
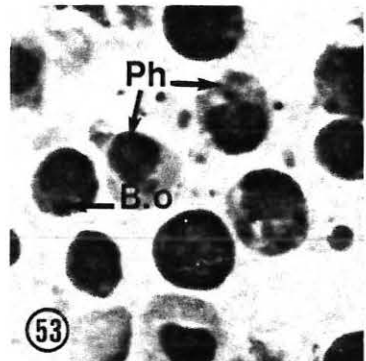
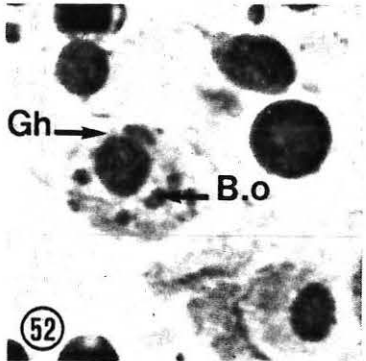
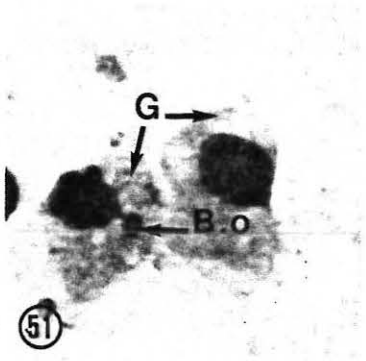


PLANCHE X

Ultrastructure de Bonamia ostreae dans les infections naturelles

Figure 55 :

Forme allongée à contours irréguliers

n = noyau
h = haplosporosome
mu = membrane unitaire
ri = ribosome
mi = mitochondrie
ct = crête tubulaire
va = vacuole parasitophore

M.électronique X 42500

Figure 56 :

Forme ronde de B.ostreae

en = enveloppe nucléaire

M.électronique X 30000

Figure 57 :

Forme binucléée (n)

M.électronique X 30000

Figure 58 :

Division binaire

M.électronique X 24000

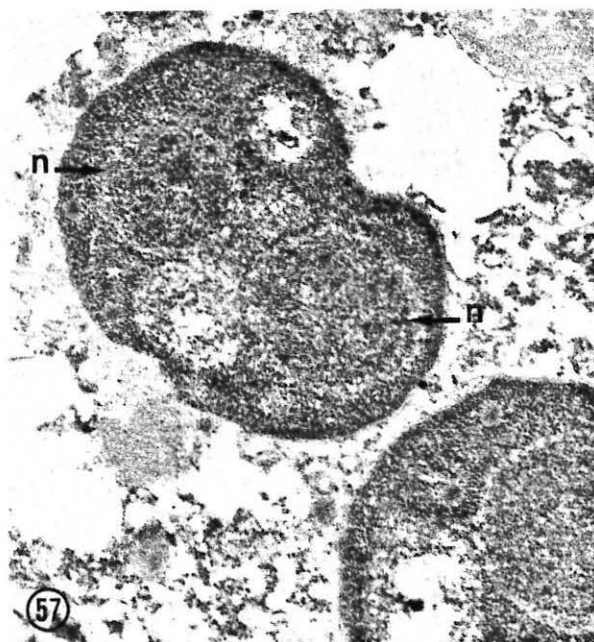
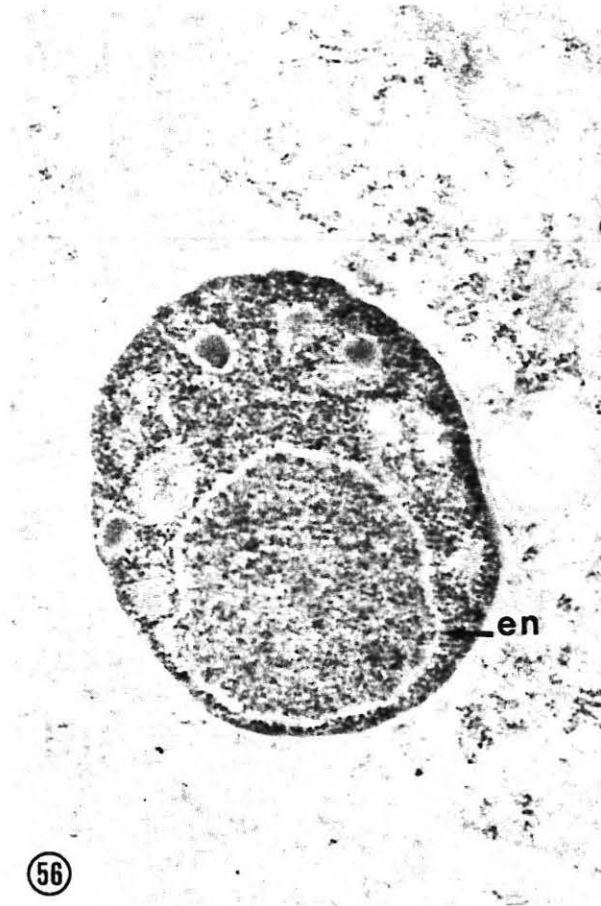
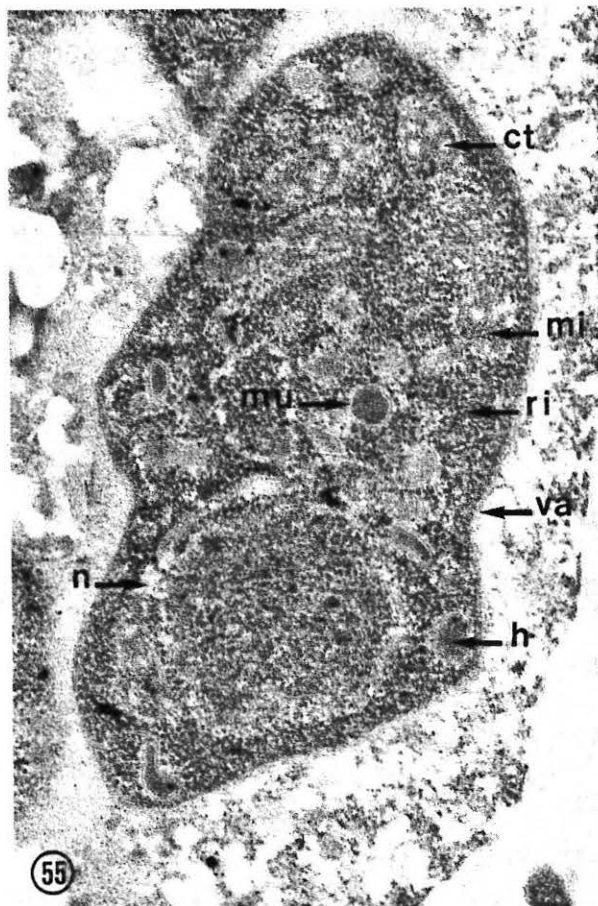


PLANCHE XI

Organites de Bonamia ostreae

Figure 59 et 60 :

Extrusion d'haplosporosomes dans la vacuole parasitophore

B.o = Bonamia ostreae

va = vacuole parasitophore

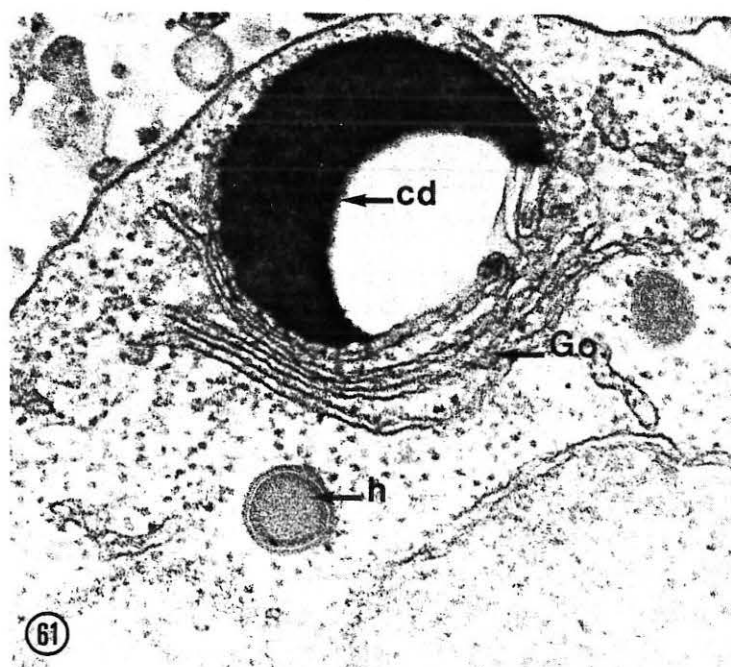
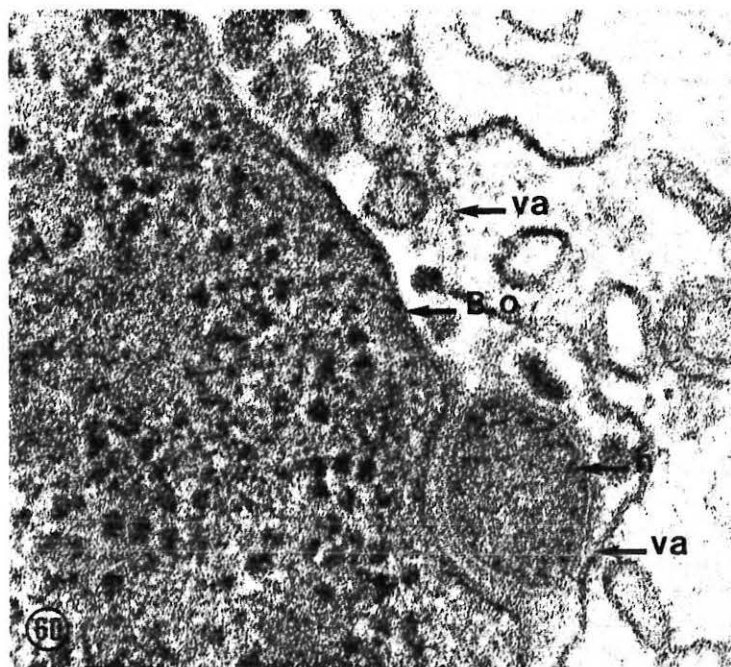
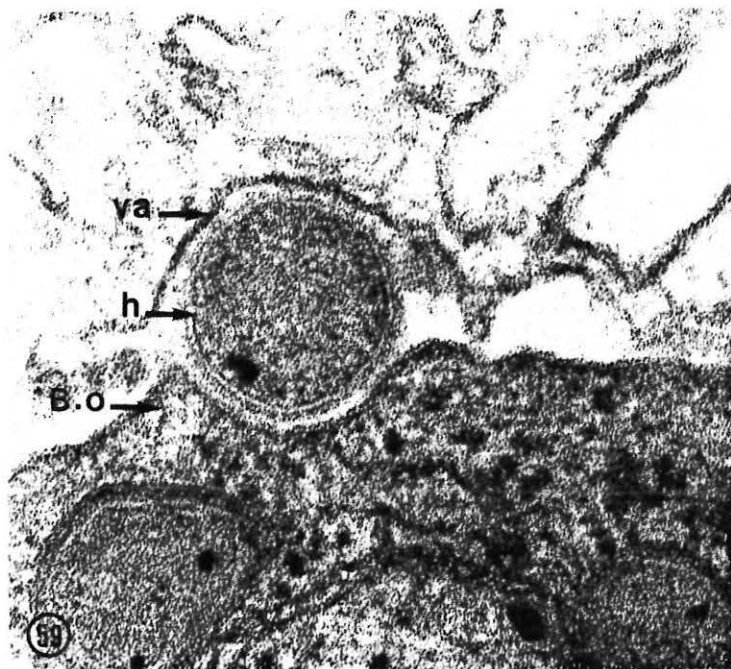
h = haplosporosome

Micrographies électroniques X 160000

Figure 61 :

Détail de structure du parasite montrant le corps dense (cd)
associé à des saccules de type Golgien (Go)

Micrographie électronique X 84000



Certaines cellules contiennent une grosse inclusion plus ou moins dense, parfois associée à des saccules de type Golgien (fig. 61, Pl.XI).

