

A C A D É M I E D E M O N T P E L L I E R

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Université
SCIENCES NATURELLES

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROTOZOUSES
DE L'HUITRE PLATE OSTREA EDULIS LINNE, 1758.**

par

Y. PICHOT

Soutenue le 21 Novembre 1984 devant la Commission d'Examen

JURY : MM. C. VAGO Président
 G. BOUX
 J.P. TROADEC

A Simone

Stéphanie

Guilhem

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pathologie de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (Centre de Sète) et en relation avec le laboratoire de Pathologie Comparée de l'U.S.T.L. de Montpellier.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le Professeur C.VAGO qui a accepté de diriger ces recherches et a pris beaucoup de son temps pour suivre de près ces travaux.

Je remercie particulièrement :

- Monsieur M.COMPS pour les conseils précieux et l'aide qu'il m'a prodigué au cours de cette étude.

- Monsieur le Professeur G.BOUIX qui a suivi la rédaction de ce mémoire.

- Monsieur J.P. TROADEC, Directeur de l'I.F.R.E.MER qui a bien voulu accepter de juger cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Madame G.GUILLOUET qui a dactylographié ce texte et à Monsieur C.CARRIES pour son concours aux travaux photographiques.

S O M M A I R E

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| <u>CHAPITRE I - EVOLUTION DES RECHERCHES SUR LES PARASITES DES HUITRES.</u> | |
| INTRODUCTION..... | 3 |
| I - LES PROTOZOAIRES..... | 3 |
| A - <u>Les Haplosporidies</u> | 4 |
| 1 - <u>Minchinia nelsoni</u> | 4 |
| 2 - <u>Minchinia costalis</u> | 5 |
| 3 - <u>Minchinia armoricana</u> | 6 |
| 4 - <u>Haplosporidium</u> sp..... | 6 |
| 5 - Nouvelle Haplosporidie..... | 7 |
| B - <u>Parasite du genre Bonamia</u> | 7 |
| C - <u>Les Gregarines</u> | 8 |
| 1 - <u>Nematopsis ostrearum</u> | 8 |
| 2 - <u>Nematopsis prytherchi</u> | 9 |
| 3 - <u>Nematopsis</u> sp..... | 9 |
| D - <u>Les Coccidies</u> | 9 |
| E - <u>Perkinsus marinus</u> | 9 |
| F - <u>Les Marteilia</u> | 10 |
| 1 - <u>Marteilia refringens</u> | 10 |
| 2 - <u>Marteilia sydneyi</u> | 11 |
| 3 - <u>Marteilia lengehi</u> | 11 |
| G - <u>Les Microsporidies</u> | 12 |
| H - <u>Les Flagellés</u> | 12 |
| 1 - <u>Hexamita nelsoni</u> | 12 |
| 2 - <u>Hexamita inflata</u> | 13 |
| I - <u>Les Amibes</u> | 13 |
| J - <u>Les ciliés</u> | 13 |

| | |
|--|----|
| II - LES CHAMPIGNONS..... | 13 |
| A - <u>Ostracoblabe implexa</u> | 14 |
| B - <u>Sirolpidium zoophthorum</u> | 14 |
| III - LES HELMINTHES..... | 14 |
| A - <u>Les Trématodes</u> | 14 |
| B - <u>Les Cestodes</u> | 15 |
| IV - LES COPEPODES..... | 15 |
| CONCLUSION..... | 15 |

CHAPITRE II - MATERIEL ET TECHNIQUES.

| | |
|---|----|
| I - MATERIEL..... | 17 |
| A - <u>Rappel de systématique</u> | 17 |
| B - <u>Rappels sur l'anatomie de l'appareil digestif</u> | 18 |
| C - <u>Rappels sur l'histologie des tissus sains concernés</u> <u>par les infections</u> | 19 |
| 1 - L'estomac..... | 19 |
| 2 - Les canaux digestifs..... | 19 |
| 3 - Les tubules digestifs..... | 19 |
| 4 - Le tissu conjonctif..... | 20 |
| D - <u>Origine du matériel étudié</u> | 20 |
| II - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES..... | 21 |
| A - <u>Microscopie photonique</u> | 21 |
| 1 - Examens à l'état frais..... | 21 |
| 2 - Coupes à la paraffine..... | 21 |
| 3 - Coupes semi-fines..... | 22 |
| B - <u>Microscopie électronique</u> | 23 |
| III - TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE..... | 24 |

CHAPITRE III - RECHERCHES SUR MARTEILIA REFRINGENS.

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION..... | 25 |
| I - CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE PARASITE <u>MARTEILIA REFRINGENS</u> | 25 |
| A - <u>Description du parasite et de son cycle de développement</u> | 26 |
| 1 - La cellule primaire..... | 27 |
| 2 - Formes de sporulation..... | 28 |
| B - <u>Cycle de développement du parasite dans l'appareil digestif de l'huître et cycle de développement annuel</u> | 30 |
| C - <u>Position systématique</u> | 31 |
| II - RECHERCHES PERSONNELLES SUR <u>MARTEILIA REFRINGENS</u> | 33 |
| A - <u>Etude du cycle de Marteilias refringens dans l'étang de Thau</u> | 34 |
| Introduction..... | 34 |
| 1 - Protocole expérimental..... | 34 |
| 2 - Résultats..... | 35 |
| a. Cycle du parasite..... | 35 |
| b. Données ultrastructurales..... | 36 |
| Discussion-Conclusion..... | 37 |
| B - <u>Etude des effets pathogènes du parasite</u> | 38 |
| Introduction..... | 38 |
| 1 - Aspects histopathologiques..... | 39 |
| 2 - Aspects biochimiques..... | 41 |
| a. Matériel et techniques..... | 41 |
| b. Résultats..... | 42 |
| Discussion-Conclusion..... | 43 |
| C - <u>Etude de cas de prolifération hémocytaires atypiques associées à la parasitose</u> | 44 |
| Introduction..... | 44 |
| 1 - Rappels bibliographiques sur les hyperplasies hémocytaires atypiques des mollusques bivalves marins.. | 45 |