2. ETUDE DES INTERACTIONS IN VITRO

2.1. Mécanismes d'entrée

2.1.1. Description des cellules infectées

La mise en contact d'hémocytes d'O.edulis et de C.gigas avec B.ostreae in vitro aboutit à l'internalisation du parasite dans les deux espèces. Les trois types hémocytaires apparaissent réceptifs : les figures 62 et 63 présentent l'estimation des pourcentages de cellules parasitées, type par type, après une heure de contact. Les taux d'infection les plus élevés sont notés chez les granulocytes qui sont plus fréquemment parasités chez C.gigas que chez O.edulis (63.6 % / 45.7 %). Les taux d'infection les plus faibles sont rencontrés dans les petits hyalinocytes : 26.2 % chez C.gigas et 13.8 % chez O.edulis ; 27.1 % des grands hyalinocytes de C.gigas contiennent des parasites contre 31.9 % chez O.edulis.

L'examen en microscopie électronique de primocultures d'hémocytes fixés après 30 mn, 1h et 2h de contact avec B.ostreae confirme la localisation intracellulaire des parasites dans tous les types et chez les deux espèces. Les images observées, contact ponctuel avec la membrane hémocytaire (fig.64 et 65, Pl.XII), englobement progressif du parasite par des pseudopodes (fig.66 et 67, Pl.XIII), puis internalisation complète au sein d'une vacuole parasitophore (fig.68, Pl.XIII) suggèrent la phagocytose. Dans la plupart des cas, cette vacuole parasitophore persiste dans tous les types cellulaires après 4h de contact (fig.69, 70, Pl.XIV, fig.73, Pl.XV). Cependant, de rares observations dans les grands hyalinocytes (fig.71 et 72, Pl.XV) montrent le parasite libre dans le cytoplasme ; les cellules-hôtes apparaissent alors assez dégradées ce qui rend aléatoire l'interprétation.

Quelques images de B.ostreae dans les hémocytes de C.gigas évoquent la dégradation du parasite (fig.74, Pl.XV), mais ne sont pas systématiques.

2.1.2. Traitement des hémocytes par la cytochalasine B

La cytochalasine B empêche la polymérisation des molécules d'actine, et de ce fait inhibe la locomotion cellulaire et la phagocytose (STUART et al., 1985).

Les pourcentages de cellules parasitées sont évalués type par type sur des hémocytes préalablement traités à la cytochalasine B et comparés pour chaque animal à ceux obtenus sur des hémocytes témoins (fig.75). Le traitement des hémocytes provoque une baisse des taux d'infection qui passent en moyenne chez O.edulis de 33 % à 9 % dans les granulocytes, de 19 % à 5 % dans les grands hyalinocytes et de 13 % à 2 % dans les petits hyalinocytes, et parallèlement chez C.gigas de 75 % à 13 %, de 22 % à 16 % et de 30 % à 7 %.

Ostrea edulis Méditerranée		
G	GH	PH
55.50	26.90	26.15
27.30	9.40	5.60
23.10	34.80	2.40
38.90	23.80	22.50
32.70	0	0
30.80	9.80	17.40
100	13.04	11.80
18.70	19.04	11.50
20	16.90	19.40
37.50	28.60	15.80
0	26.50	4.70
20	65.90	30.20
54.20	43.50	8.80
51.30	41	4.55
57.10	43.80	29.51
54.50	45.60	33.33
25	46.30	17.10
70	39	17.20
0	43.10	17.70
39.10	37.50	6.70
28.60	50	1.90
31.20	19.20	17.30
73.30	46.10	6.80
54.50	47.70	2.22
36.40	20	4.20
33.30	9.60	13.90
80.80	36	12.50
53.80	22.40	10
54.20	8.20	13.30
45	34.90	5.90
65.70	52.90	9.70
33.30	20.80	2.70
50	50.90	14.20
0	25.90	8.30
39.30	10.50	0
4.20	63.20	20.60
58.30	48.70	19.60
92.30	24.40	25

Figure 62

Crassostrea gigas		
G	GH	PH
66.60	44.60	30.40
55.50	7.20	40.90
66.60	17.90	30.80
76.40	15	13
75	32.70	50
62.50	51.80	46.10
85.70	7	15.40
66.60	15.60	9.40
76.20	20	35.70
100	14	33.30
69.20	25.90	30
80	25.60	30.50
44.40	34	27.30
41.70	44.30	33.30
33.30	21.70	28.60
40	33.60	33.30
66.70	6.80	4.30
0	15.50	35.70
60	41.40	29.70
15	21.50	0
0	32.20	8.50
42.80	46.40	26.70
40	18.50	0
33.30	29.80	16.70
50	18.40	21
33.30	30.80	23
25	22.80	26.10
33.30	17.60	17.40
18	18.20	16.60
50	37.30	25
100	36.90	29.40
33.30	12	13.80
50	35.90	45.40
100	45.30	17.60
94.90	23.10	0
77.70	19.70	68.40
95.20	26.60	18.80
100	42.10	40.90
33.30	41.50	50

Figure 63

Evaluation des pourcentages de cellules parasitées
type par type après 1 h de contact in vitro

PLANCHE XII

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 64 :

Crassostrea gigas

Grand hyalinocyte après 30 mn de contact. Le parasite (B.O) est en contact ponctuel avec l'hémocyte qui commence à émettre des pseudopodes (ps)

Micrographie électronique X 15000

Figure 65 :

Crassostrea gigas

Contact entre un petit hyalinocyte et Bonamia ostreae (B.o) après 10 mn d'incubation. La coupe passe par l'appareil de Golgi (Go)

Micrographie électronique X 20000

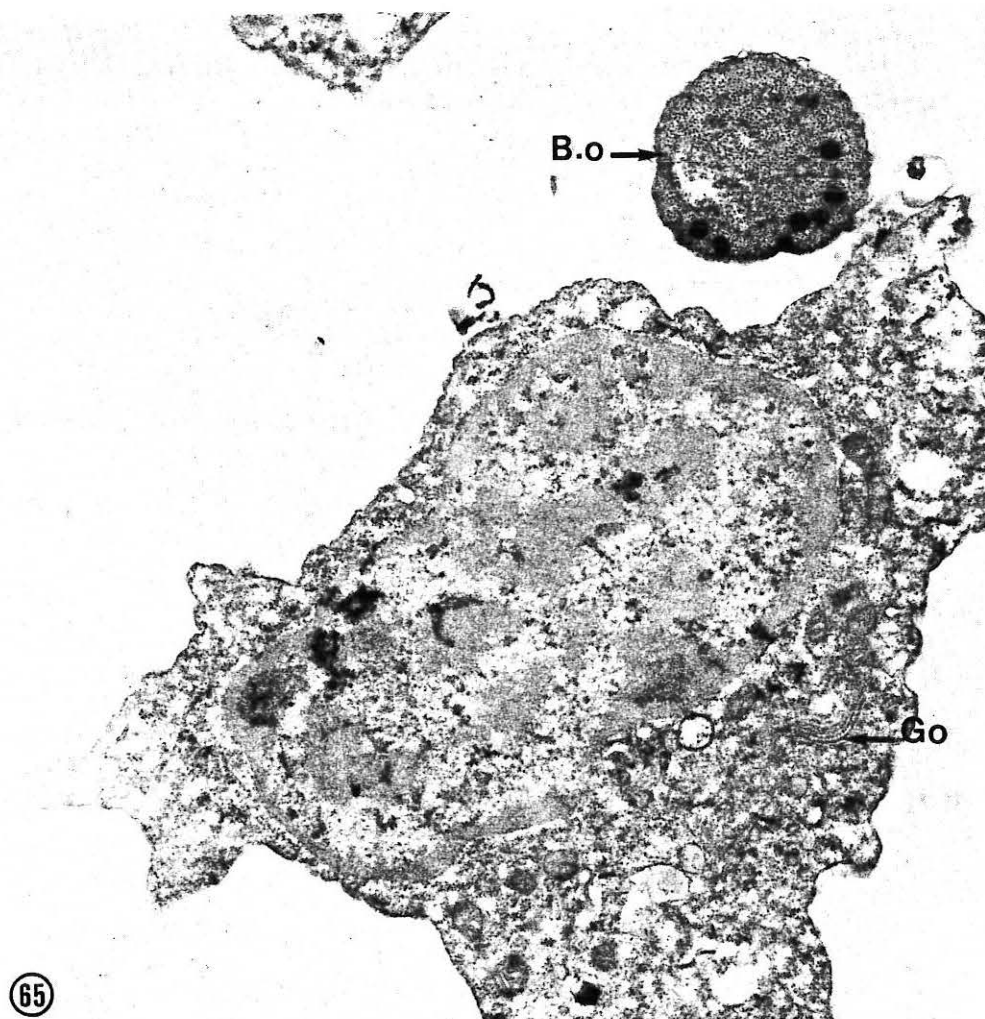
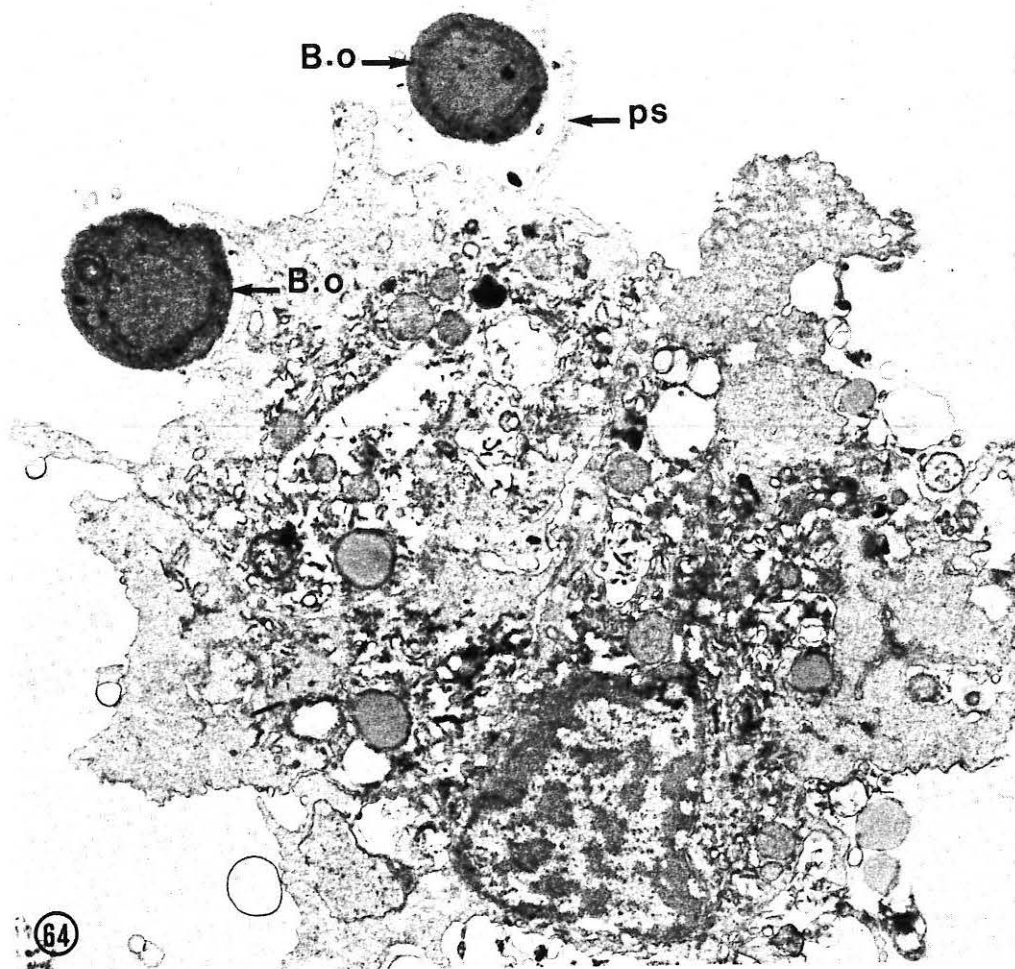


PLANCHE XIII

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 66 :

Crassostrea gigas

Fermeture progressive de la vésicule d'endocytose après 1 h
de contact

B.o = Bonamia ostreae

ps = pseudopode

Micrographie électronique X 20000

Figure 67 :

Crassostrea gigas

Internalisation de Bonamia ostreae (B.o) au sein d'une vacuole
parasitophore (va) dans un granulocyte à granules clairs aux
électrons (gc) après 1 h de contact

Micrographie électronique X 15000

Figure 68 :

Crassostrea gigas

Persistance de la vacuole parasitophore (va) dans un petit
hyalinocyte après 2 h de contact

Micrographie électronique X 62500

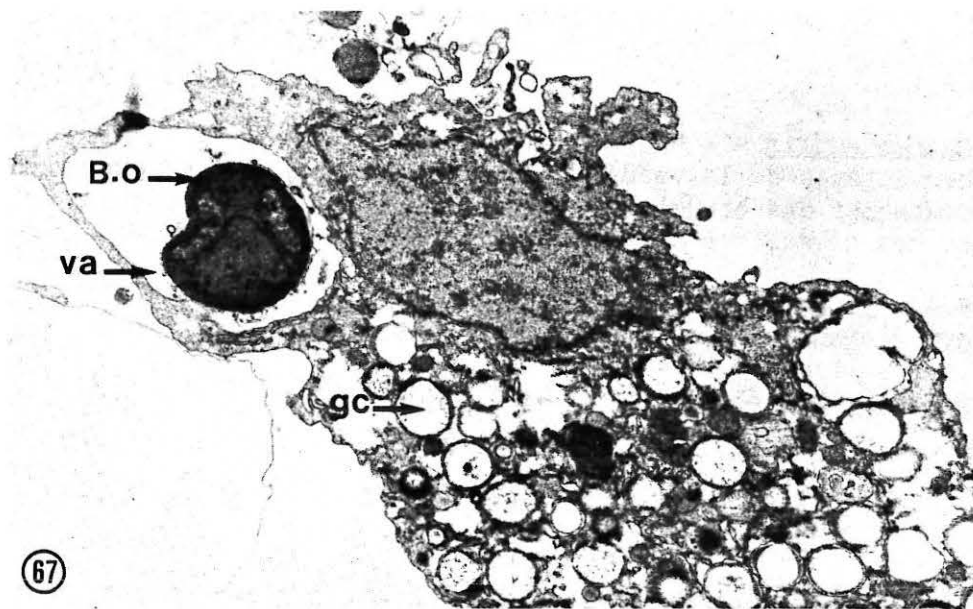
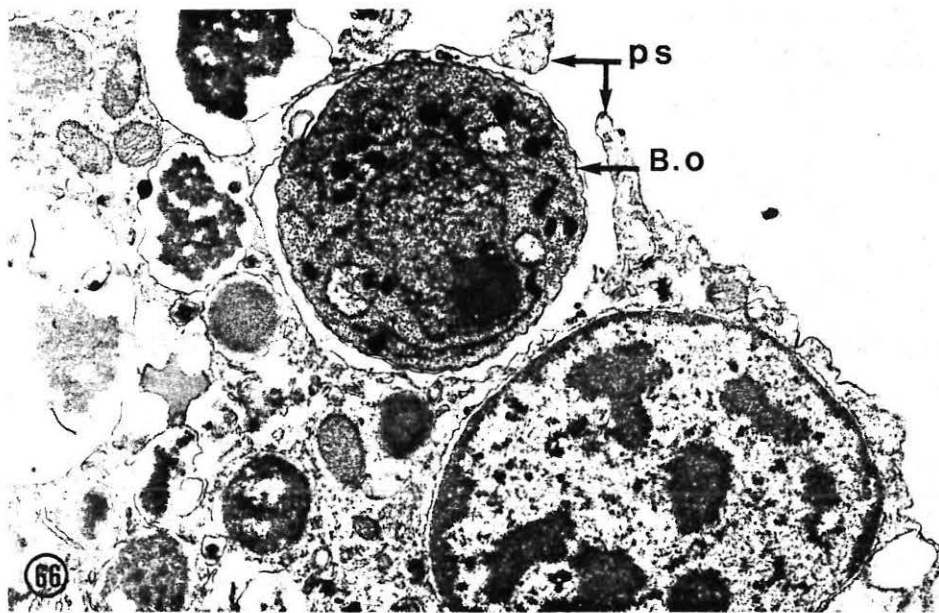


PLANCHE XIV

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 69 :

Ostrea edulis - 4 h après infection

Persistance de la vacuole parasitophore (va) dans un granulocyte
contenant des granules uniformément denses aux électrons (gr2)
et des granules à centre dense et cortex clair (gr3)

B.o = Bonamia ostreae

gr1 = granule à centre clair et cortex dense

Micrographie électronique X 17100

Figure 70

Ostrea edulis - 4 h après infection

Petit hyalinocyte

B.o = Bonamia ostreae

mi = mitochondrie

rer = réticulum endoplasmique rugueux

La vacuole parasitophore (va) est ici accolée à la membrane
plasmique du parasite

Micrographie électronique X 18000

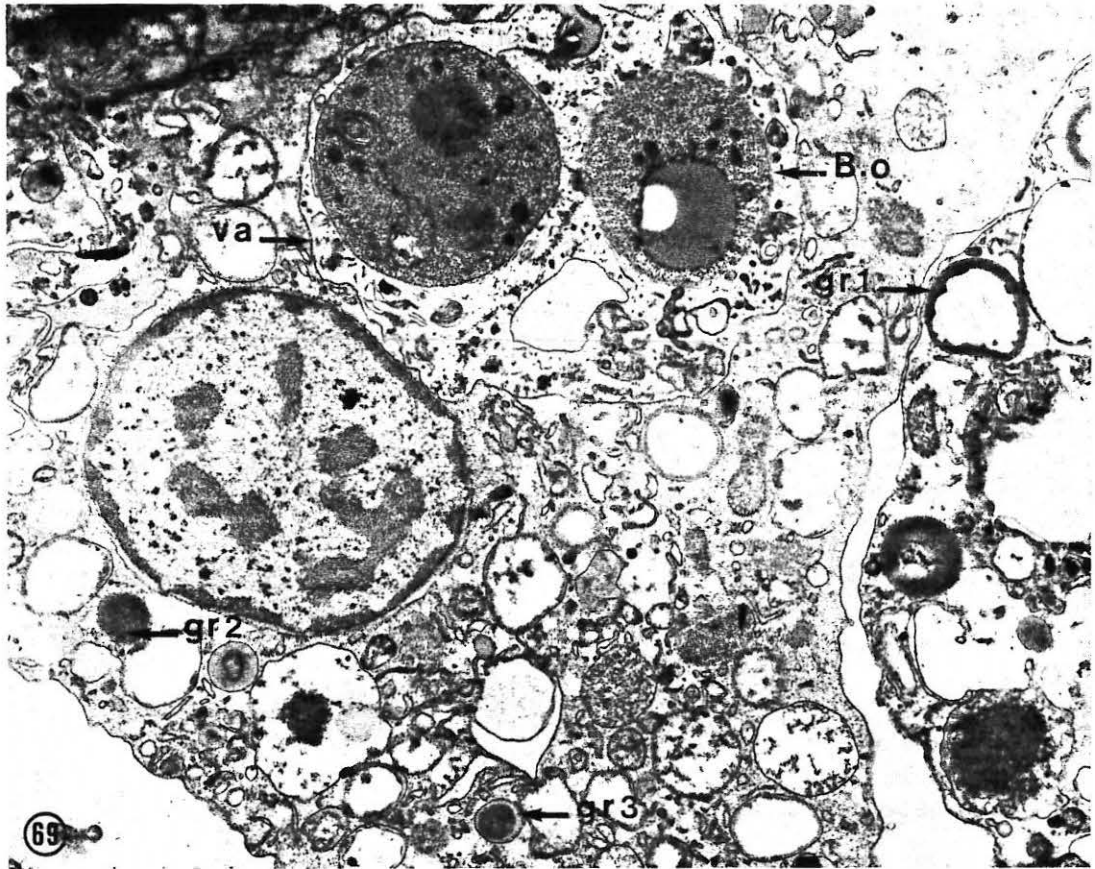


PLANCHE XV

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 72 :

Plus fort grossissement
du parasite de la
figure 71

M.électronique X 22500

Figure 71 :

Ostrea edulis 4 h après infection
Grand hyalinocyte. B.ostreae semble
libre dans le cytoplasme mais la
cellule hôte est assez dégradée

M.électronique X 15000

Figure 74 :