| | |
|---|----|
| 2 - Observations en microscopie photonique..... | 48 |
| a. Données histologiques..... | 48 |
| b. Données cytologiques : forme et taille ; structure..... | 49 |
| 3 - Microscopie électronique..... | 50 |
| a. Morphologie des hémocytes..... | 50 |
| b. Le cytoplasme..... | 50 |
| c. Le noyau : ultrastructure ; particularités du noyau..... | 51 |
| Discussion-Conclusion..... | 52 |
| D - <u>Etude d'un cas d'hyperparasitisme de <i>Marteilia refrin-</i></u> <u><i>gens</i> par une Microsporidie <i>Nosema ormieresi</i></u> | 54 |
| Introduction..... | 54 |
| 1 - Description du parasite..... | 55 |
| a. Microscopie photonique..... | 55 |
| b. Microscopie électronique : cycle de dévelop- pement ; la spore..... | 56 |
| 2 - Données taxonomiques..... | 58 |
| 3 - Effets pathogènes de <u><i>Nosema ormieresi</i></u> sur <u><i>Marteilia</i></u> <u><i>refringens</i></u> | 58 |
| Discussion-Conclusion..... | 59 |
| CONCLUSION..... | 60 |
| | |
| <u>CHAPITRE IV - RECHERCHES SUR UNE HAPLOSPORIDIE <i>HAPLOSPORIDIUM ARMORI-</i></u> <u><i>CANUM</i> PARASITE D'<i>OSTREA EDULIS</i> DU BASSIN D'ARCACHON</u> | |
| INTRODUCTION..... | 61 |
| I - EXAMENS SUR LE FRAIS..... | 62 |
| II - ETUDE DE L'INFESTATION EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE..... | 62 |
| A - <u>Localisation du parasite</u> | 62 |
| B - <u>Les formes parasitaires</u> | 63 |
| III - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU PARASITE..... | 64 |
| A - <u>Description des formes plasmodiales</u> | 65 |

| | |
|--|----|
| B - <u>Sporontes et formation des sporoblastes</u> | 66 |
| C - <u>Sporocystes et formation des spores</u> | 67 |
| D - <u>Description de la spore</u> | 68 |
| 1 - Le sporoplasme..... | 68 |
| a. La sphérule..... | 69 |
| b. Le noyau..... | 69 |
| c. Les haplosporosomes..... | 69 |
| d. Les mitochondries..... | 70 |
| e. Les corps denses..... | 70 |
| f. Les autres organites..... | 70 |
| 2 - La paroi, l'opercule et les filaments..... | 71 |
| 3 - L'extraporoplasme..... | 72 |
| IV - ASPECTS PARTICULIERS DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU PARASITE..... | 72 |
| V - EFFETS HISTOPATHOGENES DU PARASITE..... | 75 |
| VI - IMPLICATIONS TAXONOMIQUES..... | 78 |
| CONCLUSION..... | 81 |

CHAPITRE V - PATHOGENESE DES PARASITOSES A MARTEILIA REFRINGENS ET A
HAPLOSPORIDIUM ARMORICANUM DE L'HUITRE PLATE OSTREA EDULIS

| | |
|--------------------------------------|----|
| INTRODUCTION..... | 83 |
| I - ELEMENTS LIES AUX PARASITES..... | 84 |
| II - ELEMENTS LIES A L'HOTE..... | 86 |
| III - ELEMENTS LIES AU MILIEU..... | 87 |
| CONCLUSION..... | 87 |
| RESUME ET CONCLUSION GENERALE..... | 89 |

BIBLIOGRAPHIE

PLANCHES

INTRODUCTION

L'ostréiculture française, qui représente une part importante de la conchyliculture pratiquée sur les côtes de la Manche, de l'Atlantique et de la Méditerranée, n'a commencé à se développer de façon importante qu'au milieu du siècle dernier.

Depuis cette époque de nombreux efforts ont été faits pour préserver et améliorer la production ostréicole aussi bien sur le plan quantitatif que sur celui qualitatif. On peut citer à titre d'exemple parmi les travaux récents dans ce domaine, les tentatives d'implantation de la conchyliculture en mer sur le littoral du golfe du Lion, l'étude des possibilités d'acclimatation d'espèces dans des zones nouvelles ou enfin les recherches sur la génétique de ces mollusques visant à une meilleure gestion des populations.

Toutefois, ces efforts se sont heurtés fréquemment à des difficultés liées à l'état zoosanitaire des animaux. Des épizooties ont ainsi anéanti des parties importantes du cheptel français. Ce fut le cas en 1970 avec la disparition de l'huître portugaise consécutivement à une maladie d'origine virale, ou encore plus récemment avec la diminution rapide du stock d'huîtres plates causée par les parasitoses dues à Marteilia refringens et à Bonamia ostreae.

Ces évènements ont conduit depuis quelques années à mettre l'accent sur l'étude des maladies des huîtres, avec pour objectif principal d'élaborer et de prendre des mesures susceptibles d'en limiter les effets, sinon de les prévenir.

C'est dans ce cadre que nous avons effectué un ensemble de recherches sur deux parasitoses de l'huître plate dont les résultats sont présentés dans le présent mémoire.

La première de ces infections est celle de la glande digestive causée par Marteilia refringens. Sur cette maladie ont été réalisées, l'étude expérimentale du cycle du parasite dans un biotope particulier l'étang

de Thau, l'étude de ses effets pathogènes sous ses aspects histologiques et biochimiques, l'étude de proliférations hémocytaires atypiques associées à la parasitose et enfin l'étude d'un cas d'hyperparasitisme de M.refringens par une Microsporidie N.ormieresi.

Pour la deuxième parasitose due à une Haplosporidie Haplosporidium armoricanum, nous avons développé, particulièrement en microscopie électronique, l'étude du cycle et les caractères de la spore du protiste, puis discuté de la sporogénèse en la comparant avec celle d'Haplosporidies parasites de mollusques bivalves et autres invertébrés marins. Simultanément les effets histopathologiques d'H.armoricanum vis à vis de l'huître ont été décrits. Enfin suite à nos recherches nous avons discuté des implications taxonomiques qui en résultent.