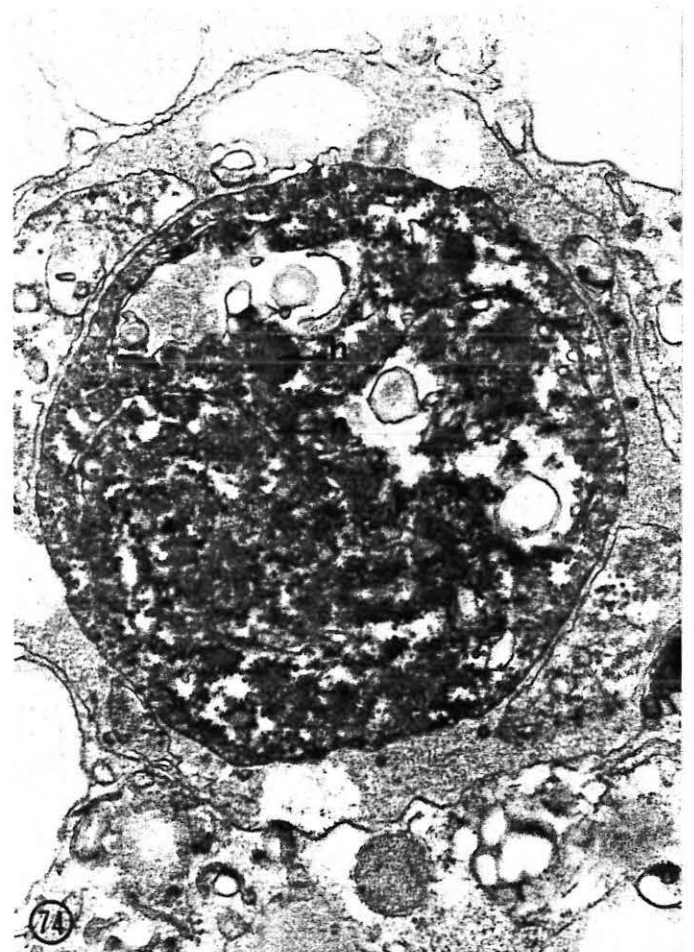
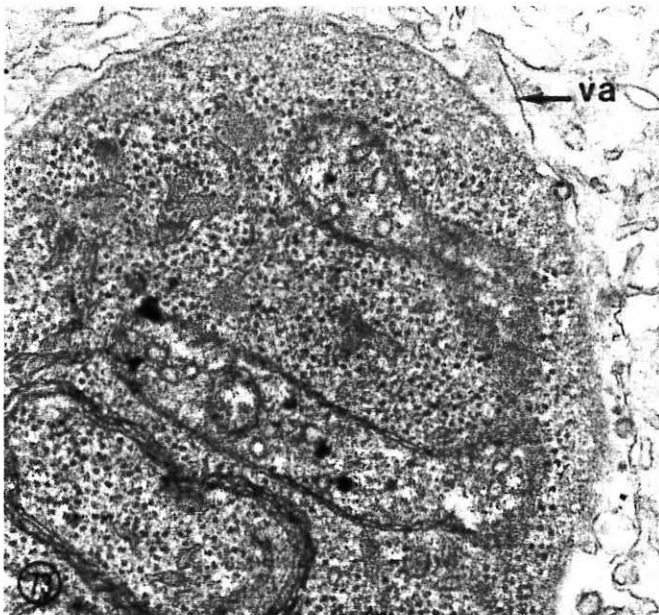
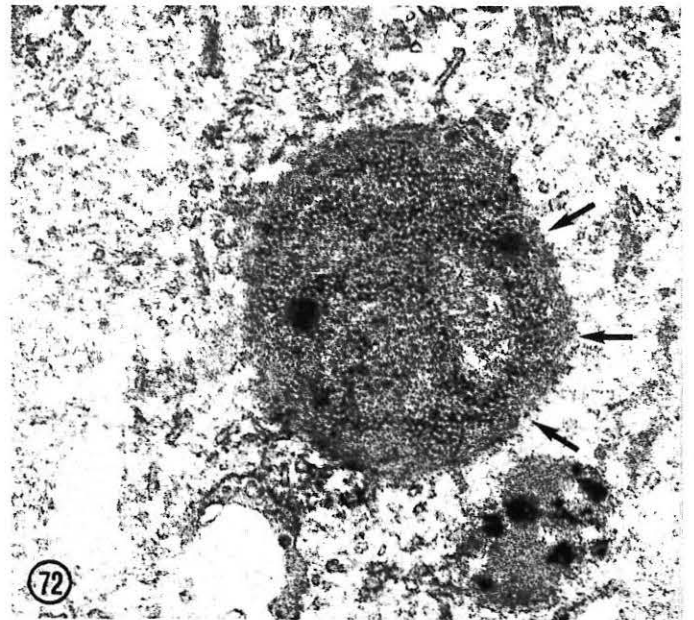
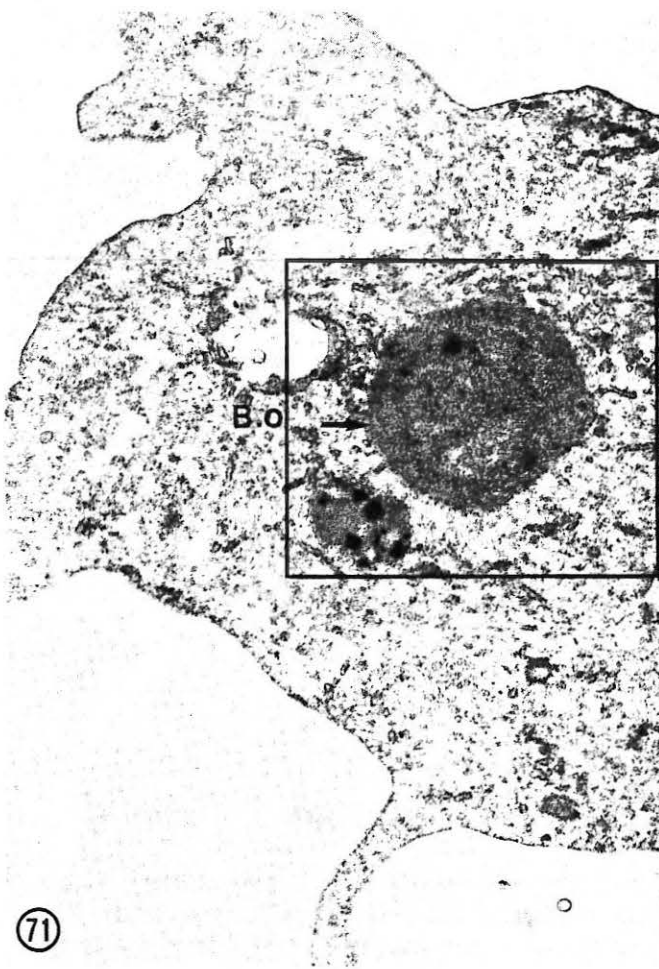
Crassostrea gigas
Vacuole parasitophore contenant
un parasite dégradé où l'on
identifie encore un haplosporosome (h)

M.électronique X 41500

Figure 73 :

Ostrea edulis 4 h après infection
Grand hyalinocyte. Dans ce cas,
la vacuole parasitophore (va) subsiste

M.électronique X 48500



Les différences sont analysées statistiquement par un test de signification appliqué à des séries appariées à l'aide d'un logiciel STATITCF. Ce test montre que le traitement des hémocytes par la cytochalasine B entraîne une diminution significative des taux d'infection quelle que soit l'espèce, sauf dans les grands hyalinocytes de C.gigas. Le DMSO, utilisé comme solvant de la cytochalasine B est sans effet sur les taux d'infection.

2.1.3. Traitement de B.ostreae par la cytochalasine B

La figure 76 présente les résultats de l'expérience parallèle à la précédente dans laquelle les taux d'infection sont estimés lorsque le parasite est traité par la cytochalasine B avant sa mise en contact avec des hémocytes non traités et comparés à des taux d'infection témoin. La diminution des taux d'infection observée lorsque B.ostreae est prétraité à la cytochalasine B, soit en moyenne 17.4 % dans les granulocytes, 7.9 % dans les grands hyalinocytes, 8.2 % dans les petits hyalinocytes chez C.gigas et respectivement 24.2 %, 21.2 et 10 % chez O.edulis, est non significative chez C.gigas, alors qu'elle est significative chez O.edulis, et pour tous les types cellulaires, selon le même test statistique que précédemment.

2.2. Phénomènes de reconnaissance : étude des récepteurs impliqués

2.2.1. Rôle opsonisant de l'hémolymphe

Afin de déterminer l'intervention de facteurs humoraux dans la phagocytose de B.ostreae, les taux d'infections sont comparés lorsque l'on met le parasite en contact, soit avec l'hémolymphe complète, soit avec des hémocytes lavés et remis en suspension dans de l'eau de mer filtrée.

L'analyse statistique des données obtenues (fig.77) montre que les résultats ne sont pas significativement différents chez C.gigas pour les trois catégories d'hémocytes, en présence ou en l'absence d'hémolymphe.

Par contre, la baisse des taux d'infections chez O.edulis est significative dans les granulocytes et les petits hyalinocytes en l'absence d'hémolymphe, alors qu'elle ne l'est pas dans les grands hyalinocytes.

2.2.2. Intervention d'épitopes membranaires de B.ostreae

. Localisation d'un épitope membranaire

L'anticorps monoclonal anti-B.ostreae 20B2, utilisé comme marqueur dans une technique d'immunofluorescence indirecte donne des images qui suggèrent que l'épitope reconnu sur le parasite se localise sur la membrane plasmique (fig.78, Pl.XVI).

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
66.60	0	44.60	16.60	30.40	12.90
55.50	50	7.20	30.90	40.90	0
66.60	62.50	17.90	30.60	30.80	6.70
76.40	0	15	0	13	15.55
75	8.30	32.70	3.80	50	3.20
62.50	0	51.80	0	46.10	0
85.70	66.60	7	36.10	15.40	4
66.60	0	15.60	1.90	9.40	0
76.19	33.30	20	36	35.70	25.50
100	20	14.50	8.30	33.30	0
69.20	0	25.90	6.70	30	10
80	20	25.60	17	30.55	11.40
P = 0.00		P = 0.3		P = 0.00	

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
55.50	0	26.90	0	26.15	1.60
27.30	36.40	9.40	4.40	5.60	0
23.10	10	34.80	3.78	2.40	0
38.90	0	23.80	2.10	22.50	2
32.70	0	0	0	0	2.10
30.80	0	9.80	0	17.40	0
100	100	13.04	14.30	11.80	1.10
18.70	21.70	19.04	27.70	11.50	5.10
20	9.10	16.90	5	19.40	2
37.50	0	28.60	0	15.80	3.60
0	0	26.50	9.80	4.70	6.50
P = 0.01		P = 0.009		P = 0.004	

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 75 : Traitement des hémocytes par la cytochalasine B

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
44.44	40	34.04	33.33	27.27	25.53
41.66	25	44.29	41.55	33.33	9.10
33.33	40.50	21.69	3.66	28.57	7.69
40	0	33.56	8.24	33.33	9.69
66.66	12.50	6.75	1.30	4.35	13.33
0	0	15.50	3.45	35.70	12.82
60	57.14	41.38	55	29.73	30.30
P = 0.11		P = 0.18		P = 0.06	

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
20	15.60	65.95	30.43	30.23	11.11
54.16	26.66	43.48	12.12	8.82	0
51.28	9.30	41.02	22.86	4.55	16.66
57.14	0	43.75	28.58	29.51	7
54.54	47.05	45.61	41.66	33.33	31.43
25	38.46	46.34	25.50	17.14	2.77
70	17.65	39.02	10.25	12.25	4.54
0	20	43.10	19.35	17.07	0
39.13	19.05	37.50	27.77	6.66	4
P = 0.006		P = 0.000		P = 0.003	

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 76 : Traitement de Bonamia ostreae par la cytochalasine B

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
15	11	21.50	15.50	0	6
0	0	32.20	8.60	8.5	13
42.80	5.90	46.40	15	16.21	0
40	16.60	18.51	16.20	26.66	30
33.30	50	29.76	28	0	8.3
50	37.50	18.42	14.66	16.66	11.8
33.30	50	30.76	19.44	21.05	3.8
25	27.20	22.78	10	23	5.3
33.30	66.60	17.56	30	26.08	21.4
18	25	18.18	14.28	17.4	3.4

P = 0.9

P = 0.06

P = 0.2

<u>Ostrea edulis</u>					
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
28.60	40	50	1.85	1.85	2.70
31.20	15.40	19.23	17.30	17.30	10.71
73.30	58.33	46.15	6.80	6.80	7.55
54.50	16.66	47.70	2.22	2.22	12.50
36.36	50	20	4.16	4.16	2.56
33.33	30	9.60	13.88	13.88	20
80.76	51.35	36	12.50	12.50	9.68
53.80	0	22.38	10	10	0
54.16	50	8.20	13.33	13.33	17.65
45	15.40	34.90	5.88	5.88	7.70
65.71	55.55	52.90	9.67	9.67	8.33
33.33	22.70	20.80	2.74	2.74	4.35

P = 0.02

P = 0.5

P = 0.08

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 77 : Intervention de facteurs humoraux dans la phagocytose de Bonamia ostreae

Témoins : en présence d'hémolymphe
Expériences : en l'absence d'hémolymphe

PLANCHE XVI

Mise en évidence d'épitopes membranaires

Figure 78 :

Apposition de coeur d'huître parasitée
Immunofluorescence indirecte avec l'anticorps monoclonal
anti Bonamia ostreae 20B2

Micrographie photonique X 1250

Figure 79 :

Coupe ultra-fine congelée de coeur d'huître parasitée, Immunogold.
Dans la vacuole parasitophore (va) d'un hémocyte contenant un
parasite (B.o), les flèches indiquent les particules d'or colloïdal
qui signalent la fixation de l'anticorps monoclonal 20B2

Micrographie électronique X 36000

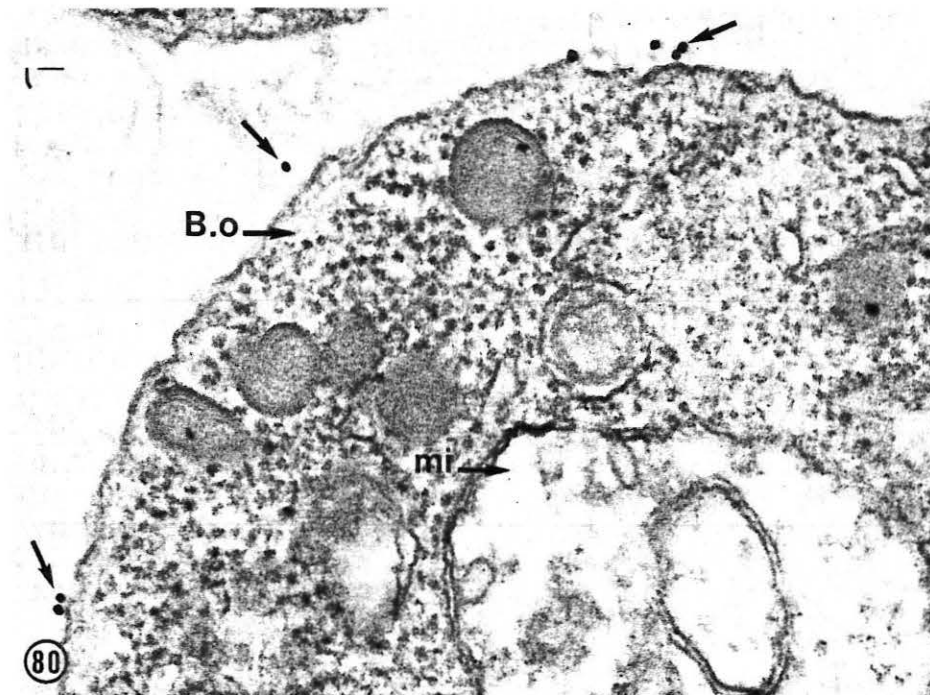
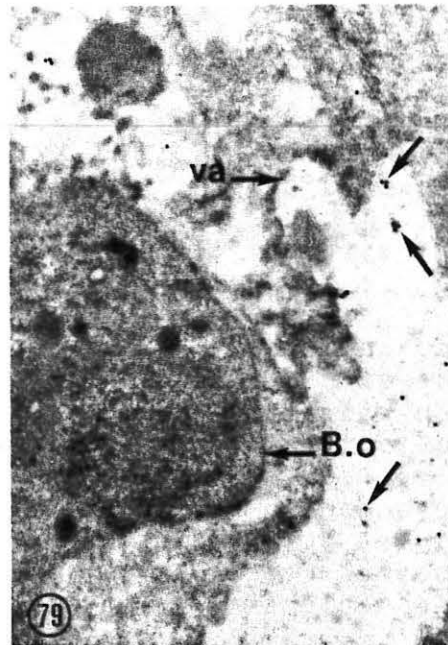
Figure 80 :

Coupe ultra-fine congelée de coeur d'huître parasitée, Immunogold.
Détail d'un parasite (B.o)

mi = mitochondries

Les flèches indiquent les sites de fixation de l'anticorps
monoclonal 20B2 sur la membrane du parasite et dans la
vacuole parasitophore

Micrographie électronique X 100000



Cette hypothèse a été vérifiée par immunomarquage à l'or colloïdal de coupes ultra-fines congelées de coeur d'O. edulis atteinte de bonamiose. Aucun marquage n'est observé lorsque les coupes sont incubées avec un anticorps témoin de souris anti-amylase au lieu de l'anticorps 20B2 comme anticorps primaire. De même, il ne se produit aucun marquage si les coupes sont incubées seulement avec la protéine A-gold.

Lorsque l'anticorps monoclonal 20B2 est appliqué, suivi de la protéine A-gold, les particules d'or sont observées sur la membrane plasmique de B. ostreae (fig.80, Pl.XVI), mais aussi dans la vacuole parasitophore (fig.79, Pl.XVI). Aucun marquage n'est observé sur les tissus adjacents.

. Traitement du parasite par des anticorps monoclonaux 20B2 + 15C2

Ces anticorps sont utilisés préalablement au contact hémocytes parasite afin de masquer des épitopes membranaires susceptibles de jouer un rôle dans les phénomènes de reconnaissance. Les taux d'infection sont plus faibles lorsque le parasite est ainsi prétraité (fig.81). Le test statistique de comparaison de séries appariées montre que la diminution observée est significative chez O. edulis et C. gigas. Elle est significative pour les grands hyalinocytes des deux espèces et pour les petits hyalinocytes de C. gigas seulement.

2.2.3. Reconnaissance liée aux interactions sucre-lectine

Des données récentes (SHARON et OFEK, 1986 ; SHARON, 1987) mettent en évidence une reconnaissance spécifique entre phagocytes et cellules-cibles par l'intermédiaire de protéines membranaires de type lectine, présentes sur l'une des cellules et capable de se combiner à des sucres complémentaires à la surface de l'autre cellule, la liaison pouvant entraîner la phagocytose. Cette hypothèse a été envisagée pour le modèle B. ostreae-hémocytes.

. Traitement des hémocytes par des sucres simples

Les sucres sont choisis sur la base de leur reconnaissance la plus fréquente par les lectines de bivalves et appliqués en panel comprenant du glucose, du mannose, du fucose et des N-acétyl glucosamine et galactosamine. La figure 82 donne les résultats des taux d'infection dans les trois types cellulaires des deux espèces avec des hémocytes témoins et des hémocytes dont les lectines membranaires sont liées à des oligosaccharides. Il n'y a pas d'effet évident du traitement sur les taux d'infection, ce qui est confirmé par l'analyse statistique.

. Traitement de B. ostreae par des sucres simples

Le même mélange de sucres est utilisé pour pré-incuber B. ostreae. Après lavage, les parasites sont utilisés pour infecter des hémocytes normaux. Dans ce cas, on observe dans les deux espèces une diminution des taux d'infection quelle que soit la population hémocytaire considérée (fig.83).

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
60	0.25	16.70	17.50	9	0
22.20	71.40	25.70	26.40	0	0
100	50	35	25.20	0	0
100	0	21.70	7.50	0	0
94	100	24.70	18.30	20	0
36.40	37.50	28	21.50	15.80	5.20
100	100	27.40	16.20	0	0
50	62.50	47	24.20	25	0
P = 0.3		P = 0.01		P = 0.05	

<u>Ostrea edulis</u>					
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
0	100	34	17.20	0	0
63.60	13.30	33.70	22.40	5.50	0
49.20	0	30.50	21.10	0	0
100	0	36	14.70	11.10	12.50
100	20	24	6.40	0	0
20	0	19.40	5.70	0	0
88.20	50	21.70	11.20	7	0
68.57	44.40	5.70	8.60	0	0
P = 0.21		P = 0.04		P = 0.2	

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 81 : Traitement de Bonamia ostreae par un mélange d'anticorps monoclonaux 20 B2 et 15C2

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités
71.40		37.30		16.60	5.70
57.10	50	36.90	53	25	4.20
62.50	100	12	33.30	29.40	19.04
28.60	33.30	35.90	45.30	13.80	20
66.70	50	45.30	37.90	45.40	21.43
100	100	23.10	48.30	17.60	11.60
93.30	94.90	19.70	17.30	0	0
0		26.60		68.40	28.60
75	77.70	42.10	27.80	18.75	7.10
92.30	95.20	41.50	24.20	40.90	0
89.20	100	29.60	25.90	50	18.20
78.60	33.30	47	36.40	38.90	28.60
P = 0.4		P = 0.3		P = 0.15	

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités
68.90	50	50.90	64.90	14.20	39.10
33.30	0	25.90	1.20	8.30	0
33.30	39.30	10.53	43.90	0	9.70
31.60	4.20	63.16	50	20.60	23.50
26.70	58.30	48.72	60	19.60	17.60
84.20		24.40		25	
80	92.30	40	55.50	4.30	13.80
P = 0.3		P = 0.7		P = 0.8	

P : Test statistique de comparaison de séries appariées

Figure 82 : Traitement des hémocytes par un mélange de sucres simples

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité
71.40	35.70	37.30	31.40	16.60	31.20
57.10	53.80	36.90	39.70	25	5.26
62.50	50	12	18.20	29.40	8.60
28.60	60	35.90	41.30	13.80	10.50
66.70	80	45.30	35.50	45.40	42.80
100	0	23.10	18.40	17.60	21.40
93.30	91.20	19.70	17.80	0	0
0	0	26.60	19.70	68.40	39.30
75	59.10	42.10	20.30	18.75	6.25
92.30	94.40	41.50	14.10	40.90	13.30
89.20	69.20	29.60	21.10	50	29.40
78.60	62.50	47	25	38.90	30.40

P = 0.2

P = 0.04

P = 0.003

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité
68.90	20	50.90	42	14.20	12
33.30	0	25.90	14.10	8.30	0
33.30	5.90	10.53	10.50	0	3.60
31.60	10	63.16	11.80	20.60	2.60
26.70	44.40	48.72	41.20	19.60	10.52
84.20	3	24.40	31.25	25	4.25
80	33.30	40	38.78	4.30	9.10

P = 0.02

P = 0.2

P = 0.04

P : Test de comparasion de séries appariées

Figure 83 : Traitement de Bonamia ostreae par un mélange de sucres simples

Cette diminution est statistiquement significative, pour les grands et petits hyalinocytes de C.gigas et non significative pour les granulocytes ; elle est aussi significative pour les granulocytes et les petits hyalinocytes d'O.edulis alors qu'elle est non significative pour les grands hyalinocytes de cette espèce.