Dans un dernier chapitre sont évoqués et discutés certains aspects relatifs à la pathogénèse et aux relations entre les parasites étudiés et leur hôte commun l'huître plate O.edulis. Le lien avec d'autres Protozooses connues chez les huîtres est également traité.

CHAPITRE I

EVOLUTION DES RECHERCHES SUR LES PARASITES

DES HUITRES

INTRODUCTION.

Les huîtres, qu'elles constituent des stocks naturels ou qu'elles fassent l'objet d'un élevage intensif, sont fréquemment atteintes par des maladies pouvant entraîner des mortalités.

A côté d'affections provoquées par des pollutions ou par des modifications importantes des facteurs physico-chimiques du milieu tels que la température et la salinité, se développent des épizooties imputables à des infections bactériennes, virales ou encore causées par des parasites divers.

Les parasitoses les plus importantes, dont certaines ont fait l'objet de monographies (SINDERMANN et ROSENFELD, 1967 ; SPRAGUE, 1970, 1971 ; ROSENFELD, 1971) sont dues en majorité à des Protozoaires. Diverses affections de moindre gravité ont été par ailleurs d'origine fongique ou mises en relation avec le développement d'helminthes et de crustacés copépodes.

I - LES PROTOZOAIREs.

Les Protozoaires parasites des huîtres comprennent des Haplosporidies, des Gregarines, des Coccidies, des Microsporidies, des Flagellés, des Amibes et des Ciliés. Peuvent être également rattachés aux Protozoaires des parasites nouveaux des genres Marteilia GRIZEL, COMPS, BONAMI, COUSSERANS, DUTHOIT et LE PENNEC, 1974 et Bonamia PICHOT, COMPS, GRIZEL et RABOIN, 1979 dont la position systématique fait encore actuellement l'objet de mise au point. Enfin dans cet embranchement doit figurer un parasite particulier Perkinsus marinus LEVINE, 1978 longtemps considéré comme un champignon, mais aujourd'hui inclus dans les Protozoaires.

A - Les Haplosporidies.

Bien que de nombreux protistes du groupe des Haplosporidies créé par CAULLERY et MESNIL en 1899, aient été signalés chez les mollusques bivalves marins, cinq espèces seulement l'ont été chez les huîtres. Parmi celles-ci deux touchèrent l'huître Américaine Crassostrea virginica GMELIN, 1791 dont elles décimèrent les populations de la côte Est des Etats-Unis ; elles appartiennent toutes les deux au genre Minchinia LABBE, 1896. De nombreuses bibliographies, dont nous faisons état ici, se rapportant à ces deux parasites, étant établies sous la dénomination du genre Minchinia, nous conserverons pour eux leur appartenance à ce genre, bien qu'ils aient été, dans une récente révision de la taxonomie des Haplosporidies faite par SPRAGUE (1978) redésignés sous le nom générique de Haplosporidium C. et M., 1899. Il s'agit de Minchinia nelsoni HASKIN, STAUBER et MACKIN, 1966 et de Minchinia costalis (WOOD et ANDREWS, 1962) SPRAGUE, 1963. Les trois autres ont été mises en évidence chez l'huître plate Ostrea edulis LINNE, 1758 : ce sont d'une part Minchinia armoricana VAN BANNING, 1977 et Haplosporidium sp. PICHOT, COMPS et DELTREIL, 1979 et d'autre part une nouvelle Haplosporidie non rattachée à un genre existant (VIVARES et al., 1982). On peut signaler ici une autre Haplosporidie du genre Urosporidium C. et M., 1905 signalée chez Ostrea lutaria HUTTON de Nouvelle Zélande, mais il s'agit là d'un cas d'hyperparasitisme rapporté par HOWELL (1967).

1 - Minchinia nelsoni HASKIN, STAUBER et MACKIN, 1966.

Initialement nommée MSX (Multinucleate Sphere X) par MACKIN (1960) cette Haplosporidie est responsable des importantes mortalités de l'huître américaine de la baie Delaware (New Jersey) en 1957 (HASKIN et al., 1966) et des estuaires de York River et James River (Virginie) en 1959 (COUCH, 1967 ; ANDREWS et WOOD, 1967). Par la suite la parasitose s'étendit à la baie Chincoteague (Virginie) en 1965 (COUCH et al., 1966) puis à l'Eastern Shore de Virginie (PERKINS, 1969) et à l'ensemble de la baie Chesapeake en particulier entre 1959 et 1963 (ANDREWS, 1966) et ultérieurement jusqu'en 1968 (FARLEY, 1975).

A la suite de son identification, furent décrits ses stades plasmodiaux (HASKIN et al., 1966) puis sa sporulation (COUCH et al., 1966).

FARLEY (1967) proposa un cycle de développement de ce parasite.

Les premiers stades du cycle sont représentés par des cellules uninucléées amiboïdes qui par mitoses successives deviennent des plasmodes à 16 noyaux ou plus. Ceux-ci prolifèrent par plasmotomie. Après cette première phase asexuée intervient une phase sexuée. Chaque plasmode précédemment formé s'accroît en taille et subit une plasmotomie irrégulière qui conduit à la production de petits plasmodes en général multinucléés. Ceux-ci considérés comme des plasmodes gamétiques s'aggrègent et se fondent donnant un stade prozygote. Dans ces plasmodes les noyaux d'abord apariés, fusionnent prenant une membrane commune. Après passage par un stade en synkaryon avec noyaux probablement diploïdes, puis meïoses successives les plasmodes deviennent des sporontes avec sporoblastes qui évoluent en sporocystes avec spores.

Par la suite fut précisée l'ultrastructure, d'une part des plasmodes et des spores de ce Protozoaire (PERKINS, 1968) et d'autre part de l'appareil mitotique intranucléaire ou Kernstab (PERKINS, 1975 a), constitué d'un réseau de microtubules situé entre les plaques centriolaires des noyaux.