3. PHENOMENES DE SURVIE

La comparaison des résultats expérimentaux in vivo montre que C.gigas est réfractaire à la bonamiose alors qu'O.edulis est sensible. Or, in vitro, B.ostreae est internalisé par les cellules sanguines des deux espèces ce qui suggérerait une destruction du parasite par les hémocytes de C.gigas et une survie dans ceux d'O.edulis. L'analyse des phénomènes de survie a été conduite du point de vue des capacités cytocides oxygène dépendantes mises en évidence chez les hémocytes.

3.1. Activités enzymatiques de détoxification chez B.ostreae

3.1.1. Phosphatase acide

Le principe de la détection d'une activité phosphatasique acide au niveau ultrastructural est le même que celui utilisé pour les hémocytes. Pratiquée sur une suspension de B.ostreae purifié, la réaction donne lieu à la formation d'un produit insoluble qui se localise au niveau du corps dense (fig.84.Pl.XVII).

3.1.2. Catalase

Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, lors d'une réaction où H_2O_2 est à la fois donneur et accepteur d'électrons. En milieu alcalin, elle est partiellement dissociée en sous-unités de peroxydase et peut ainsi être détectée par l'oxydation de la DAB. L'incubation de B.ostreae dans le milieu de Novikoff et Goldfisher donne lieu à la formation cytoplasmique d'un précipité brun révélateur d'une activité catalase. Si le milieu contient du 3-amino-1,2,4-triazole, aucun précipité ne se développe : la sensibilité de la réaction à ce puissant inhibiteur de catalase confirme la présence d'une activité enzymatique de ce type chez B.ostreae (fig.85, Pl.XVII).

3.2. Interférence de B.ostreae avec le "Respiratory Burst"

La réponse des hémocytes en chimioluminescence est étudiée lorsque B.ostreae est utilisé comme stimulant. La figure 86 présente les courbes obtenues lorsque B.ostreae vivant ou tué est phagocyté par les hémocytes des deux espèces. Des témoins hémocytes non stimulés et hémocytes stimulés par la zymosan sont inclus dans l'expérience. Aucun pic d'activité n'est enregistré lors de la phagocytose de B.ostreae vivant ou tué et ceci dans les deux espèces.

PLANCHE XVII

Caractérisations d'activités enzymatiques
chez Bonamia ostreae

Figure 84 :

Phosphatase acide
Coupe ultra-fine non contrastée à partir d'un culot de
Bonamia ostreae purifié

h = haplosporosome
mi = mitochondrie
cd = corps dense

Les flèches indiquent le précipité de phosphate de plomb formé
sous l'action de la phosphatase acide

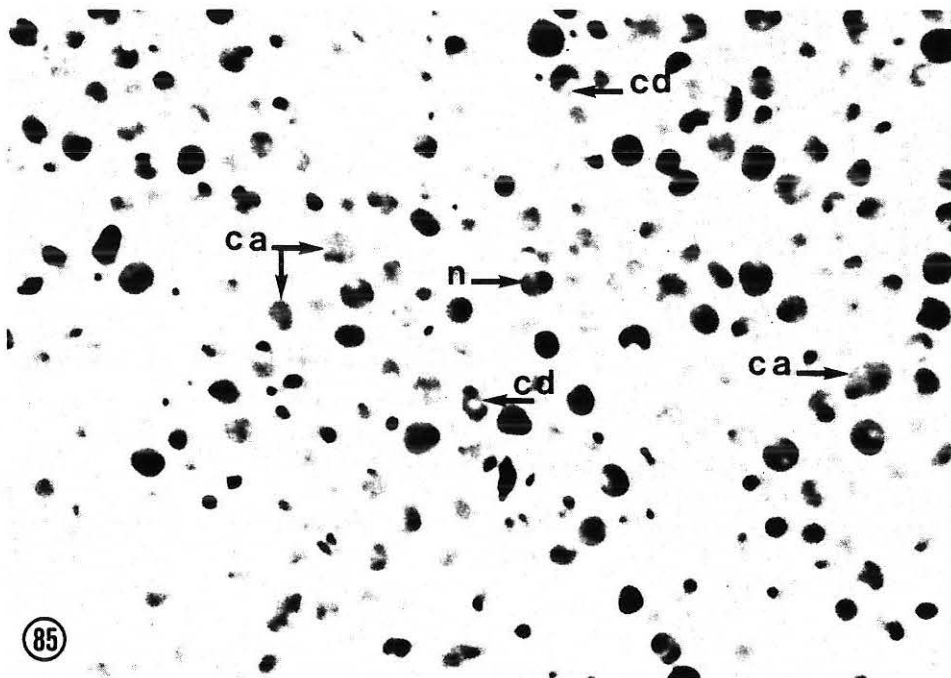
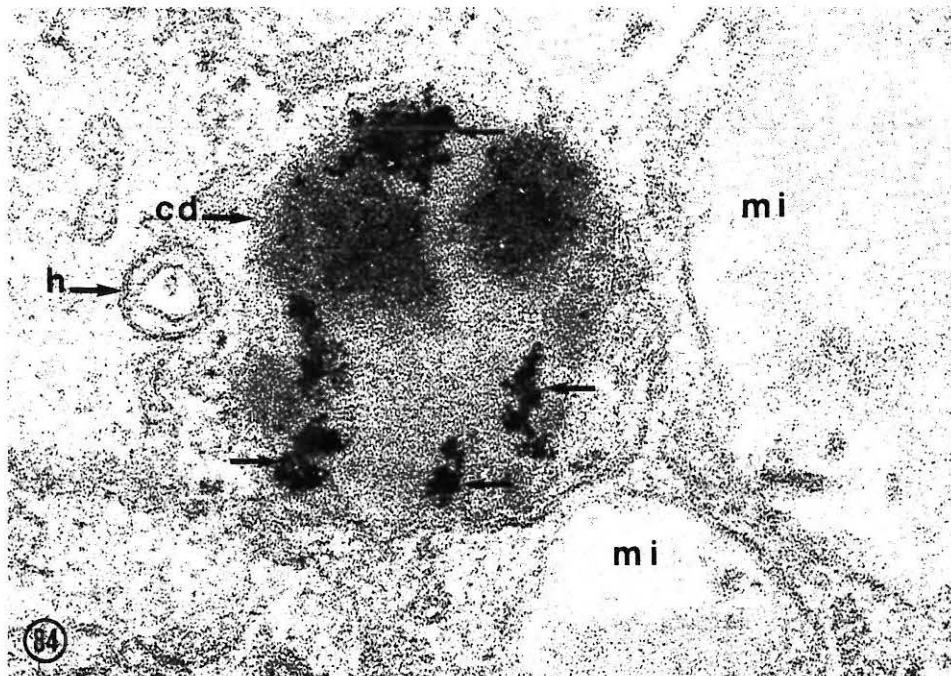
Micrographie électronique X 150000

Figure 85

Catalase
Frottis de Bonamia purifié
Les sites d'activité catalase se localisent dans le cytoplasme du
parasite qui prend un aspect granuleux

n = noyau
cd = corps dense

Micrographie photonique X 1250



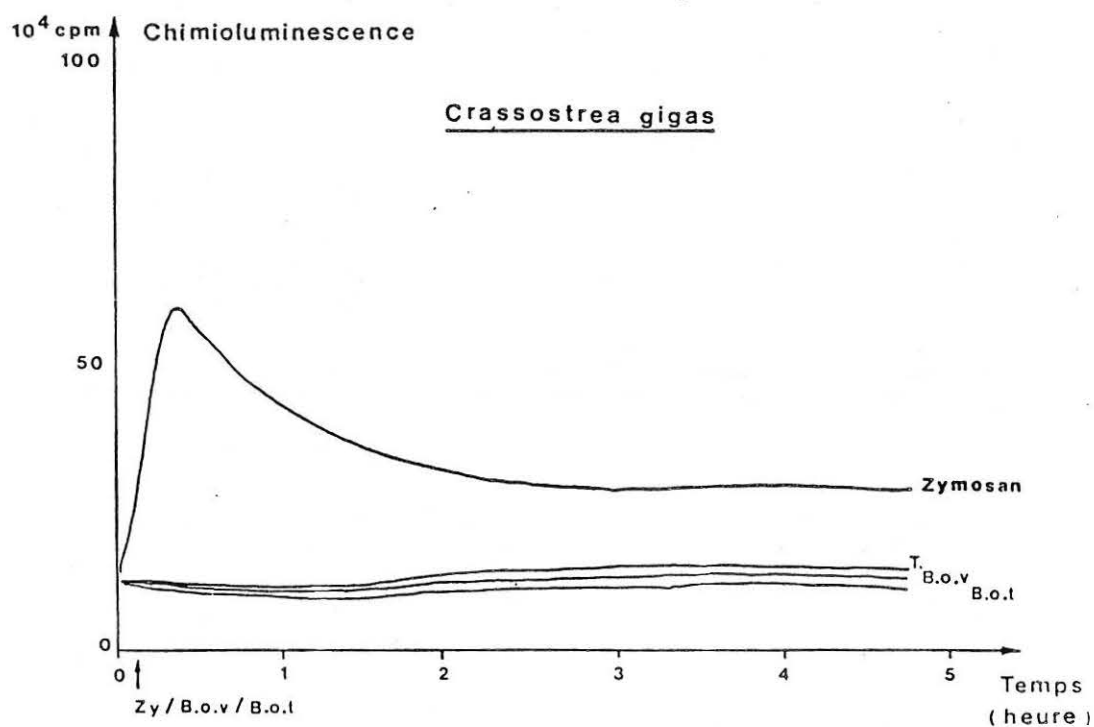
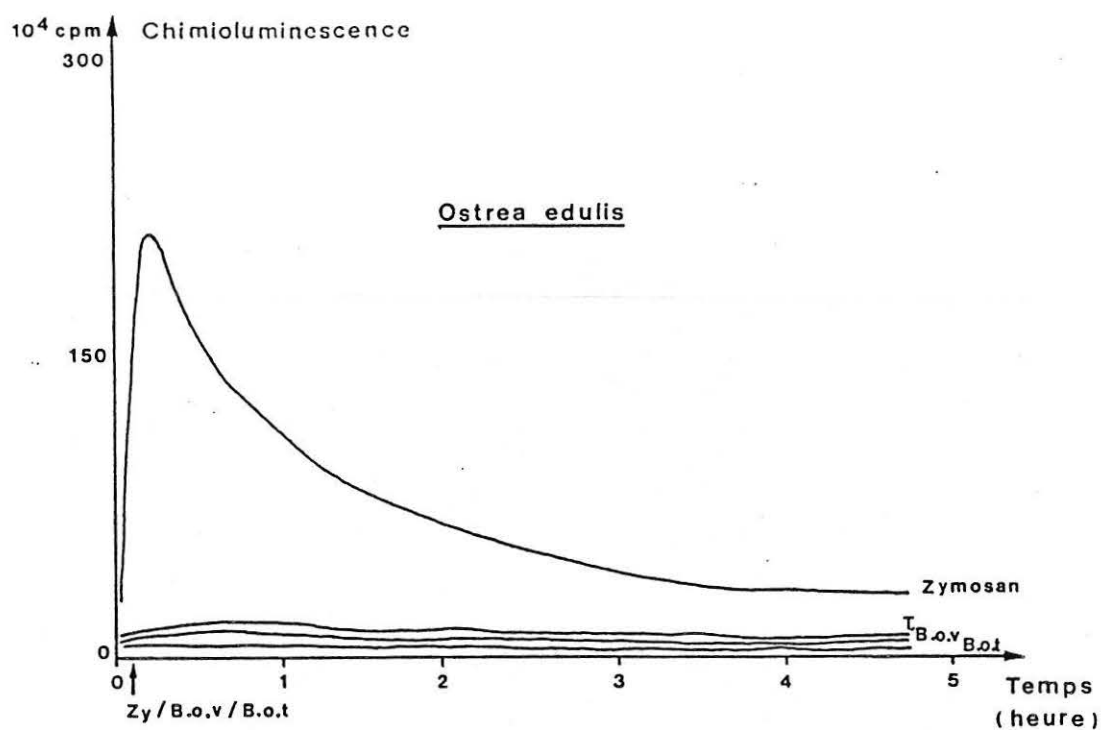