Parallèlement à ces travaux sur la sporogénèse de M.nelsoni, de nombreuses études épidémiologiques sur ce parasite furent conduites notamment par ANDREWS (1966 ; 1976 ; 1979) et par FARLEY (1968 ; 1975) et dernièrement par FORD et HASKIN (1982). De celles-ci on peut résumer que l'action pathogène de M.nelsoni s'exerce durant toute l'année, avec une intensité maximale durant les mois chauds (de juin à septembre), alors que l'infection des huîtres aurait lieu de mai à novembre. Quant à la localisation dans l'hôte elle est essentiellement limitée à l'épithélium des tubules digestifs.

2 - Minchinia costalis (WOOD et ANDREWS, 1962) SPRAGUE, 1963.

D'abord appelé SSO (Seaside Organism) ce parasite fut comme M.nelsoni responsable des mortalités de C.virginica qui se déclarèrent en 1959 sur la côte Atlantique de l'Eastern Shore (Virginie) aux Etats-Unis (ANDREWS et al., 1962). Ce parasite était encore actif en 1978 dans cette région (ANDREWS et CASTAGNA, 1978). Identifié comme Haplosporidium costale WOOD et ANDREWS, 1962 (WOOD et ANDREWS, 1962) il fut après la révision du genre Haplosporidium et restitution du genre Minchinia (SPRAGUE, 1963 a), nommé Minchinia costalis. Les travaux sur cette espèce sont moins nombreux

que ceux effectués sur M.nelsoni. Toutefois sa sporulation fut étudiée en microscopie photonique par WOOD et ANDREWS (1962) et COUCH (1967) et en microscopie électronique par PERKINS (1969).

Les modalités d'infestation ont été établies par ANDREWS et CASTAGNA (1978) et ANDREWS (1979). Limité aux eaux de forte salinité, ce parasite est responsable de mortalités en mai et en juin. Il est localisé durant l'infection dans tous les tissus de l'huître.

3 - Minchinia armoricana VAN BANNING, 1977.

Cette Haplosporidie a été mise en évidence pour la première fois en Hollande dans des lots d'huîtres plates importés entre 1974 et 1976 de Bretagne (VAN BANNING, 1977). Elle a encore été observée en 1979 chez la même espèce d'huître de Bretagne (CAHOUR et al., 1980). L'ultrastructure de sa spore, qui par ailleurs présente sur squashes de matériel frais deux prolongements cytoplasmiques en forme de queues a été décrite par VAN BANNING (1977 ; 1979) alors que son cycle de développement n'a été précisé qu'à la suite d'une étude en microscopie électronique par CAHOUR et al., (1980). Ce parasite localisé dans le tissu interstitiel et au niveau des branchies de l'huître n'a eu jusqu'à ce jour qu'un rôle pathogène très réduit. Toutefois de par son cycle de développement et les caractéristiques de sa spore, il a été classé parmi les Haplosporidies et rapproché du genre Minchinia, dont deux espèces M.nelsoni et M.costalis ont été comme nous l'avons vu responsable d'importantes épizooties aux U.S.A.. M.armoricana constitue donc pour les élevages d'huîtres plates français un risque potentiel important.

4 - Haplosporidium sp. PICHOT, COMPS et DELTREIL, 1979.

Ce parasite trouvé chez des huîtres plates natives du bassin d'Arcachon (PICHOT et al., 1979 b) est le seul du genre Haplosporidium observé chez les huîtres. Il fait dans notre travail l'objet d'une étude détaillée.

5 - Nouvelle Haplosporidie.

Il convient de signaler ici une autre Haplosporidie mise en évidence chez l'huître O.edulis de Bretagne (VIVARES et al., 1982). Localisée dans la glande digestive et l'épithélium branchial, sa présence est accompagnée d'une importante infiltration leucocytaire du tissu interstitiel. Son cycle présente de petites formes ovoïdes de 4 à 5 μm , binucléées, et des plasmodes plus grands de 20 μm de diamètre environ à plusieurs diplocaryons. Le cytoplasme des plasmodes, limité par une paroi festonnée, renferme des mitochondries entourées par une lamelle ergastoplasmique, des haplosporosomes allongés ainsi que des particules d'allure virale. Aucune forme sporale n'a été observée.

B - Parasite du genre Bonamia PICHOT, COMPS, TIGE, GRIZEL et RABOUIN, 1979.

C'est au cours de l'été 1979, que fut observé pour la première fois, chez des huîtres plates de l'Ile Tudy de Bretagne (COMPS et al., 1980) un parasite nouveau dont les caractéristiques amenèrent PICHOT et al.(1979 a) à créer pour lui le genre Bonamia et l'espèce Bonamia ostreae PICHOT, COMPS, TIGE, GRIZEL et RABOUIN, 1979. Les recherches systématiques entreprises alors, permirent de constater la présence de ce parasite dans plusieurs autres centres ostréicoles de Bretagne. CAHOUR et al.(1980), le signalent dans l'Elorn et l'Aber Benoît. TIGE et al. (1980) retrouvent ce parasite chez des huîtres de Cancale, Saint Briec, Paimpol, Morlaix et en rivière d'Etel. Selon ces auteurs, la région des Abers, le Golfe du Morbihan et le secteur du Croisic sont également touchés par la parasitose. PICHOT et al.(1979 a) le signalent également en Normandie et dans la baie d'Arcachon. Son développement reste par la suite important en 1980 (TIGE et al., 1981), 1981 (TIGE et al., 1982) et les premiers mois de 1982, puis régresse vers la fin de cette dernière année (GRIZEL, communication personnelle).

Dans les travaux consacrés à l'étude du parasite (PICHOT et al., 1979 a ; CAHOUR et al., 1980 ; COMPS, 1983) B.ostreae est présenté comme un organisme essentiellement intracellulaire, phagocyté par les hémocytes de l'huître. Il est localisé dans le tissu interstitiel mais aussi dans les tissus nécrosés des branchies, ainsi que dans l'épithélium stomacal. Sa présence est accompagnée d'une importante réaction hémocytaire.

En microscopie électronique les formes parasitaires regroupées en "formes denses" et "formes claires" (PICHOT et al., 1979 a) renferment dans leur cytoplasme au côté du noyau, des mitochondries, des haplosporosomes, parfois un corps dense non structuré, et pour les "formes claires" des formations membranaires assimilables à un appareil de Golgi.

La mise en évidence de formes parasitaires unies et binucléées (CAHOUR et al., 1980), l'observation de différentes phases de division suivant un mode reconnu chez les Minchinia (PICHOT et al., 1979 a) et l'existence de plasmodes plurinucléés (BREHELIN et al., 1982) ont amené ces différents auteurs à rapprocher B.ostreae des Haplosporidies.

C - Les Gregarines.

Ces Protozoaires sont représentés comme parasites des huîtres par trois espèces appartenant au genre Nematopsis SCHNEIDER, 1892.

1 - Nematopsis ostrearum PRYTHERCH, 1938.

Identifiée par PRYTHERCH au cours des mortalités de C.virginica qui sévirent sur la côte Atlantique des Etats-Unis en Virginie et en Louisiane en 1938, elle a été considérée comme responsable de ces épizooties. Ce rôle fut par la suite infirmé en particulier par SPRAGUE (1949), SPRAGUE et ORR (1955) et OWEN et al. (1952).

Le cycle de ce parasite est hétéroxène. Il se développe en partie chez le mollusque et en partie chez un crabe. La phase végétative du développement du parasite qui se réalise chez le crabe aboutit à la formation de gymnospires qui sont éliminées dans le milieu. Chez l'huître a lieu la phase sporogonique. Les gymnospires absorbées par filtration de l'eau de mer s'individualisent en sporozoïtes qui s'entourant d'une enveloppe deviennent des spores. Celles-ci sont localisées dans la glande digestive, les palpes labiaux, les branchies, le coeur, le manteau et le muscle adducteur du bivalve. Le cycle recommence après qu'un crabe ait mangé l'huître infestée.

2 - Nematopsis prytherchi SPRAGUE, 1949.

Cette Gregarine parasite elle-aussi C.virginica. Ses spores sont surtout localisées dans les branchies et la glande digestive de l'huître (SPRAGUE et ORR, 1955).

3 - Nematopsis sp. COMPS, GRIZEL et TIGE, 1972.

Cette espèce fut découverte chez C.rhizophorae GUILDING de la Guyane Française, par COMPS et al. (1972). Pour ce Protozoaire aucun rôle pathogène important n'a été observé.

D - Les Coccidies.

Deux cas de parasitisme chez les huîtres par ces Sporozoaires ont été signalés. Le premier par COMPS et al. (1973), dans des naissains de Crassostrea gigas THUNBERG, 1793 du bassin de Marennes-Oléron, le second par TIGE et al. (1977), chez O.edulis de la rivière d'Auray (Bretagne sud) où le Protozoaire était localisé dans le rein de l'hôte. Dans les deux cas l'action du parasite est réduite, aucune lésion importante des tissus n'étant observée.

E - Perkinsus marinus LEVINE, 1978.

C'est au cours des mortalités de C.virginica sur la côte Atlantique des États-Unis que fut isolé et décrit ce Protozoaire par MACKIN et al. (1950). Le rapprochant des champignons inférieurs, ces auteurs le nommèrent Dermocystidium marinum MACKIN, OWEN et COLLIER, 1950. Ultérieurement MACKIN et RAY (1966) le rattachèrent aux Labyrinthulales le dénommant Labyrinthomyxa marina MACKIN et RAY, 1966. Enfin à la suite des travaux de PERKINS (1976 b), qui inclue le parasite dans les Protozoaires, LEVINE (1978) créa pour lui le genre Perkinsus LEVINE, 1978, avec la nouvelle combinaison d'espèce Perkinsus marinus.

Responsable d'importantes mortalités, il fut l'objet de recherches qui fournirent des éléments sur son cycle de développement (MACKIN et BOS-

WELL, 1956) et sur les caractéristiques de ses spores (PERKINS et MENZEL, 1967 ; PERKINS, 1976 b).

La parasitose commence par l'invasion du tissu conjonctif des palpes labiaux, du manteau et de l'épithélium digestif. Par la suite le parasite est éliminé dans le tube digestif et peut gagner les sinus sanguins, l'infection peut enfin se généraliser au muscle adducteur et au tissu cardiaque provoquant la mort de l'hôte. Ce développement de l'infection peut cependant être modifié par deux facteurs : température et salinité. Une augmentation de la première au-dessus de 25° C le favorise, alors qu'une diminution de la seconde au-dessous de 15‰ le retarde.

Outre l'infection de C.virginica, Perkinsus marinus a été mis en évidence chez plusieurs autres espèces d'huîtres dont O.frons LINNE de Floride et O.equestris SAY du Texas, et plus récemment dans des huîtres du Mississippi (OGLE et FLURRY, 1980).

F - Les Marteilia.

De création récente le genre Marteilia comprend aujourd'hui plusieurs espèces parasites de l'épithélium digestif des huîtres.

- 1 - Marteilia refringens GRIZEL, COMPS, BONAMI, COUSSERANS, DUTHOIT et LE PENNEC, 1974.

Ce parasite est responsable de la maladie de la glande digestive de l'huître plate qui causa d'importantes mortalités de cette espèce en 1968 dans l'Aber Wrach sur la côte Nord-Ouest de Bretagne. Cette parasitose toucha rapidement la plupart des centres français de culture d'Ostrea edulis. En effet après avoir été mis en évidence en 1969, d'une part dans le bassin de Marennes (COMPS, 1970 a) et d'autre part simultanément dans les Abers Wrach et Benoit, la rade de Brest et le Bassin d'Arcachon (HERRBACH, 1971) ce parasite a été retrouvé par la suite tout le long des côtes Bretonnes : en 1972, dans l'estuaire de la Penzé (GRIZEL et TIGE, 1973) en 1973, en rivière de Morlaix et Rade de Brest (TIGE et MOREL, 1974) enfin en 1974 et 1975, à Paimpol et Binic ainsi que dans les rivières d'Auray, de Saint Philibert et de Crach (GRIZEL et al., 1976). Les infections demeuraient

encore dans la plupart de ces centres en 1976 et 1977 (GRIZEL, 1979). Il a enfin été trouvé en Corse (FRANC, 1980).