Figure 86 : Chemiluminescence amplifiée par le luminol
de 2×10^5 hémocytes d'O.edulis et de C.gigas
phagocytant B.ostreae

T : Témoin
B.o.t : B.ostreae tué
B.o.v : B.ostreae vivant

4. DISCUSSION

Les mécanismes par lesquels les parasites des bivalves marins s'établissent dans l'hôte et induisent la pathogénèse restent peu étudiés. La disposition d'un modèle d'étude in vitro B.ostreae-hémocytes (MOURTON, 1987) a permis d'aborder ces questions avec une démarche expérimentale inspirée des recherches effectuées en médecine humaine sur des protozoaires parasites intracellulaires tels que Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi, ou Toxoplasma gondii, capables de survivre dans des macrophages.

En effet, l'hémocyte, cellule-hôte de B.ostreae présente des caractéristiques qui le rapprochent du macrophage.

Dans les deux espèces, O.edulis et C.gigas, le mécanisme d'entrée, dont le déroulement a été suivi en ultrastructure, se révèle sensible à la cytochalasine B : la diminution significative des taux d'infection par traitement des hémocytes avec cette molécule indique une phagocytose dirigée par l'hôte (MOULDER, 1985) dans les deux cas. Chez O.edulis seulement, le traitement du parasite par la cytochalasine B entraîne une diminution significative des taux d'infection : il y aurait donc pour cette espèce, une possible pénétration active, les deux modes d'entrée pouvant par ailleurs être simultanés comme pour T.gondii (WERK, 1985). Des études complémentaires devront être entreprises pour pouvoir établir si B.ostreae induit sa propre endocytose.

C'est de cette façon que Rickettsia tsutsugamushi et R.prowazekii entrent dans les cellules hôtes par un mécanisme sensible à la cytochalasine B qui ressemble à la phagocytose. Cependant, elles ne pénètrent plus si elles sont inactivées par la chaleur, le formaldéhyde ou la lumière ultra-violette (COHN et al., 1959 ; WALKER et WINKLER, 1978). D'autre part, le traitement de T.cruzi par un inhibiteur de synthèse, le cycloheximide, réduit de 80 % l'internalisation du parasite (ZINGALES et COLLI., 1985) pour lequel le concept de phagocytose induite est également valable.

Les expérimentations entreprises mettent en évidence des interactions de type récepteur-ligand au niveau des membranes plasmiques des hémocytes et du parasite. Ces interactions conditionnent l'internalisation ou non de B.ostreae. De telles études présentent un double intérêt : celui de définir les processus d'adaptation du parasite à sa cellule hôte, mais aussi celui plus général de la reconnaissance immune chez les Mollusques bivalves.

Chez C.gigas, la séquence des événements membranaires peut conduire à une interprétation relativement simple : le parasite est inactif et la phagocytose semble se produire par l'intermédiaire d'un ligand de type lectine présent sur B.ostreae de spécificité glucose, mannose, fucose, N-acétyl glucosamine ou N-acétyl galactosamine, le récepteur hémocytaire glycoprotéique ou glycolipidique comportant un ou plusieurs de ces oligosaccharides en position terminale.

Le blocage d'épitopes membranaires masqués par les anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2 influence significativement les taux de phagocytose. Aucun des autres récepteurs étudiés n'influence significativement le taux de phagocytose : s'il existe un récepteur de type lectine à la surface des hémocytes, susceptible d'être bloqué par les sucres utilisés, il n'intervient pas, pas plus que n'intervient un récepteur pour un ligand humoral agissant comme opsonine. Chez O.edulis, le phénomène d'entrée est plus complexe, puisqu'il met en évidence une phagocytose initiée par l'hôte, mais aussi une phagocytose induite par B.ostreae. Comme chez C.gigas, un récepteur hémocytaire de membrane de type lectine de membrane ne semble pas jouer alors qu'un tel récepteur est opérant sur le parasite. Il faut rappeler qu'un récepteur de type agglutinine du germe de blé (WGA) a été mis en évidence sur les promastigotes de Leishmania mexicana (BRAY, 1983) et est supposé sur les trypanomastigotes de T.cruzi (ZINGALES et COLLI, 1985). D'autre part, de nombreuses espèces bactériennes comportent des lectines qui interagissent avec des structures membranaires contenant des sucres sur les phagocytes et provoquent une "lectinophagocytose" (OFEK et SHARON, 1988). La spécificité du récepteur de type lectine de B.ostreae devra être précisée par des études d'inhibition réalisées en traitant le parasite avec les sucres préalablement utilisés en solutions séparées.

Des récepteurs d'une nature différente paraissent impliqués dans l'internalisation de B.ostreae par les hémocytes de l'huître plate. La diminution significative des taux d'infection en l'absence d'hémolymphe suggère chez O.edulis l'intervention de facteurs humoraux facilitant l'internalisation. Des études ultérieures devront établir s'il s'agit de lectines plasmatiques, puisque ces molécules sont présentes chez les Mollusques et fortement impliquées dans l'opsonisation. Les lectines exogènes facilitent l'ingestion de bactéries (GALLILY et al., 1984) et de levures (BAR-SHAVIT et GOLDMAN, 1976) par des macrophages de Vertébrés.

Il semble donc que l'entrée de B.ostreae dans les hémocytes d'O.edulis mette en jeu comme chez L.donovani (ALEXANDER et RUSSEL, 1985), plusieurs récepteurs dont le fonctionnement coordonné ou indépendant reste à démontrer.

Les épitopes membranaires de B.ostreae, susceptibles d'être masqués par les anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2 reconnaissent des structures communes aux hémocytes des deux espèces. La disponibilité d'anticorps monoclonaux rend possibles la purification et la caractérisation de ces déterminants antigéniques de B.ostreae par des techniques de chromatographie d'affinité ou d'immunoprécipitation (HANDMAN et GOODING, 1985 ; DIRK et al., 1985) ce qui constituerait une première étape dans l'étude de leur rôle biologique. La localisation membranaire et vacuolaire de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 20B2 présente dans cette optique un intérêt certain, car des antigènes de localisation similaire ont été décrits chez Leishmania major ou T.gondii (HANDMAN et GOODING, 1985 ; EILAM et al., 1985 ; SIBLEY et al., 1986a) et sont impliqués dans des phénomènes de reconnaissance et de résistance aux enzymes lysosomiales.

L'ingestion d'un agent pathogène par un macrophage donne lieu à une série d'évènements qui doivent aboutir à la mort du premier. Ces évènements comprennent l'activation métabolique respiratoire, la production de radicaux libres de l'oxygène et la fusion des lysosomes avec le phagosome contenant l'agent pathogène. Les parasites intracellulaires ont élaboré des stratégies pour éviter les conséquences létales des phénomènes post-phagocytaires (EDELSON, 1982 ; MAUEL, 1984). Ainsi, l'étude en chimioluminescence de la phagocytose de B. ostreae montre qu'il y a interférence avec l'activation métabolique respiratoire des hémocytes des deux espèces. Trois hypothèses peuvent être émises :

- l'interaction ligand-récepteur qui entraîne l'internalisation de B. ostreae ne stimulerait pas le "Respiratory Burst", la nature du récepteur conditionnant le devenir du parasite. La phagocytose sans "Respiratory Burst" a été démontrée pour des macrophages humains (WRIGHT et SILVERSTEIN, 1983),

- le parasite inhiberait activement le "Respiratory Burst". La détection d'une phosphatase acide chez B. ostreae constitue dans ce cas un élément d'importance puisque la phosphatase acide membranaire de L. donovani décrite par GOTTLIEB et DWYER (1981) est capable de déprimer sévèrement la production de radicaux libres de l'oxygène (REMALEY et al., 1984). La phosphatase acide de B. ostreae n'est cependant pas une exoenzyme et se localise dans un organite interne, le corps dense. La fonction du corps dense et le mode de libération de la phosphatase acide devront être précisés,

- les radicaux libres de l'oxygène formés par les hémocytes seraient métabolisés et détoxifiés par B. ostreae, dans ce cas, la catalase mise en évidence pourrait avoir cette fonction (SIBLEY et al., 1986b ; PENKETH et al., 1987).

En ce qui concerne les mécanismes mis en jeu par B. ostreae afin d'éviter les dommages consécutifs à l'action des enzymes lysosomiales, l'analyse ultrastructurale des infections in vivo et in vitro montre d'une façon à peu près constante la présence d'une vacuole parasitophore. Cette vacuole subsiste, après 4 heures de contact in vitro. L'adaptation parasitaire ne consiste donc probablement pas en une fuite hors du phagosome, comme pour T. cruzi, retrouvé libre dans le cytoplasme une heure après entrée dans la cellule au sein d'un phagosome (NOGUEIRA et COHN, 1976 ; MILDER et KLOETZEL, 1980) ou pour R. tsutsugamushi pour laquelle une phospholipase A peut être responsable de la dissolution de la membrane du phagosome, 30 mn après infection (WINKLER et MILLER, 1982).

Des images suggèrent que la fusion phagolysosomiale se produit (MOURTON, 1987) mais demandent à être confirmées par marquage de lysosomes par des produits sélectivement sequestrés par ces organites (HORWITZ et SILVERSTEIN, 1981). B. ostreae semble capable de survivre dans l'environnement hostile du phagolysosome. Les parasites du groupe des leishmanies ont fait cette adaptation. Les mécanismes mis en jeu sont assez mal connus, mais les facteurs excrétés par les parasites de ce groupe et discutés précédemment inhibent certaines enzymes lysosomiales.