A l'étranger Marteilia refringens a été signalé suite à des exportations d'huîtres françaises, en Espagne, sur la pointe Nord-Ouest dès 1970 (HERRBACH, 1971) et encore en 1975 (ALDERMAN, 1979) ainsi qu'en Hollande (VAN BANNING, 1979). Cependant dans les élevages de ce dernier pays le parasite ne présenta pas d'extension importante comme ce fut le cas en France ou en Espagne.

Si Ostrea edulis semble être l'hôte principal de M.refringens, le parasite a cependant été aussi reconnu chez C.gigas de Bretagne en 1977 (CAHOUR, 1979).

L'important rôle pathogène de cette espèce, a amené que de nombreux travaux y soient consacrés tant en ce qui concerne son ultrastructure que son cycle de développement et sa position systématique.

Nous reviendrons en détail sur ces différents points, dans le chapitre consacré à nos recherches sur ce parasite.

2 - Marteilia sydneyi PERKINS et WOLF, 1976.

Identifié par WOLF (1972), chez Crassostrea commercialis IREDALE et ROUGHELY de la baie Moreton en Australie, son ultrastructure a été décrite par PERKINS et WOLF (1976), ainsi que son cycle de développement et son écologie par WOLF (1979).

Marteilia sydneyi se distingue de M.refringens par plusieurs caractères. Chez le pathogène de C.commercialis, les inclusions striées ne sont pas formées dans le plasmode comme c'est le cas chez l'agent d'O.edulis, le sporangiosore contient 8 à 16 sporanges au lieu de 8 chez M.refringens, et les sporanges ont 2 ou 3 spores contre 4 chez le pathogène de l'huître plate. Enfin les spores de M.sydneyi possèdent une couche de membranes concentriques autour des spores matures, de telles formations n'étant pas observées chez M.refringens.

3 - Marteilia lengehi COMPS, 1977.

Cette espèce a été mise en évidence chez des huîtres Crassostrea cucullata BORN du Golfe Persique (COMPS, 1977).

G - Les Microsporidies.

Le premier cas d'infection d'huître par une Microsporidie a été signalé dans les ovaires d'Ostrea edulis de Marennes (France) par LEGER et HOLLANDE (1917). Il était dû à Chytridiopsis ovicola LEGER et HOLLANDE, 1917. Cette Microsporidie a été classée récemment dans un nouveau genre Steinhausia SPRAGUE, ORMIERES et MANIER, 1972 créé pour les espèces rencontrées chez les mollusques (SPRAGUE et al., 1972).

Un second cas a par la suite été mis en évidence par JONES (1981) chez O.lutaria de Nouvelle Zélande. Il s'agit d'une espèce nouvelle Microsporidium rapuae JONES, 1981 dont les petits cystes sont localisés dans le tissu conjonctif jouxtant l'intestin de l'hôte.

Les autres Microsporidies mises en évidence l'ont été dans des cas d'hyperparasitisme : elles appartiennent au genre Nosema NAEGELI, 1857. Il s'agit d'une part de N.dollfusi SPRAGUE, 1964 trouvé chez Crassostrea virginica (SPRAGUE, 1964) et d'autre part de N.ormieresi COMPS, PICHOT et DELTREIL, 1979 hyperparasite de Marteilia refringens agent de la maladie de la glande digestive d'O.edulis (COMPS et al., 1979).

Cette dernière Microsporidie est étudiée dans le présent travail.

H - Les Flagellés.

Bien qu'aucun rôle pathogène sérieux ne soit accordé à ces Protozoaires, leur présence est fréquente chez les huîtres en particulier lorsqu'elles sont déjà atteintes d'autres affections. Deux espèces de ces parasites sont connues, elles appartiennent au genre Hexamita DUJARDIN, 1841, zooflagellé de forme ovale, à 8 flagelles dont 6 à sa partie antérieure.

1 - Hexamita nelsoni SCHLICHT et MACKIN, 1968.

Elle parasite les huîtres du genre Crassostrea (virginica, gigas, commercialis) et celles du genre Ostrea. Chez ces dernières elle a été signalée chez O.edulis en Hollande (MACKIN et al., 1952) et O.lurida, CARPENTER, aux Etats-Unis (STEIN et al., 1961).

2 - Hexamita inflata CERTES, 1882.

Découvert par CERTES en 1882 dans la glande digestive d'huîtres plates, ce flagellé a été observé par la suite chez Crassostrea virginica en Hollande et aux Etats-Unis (MAKIN et al., 1952) puis chez la plupart des espèces des côtes Françaises (O.edulis, C.angulata LAMARCK et C.gigas) autour des années 1960. Il a été aussi mis en évidence dans les huîtres du Pacifique de Corée et Taiwan.

I - Les Amibes.

Deux espèces ont été décrites chez C.virginica dont elles parasitent l'estomac et l'intestin. Elles appartiennent au genre Flabellula SCHAEFFER, 1926. Mises en évidence par HOGUE en 1914 et en 1921 il s'agit de F.calkensi (HOGUE, 1915) SCHAEFFER, 1926 et de F.patuxent, (HOGUE, 1921) SCHAEFFER, 1926. Aucun rôle pathogène n'est attribué à ces parasites.

J - Les Ciliés.

Bien que de nombreuses espèces aient été identifiées, les plus importantes sont Orchitophrya stellarum CEPEDE, 1911 parasite de C.virginica de l'Ile du Prince Edouard au Canada (LAIRD, 1951) et Ancistrocoma pelseneeri CHATTON et LOWFF, 1926 observée par MACKIN (1962) chez des huîtres de la côte Atlantique des Etats-Unis.

II - LES CHAMPIGNONS.

Un grand nombre de parasites de nature fongique a été décelé chez les huîtres et deux en particulier les affectèrent de manière importante. Ce sont Ostracoblabe implexa BORNET et FLAHAULT, 1889 et Sirolopidium zoophthorum VISHNIAC, 1955.

Nous mentionnerons ici pour mémoire, également Labyrinthomyxa marina (= Dermocystidium marina) longtemps considéré comme ayant des affinités fongiques, mais depuis peu reclassé dans les Protozoaires en tant que Perkinsus marinus

comme nous l'avons évoqué précédemment.

A - Ostracoblabe implexa BORNET et FLAHAULT, 1889.

Ce champignon dont le rôle a été précisé récemment par ALDERMAN et JONES (1971) est apparu dans les populations d'Ostrea edulis et de Crassostrea angulata chez qui il causa la "maladie du pied" encore connue sous le nom de "maladie de la coquille" ou "de la charnière". Signalé exclusivement en Europe, il sévit chez O. edulis dès 1878 en France à Arcachon, puis en Hollande entre 1902 et 1930 et à nouveau en France, en Bretagne entre 1947 et 1960. L'affection à son stade extrême de gravité est caractérisée par une sécrétion anormale de la coquille provoquant la formation d'excroissances ou un épaissement du bord des valves entraînant une réduction du volume intervalvaire.

B - Sirolopidium zoophthorum VISHNIAC, 1955.

DAVIS et al. (1954) le décelèrent dans des larves de C. virginica élevées en laboratoire dont il provoqua des mortalités.

III - LES HELMINTHES.

Les vers parasites sont représentés par des Trématodes et des Cestodes dont les larves envahissent les huîtres.

A - Les Trématodes.

Comme c'est le cas pour les Gregarines du genre Nematopsis, l'huître ne représente pour ces Helminthes qu'un hôte intermédiaire, leur cycle étant hétéroxène. Bucephalus haimeanus LACAZE - DUTHIERS, 1854 a été décelé chez O. edulis de Méditerranée et B. cuculus Mc. CRADY, 1873 chez C. virginica de Caroline du sud.

Les sporocystes de ces vers, où se développent les cercaires, pénètrent la plupart des organes de l'huîtres et peuvent entraîner la castration de l'hôte.

B - Les Cestodes.

Un seul genre, Tylocephalum LINTON, 1890 a été identifié chez C.virginica. Ce sont les larves ciliées ou Coracidium du parasite qui sont ingérées par les huîtres.

IV - LES COPEPODES.

La présence de ces crustacés n'a généralement que peu d'effet sur l'hôte. Dans la plupart des cas, ils ne provoquent qu'un amaigrissement des sujets infestés.

De nombreuses espèces parasitent les huîtres. Parmi celles retenues par MARTEIL (1976) on peut signaler : Mytilicola intestinalis STEUER, 1902 dont la forme est celle d'un ver de 3 à 8 mm, chez O.edulis ; M.orientalis MORI, 1935 chez C.gigas et chez C.lurida ; Ostrincola gracilis WILSON, 1944 chez C.virginica ; Pseudomyicola ostreae YAMAGUTI, 1936 chez O.denselamellosa LISCHKE.

Enfin une autre espèce, Pseudomyicola sp. COMPS, 1972 a été mise en évidence chez C.angulata du Bassin de Marennes-Oléron (COMPS, 1972).

CONCLUSION.

De l'ensemble des données bibliographiques relatives aux parasites des huîtres, il apparaît en premier lieu que les infestations ont des actions très diverses sur l'organisme hôte. On peut observer en effet que certains parasites sont mis en évidence dans les tissus de l'huître sans qu'aucun effet pathogène ne soit associé à leur présence. D'autres ont une action sur l'hôte limitée. Mais dans de nombreux cas, les parasitoses, parmi lesquelles on peut noter la prédominance des protozooses provoquent des mortalités pouvant avoir pour conséquence la destruction presque complète d'espèces d'huîtres qui font l'objet d'une culture intensive. Parmi les graves épizooties on peut signaler celles dues à deux Haplosporidies, Minchinia nelsoni, et M.costalis qui ont été responsables dans les années 1960 aux Etats Unis de fortes mortalités de Crassostrea virginica, celles dues à Marteilia refringens et Bonamia ostreae qui ont détruit les populations d'O.edulis des côtes Atlantiques et Bretonnes en France, et enfin celle due à Perkinsus marinus qui a sévi chez C.virginica

aux Etats-Unis. Enfin des parasites sont identifiés au cours de mortalités sans que leur rôle dans celles-ci ne soit établi.

En second lieu, il apparaît que les recherches sur les parasites des huîtres sont directement liées au pouvoir pathogène de ceux-ci, tel que nous venons de l'aborder. C'est ainsi qu'actuellement l'essentiel des travaux est mené sur les agents responsables de mortalités c'est-à-dire les Haplosporidies, Marteilia et Bonamia, et sur les espèces voisines mises en évidence, puisque présentant un risque potentiel important pour l'ostréiculture.

Enfin l'évolution des recherches est également marquée par la connaissance de plus en plus précise des parasites grâce à l'application systématique d'études en microscopie électronique.

CHAPITRE II

MATERIEL ET TECHNIQUES.

I - MATERIEL.

Les infections parasitaires qui font l'objet de notre travail ayant toutes pour site de développement la masse digestive de l'huître, nous limiterons la présentation de l'hôte, après avoir évoqué sa position systématique, à des rappels sur l'anatomie de l'appareil digestif et sur l'histologie des différentes parties de ce dernier concernées par les parasitoses. L'origine du matériel étudié sera précisée.

A - Rappel de systématique.

L'huître Ostrea edulis LINNE, 1758 ou l'huître plate européenne est un Mollusque Lamelibranche (ou Bivalve) dont la position systématique d'après FRANC (1960) est la suivante :

| | |
|---------------|---------------------|
| Embranchement | Mollusques |
| Classe | Lamellibranches |
| Ordre | <u>Filibranchia</u> |
| Sous-ordre | <u>Anisomyaria</u> |
| Super famille | <u>Ostreoidea</u> |
| Famille | <u>Ostreidae</u> |

La famille des Ostreidae comprend selon RANSON (1948) trois genres, Pycnodonta FISHER de WALDHEIM, 1835, Crassostrea SACCO, 1897 et Ostrea LINNE, 1758 identifiables d'après les caractères de la charnière ou provinculum de la prodissoconque ou coquille larvaire.