L'observation inattendue de figures d'extrusion d'haplosporosomes, organites dont la structure biochimique et la fonction sont inconnues soulève la question de leur implication dans des processus de survie. La disponibilité d'un protocole de purification des parasites peut laisser envisager la purification des haplosporosomes afin d'étudier leurs caractéristiques.

Si des différences sont notées dans les processus d'entrée et dans le comportement spécifique de chaque type cellulaire.

D - CONCLUSIONS

La situation épidémiologique reste stationnaire dans l'ensemble de la Bretagne. Les élevages conduits en eau profonde donnent des résultats variables d'un semis à l'autre, ces variations dépendent plus, à l'exclusion de Binic, de paramètres autres que la maladie (envasement, prédateurs). Cependant, toutes ces opérations permettent de dégager un bilan positif. Le point important reste l'approvisionnement en naissain. Les essais de diversification des zones de captage s'avèrent, pour le moment positifs, avec de bon rendement en rade de Brest et en Méditerranée. Le devenir ultérieur des semis permettra de conclure sur l'intérêt de cette stratégie.

Concernant les essais zootechniques, l'importance du transfert comme paramètre favorisant l'évolution de la maladie a été confirmé. Différentes expériences, vont être réalisées, pour mieux définir les conditions de transfert. Après six mois d'élevage, aucune différence n'apparaît dans les semis mixte. Cette période est de fait trop courte pour pouvoir tirer des conclusions. Enfin la première génération d'huîtres obtenues en écloserie et issues de géniteurs âgées de la baie de Quiberon a montré un taux de survie supérieur que celui du témoin, aussi bien en zone intertidale qu'en eau profonde. De plus, sur ce dernier site, les prévalences sont significativement différente entre les deux lots (2,4 % lot sélectionné, 12 % lot témoin). Une deuxième génération sera produite afin de vérifier si ces différences se confirment et si elles évoluent.

Le travail d'immunologie comparée a révélé des différences dans les mécanismes d'entrée de Bonamia ostreae chez l'huître plate et d'huître creuse. De plus, des premières données ont été obtenues sur le mécanisme d'échappement mis en oeuvre par B. ostreae. Cette étude très intéressante et susceptible de déboucher sur des applications sera poursuivie, en accentuant l'effort sur le devenir du parasite dans la vacuole parasitophore des hémocytes des deux genres d'huîtres.

DESTINATAIRES

- * Monsieur J.C. GOSSELIN, Commissaire de la République, Préfet de la région Bretagne.
- * Monsieur Y. BOURGES, Président du Conseil Régional de Bretagne.
- * Messieurs les Présidents des Conseils Généraux et Messieurs les Préfets des départements de Bretagne.
- * Monsieur le Président du Comité Economique et Social de Bretagne.
- * Monsieur le Directeur Régional des Affaires Maritimes et tous Quartiers des Affaires Maritimes.
- * Monsieur le Délégué Régional à l'Aquaculture.
- * Comité Interprofessionnel de la Conchyliculture (CIC).
- * Comité Central des Pêches Maritimes (CCPM).
- * Comité Régional des Pêches et des Cultures Marines (CORPECUM).
- * Sections régionales du Comité Interprofessionnel de la Conchyliculture (CIC) - Nord et Sud Bretagne.
- * Tous les Comités Locaux des Pêches de Bretagne.
- * Comité Interprofessionnel des Algues Marines (CIAM).
- * Comité Interprofessionnel des Crustacés.
- * Comité Interprofessionnel de la Coquille Saint-Jacques.
- * Comité d'Expansion Economique des Côtes-du-Nord.
- * Comité Départemental de Développement et d'Aménagement du Finistère.
- * IFREMER - Direction, Départements et services concernés.

LISTE DE DIFFUSION RIDRV

=====

- 2 exemplaires SDP/NANTES
- 2 exemplaires SDP/BREST
- 2 exemplaires DRV/PUB/PARIS
- Directions opérationnelles :
 - * DERO/PARIS
 - * DIT/PARIS
 - * DREC/PARIS
- tous Centres France métropolitaine et Outre Mer :
 - * Boulogne (1ex)
 - * Brest (1ex)
 - * Nantes (2ex)
 - * Toulon (1ex)
 - * Tahiti (1ex)
- tous Chefs de Département DRV :
 - * RA/PARIS
 - * RH/NANTES
 - * CSRU/NANTES
 - * UVP/NANTES
 - * SDA/PARIS
- toutes stations DRV France métropolitaine et Outre mer :
 - * ARCACHON
 - * BOUIN
 - * BOULOGNE
 - * BREST
 - * CONCARNEAU
 - * CREMA L'HOUMEAU
 - * NOIRMOUTIER
 - * OUISTREHAM
 - * PALAVAS
 - * ST MALO
 - * LA ROCHELLE
 - * LA TREMBLADE
 - * LA TRINITE
 - * LORIENT
 - * CORSE
 - * SETE
 - * GUYANE
 - * MARTINIQUE
 - * REUNION
 - * ST PIERRE ET MIQUELON

La Direction des Ressources Vivantes (DRV)
de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER)

produit une série non-périodique de documents scientifiques et techniques

Les RAPPORTS INTERNES DE LA DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

Cette série est destinée à permettre la diffusion en série limitée des travaux de recherche et développement réalisés par les laboratoires et stations de la Direction des Ressources Vivantes et des équipes associées dans le domaine de :

- la protection
- la conservation
- l'évaluation
- l'exploitation
- la valorisation

des ressources vivantes marines

et de l'environnement des pêches maritimes et cultures marines

La cotation des rapports RIDRV est constituée par : RIDRV-89. 001- RH/BOULOGNE

↑ ↑ ↑ ↑
Année. N°d'ordre- Département / Laboratoire d'origine

La Direction des Ressources Vivantes est constituée de 5 départements :

CSRU : CONTROLE ET SUIVI DES RESSOURCES ET DE LEUR UTILISATION

RA : RESSOURCES AQUACOLES

RH : RESSOURCES HALIEUTIQUES

SDA : STRATEGIES DE DEVELOPPEMENT ET D'AMENAGEMENT

UVP : UTILISATION ET VALORISATION DE LA RECHERCHE

Cote	Liste des Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes	Laboratoires
Année 1988		
DRV-88.005-CSRU	Bilan des perturbations phytoplanctoniques observées sur les côtes françaises en 1985.	Nantes
DRV-88.006-RH	Surveillance écologique et halieutique du site de Flamanville Année 1986.	Nantes
DRV-88.007-CSRU	Etude sanitaire (1984-1986) des moulières de DAMGAN - AMBON - BILLIERS (Morbihan)	La Trinité
DRV-88.008-CSRU	Bilan des perturbations phytoplanctoniques observées sur les côtes françaises en 1986.	Nantes
DRV-88.009-RA	Programme de recherche pour la mise au point d'une méthode d'élevage de la coquille Saint-Jacques en Méditerranée. Résultats obtenus en 1987.	Sète
DRV-88.010-CSRU	Influence de l'apport de la Charente sur la la qualité bactériologique des eaux de l'estuaire.	La tremblade
DRV-88.011-RA	L'élevage de l'huître creuse à Marennes-Oléron en 1987 : estimation des stocks cultivés.	La Tremblade
DRV-88.012-RA	Estimation des stocks de moules de gisements naturels dans la baie de Bourgneuf en 1986.	Bouin
DRV-88.013-RA	Diversification de la production conchylicole : cultures de palourdes sur estran.	La Tremblade
DRV-88.014-RA	Incidence du débit de la Charente sur la capacité biotique du bassin ostréicole de Marennes-Oléron.	La Tremblade
DRV-88.015-SDA	Analyse des résultats et des comportements économiques des entreprises de pêche artisanale.	Paris
DRV-88.016-RH	La pêcherie de langouste rouge en Corse.	Martinique
DRV-88.017-RH	Descriptif des flottilles et des activités halieutiques des quartiers du Sud Golfe de Gascogne, en 1986 - de Noirmoutier à Bayonne -	La Rochelle
DRV-88.018-RA	Estimation du captage en huîtres plates sur coques de moules en 1987.	La Trinité
DRV-88.019-CSRU	Etude sanitaire (1984-1986) de la rivière de Penerf (Morbihan).	La Trinité
DRV-88.020-CSRU	Etude sanitaire (1986-1988) de la zone de Kerjean en rivière de Crac'h.	La Trinité
DRV-88.021-RH	Filets, lignes et palangres utilisés en Bretagne Nord (Brest à Paimpol).	Brest
DRV-88.022-RH	Analyse typologique de la flottille du Mor-Braz	Nantes

DRV-88.023-SDA	Analyse économique de la pêche crevette de Guyane Française.	Paris
DRV-88.024-RA	Diversification de la production conchylicole. Approche d'une stratégie d'élevage de la palourde japonaise (<i>R.philippinarum</i>) dans la région de la Baie de Bourgneuf.	Bouin
DRV-88.025-RA	Estimation de la biomasse d'huitres <i>Crassostrea gigas</i> en élevage dans le bassin d'Arcachon : étés 1986-1987.	Arcachon
DRV-88.026-RH	Analyse et modélisation des composantes biologiques de la pêche crevette de Guyane Française.	Cayenne
DRV-88.027-RH	Séminaire d'initiation à la théorie et à la pratique des sondages.	Nantes
DRV-88.028-RA	Estimation de la capacité biotique des marais maritimes et des eaux côtières atlantiques; valorisation par l'aquaculture semi-extensive.	L'Houmeau
DRV-88.029-UVF	Les marinades de produits de la mer.	Nantes
DRV-88.030-RH	Utilisation de l'écho-intégration en recherche halieutique (analyse de 5 campagnes effectuées dans le Golfe de Gascogne de 1983 à 1987).	Nantes
DRV-88.031-RA	Mise au point d'une stratégie de pré-grossissement intensif en nurserie de naissains de palourdes (<i>Ruditapes philippinarum</i>) et d'huitres (<i>Crassostrea gigas</i>) dans la région de la Baie de Bourgneuf.	Bouin
DRV-88.032-RA	Surveillance écologique et halieutique Site de PENLY - Année 1987	Nantes
DRV-88.033-RH	Elevage, Pêche et Programmes d'étude des stocks du «Lambi» <i>Strombus gigas</i> (Gastéropode : Strombidae) dans deux pays de la Caraïbe : îles Turks et Caicos, Porto-Rico.	Brest
Année 1989		
DRV-89.001-RH	Chaîne de traitement des statistiques de pêche maritime.	Boulogne
DRV-89.002-CSRU	Etude sanitaire (1986-1987) de la petite mer de Gavres (Morbihan)	La Trinité
DRV-89.003-CSRU	Etude relative à la qualité des eaux conchylicoles : la Basse Normandie	Ouistreham
DRV-89.004-RA	Contrat de Plan Etat-Région Bretagne Relance de l'huître plate Rapport de synthèse 1984-1988	La Trinité/La Tremblade
DRV-89.005-RA	Contrat de Plan Etat-Région Bretagne Relance de l'huître plate Rapport d'avancement des travaux 1988	La Trinité/La Tremblade