Ostrea edulis est l'espèce type du genre Ostrea. Au stade adulte elle est caractérisée par :

- une valve droite ou supérieure sans nervure et à nombreuses lamelles concentriques, plus petite que la valve gauche ou inférieure qui possède entre 20 et 30 nervures et des lamelles concentriques irrégulières,
- le bec de la valve inférieure peu développé,
- un ligament interne en trois parties dont la médiane est plate sur la valve gauche et forme une projection sur la valve droite.

B - Rappels sur l'anatomie de l'appareil digestif.

Localisé dans la partie antérieure de l'huître (qui est celle où se situe la charnière), l'appareil digestif (PL. I, Fig. 1) débute par une bouche étroite située entre deux paires de palpes labiaux qui l'entourent complètement. A la bouche fait suite un court oesophage, comprimé dorso-ventralement, qui s'ouvre dans l'estomac.

Cet organe piriforme est situé au centre d'un amas tissulaire autrefois appelé "glande digestive" et nommé, depuis les travaux de YONGE (1926 a) "masse digestive" ou "diverticules digestifs" (digestive diverticula de YONGE).

Les diverticules digestifs (PL. I, Fig. 2) sont formés de très nombreux tubules digestifs reliés par l'intermédiaire de conduits secondaires à des canaux digestifs principaux. Les ramifications de ces canaux s'unissent en deux troncs qui débouchent dans l'estomac. Tubules et canaux digestifs sont inclus dans du tissu conjonctif vésiculaire.

A l'estomac, sont associés le coecum et le sac du stylet cristallin. Le coecum issu de la chambre antérieure de l'estomac après avoir formé un coude dans la masse des diverticules digestifs aboutit à l'intestin au niveau où celui-ci sort de l'estomac. Le sac du stylet émerge quant à lui de la chambre postérieure de l'estomac et voisine sur toute sa longueur avec une partie de l'intestin. Sa cavité qui est en communication avec la lumière intestinale, renferme le stylet cristallin qui fait saillie dans l'estomac jusqu'au niveau de la cuticule gastrique.

L'appareil digestif se poursuit par un intestin long qui forme une boucle complexe autour de l'estomac et se termine après un court rectum par l'anus qui s'ouvre dans la chambre exhalante située au-dessus du muscle adducteur de l'huître.

C - Rappels sur l'histologie des tissus sains concernés par les infections.

1 - L'estomac.

La paroi stomacale, dont la face interne forme un grand nombre de crêtes et de sillons, est constituée par un épithélium cilié simple, à cellules étroites de type colonnaire.

Hors de la zone située sous la cuticule gastrique, les cellules épithéliales dans lesquelles on peut observer fréquemment des divisions du noyau, sont caractérisées par de longs cils, issus de grains basaux et par une cuticule large. Dans l'épithélium de cette partie de l'estomac les phagocytes sont nombreux. Occasionnellement des glandes à mucus ou mucocytes y sont présentes.

L'épithélium sous-jacent à la cuticule gastrique diffère de celui observé précédemment. Les cils de ses cellules sont courts, leurs extrémités étant fusionnées pour former selon YONGE (1926 b) la cuticule gastrique. Les mucocytes sont absents dans cet épithélium.

Du côté externe de la paroi stomacale, la membrane basale est épaisse et contient un grand nombre de phagocytes. Sous la membrane s'étale une couche réduite de fibres musculaires lisses.

2 - Les canaux digestifs.

De section circulaire, les canaux digestifs, dont la lumière est de forme irrégulière, sont formés d'un épithélium semblable à celui de l'estomac, c'est-à-dire de cellules ciliées dont le cytoplasme n'est pas vacuolisé. Des glandes à mucus et des phagocytes y sont présents. Sous la membrane basale est également visible, comme au niveau de l'estomac, une couche de fibres musculaires circulaires.

3 - Les tubules digestifs.

En coupe transversale, la disposition et la forme des différents massifs cellulaires qui constituent l'épithélium des tubules, confèrent à la lumière de ceux-ci une forme caractéristique en croix. Les tubules diffèrent his-

tologiquement de l'estomac et des canaux digestifs auxquels ils font suite.

Les cellules digestives qui les composent, de forme irrégulière, sont ciliées et n'ont pas de cuticule bordante. A leur base dans le cytoplasme "clair" et vacuolisé le noyau rond possède un grand nucléole. On peut reconnaître dans les vacuoles de ces cellules des particules alimentaires (YONGE, 1926 b). MANSOUR (1946) identifie dans ces vacuoles des grains de sécrétion.

Au niveau de cryptes, situées aux extrémités des bras de la croix formée par la lumière de ces tubules, les cellules diffèrent de celles observées dans les autres zones. Elles sont plus volumineuses et ont un cytoplasme "sombre". Ces cellules constituent des cellules jeunes de remplacement.

Les tubules digestifs sont directement en contact avec le conjonctif interstitiel qui l'entoure, aucune formation musculaire n'existant sous la base de l'épithélium. Les phagocytes sont nombreux entre les cellules épithéliales et dans le conjonctif qui les entoure.

4 - Le tissu conjonctif.

Le tissu conjonctif englobant les différents organes de l'appareil digestif est formé de cellules vésiculaires ou cellules de Leydig, associées à des fibrocytes et à de nombreuses fibres de collagène. Dans les cellules de Leydig s'accumulent des réserves de glycogène et de lipides.

Dans le conjonctif sont également présents des fibres musculaires, surtout à proximité des épithéliums et des phagocytes.

Il comporte également des lacunes ou sinus sanguins, des veines et des artères.

On y trouve enfin, suivant l'état des mollusques, des hémocytes libres, infiltrés entre les cellules de Leydig et des cellules renfermant des inclusions cytoplasmiques pigmentées, habituellement désignées, pour cette raison, "cellules brunes" dont le rôle est par ailleurs, mal connu.

D - Origine du matériel étudié.

Nos recherches ont été effectuées sur des huîtres plates originaires de Bretagne et du bassin d'Arcachon, secteurs ostréicoles où sévissent depuis plusieurs années les parasites étudiés.

II - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.

Les études que nous présentons dans les chapîtres suivants ont été développées pour l'essentiel à partir d'observations effectuées en microscopie photonique et en microscopie électronique.

A - Microscopie photonique.

Les examens en microscopie photonique sont pratiqués, selon le but recherché soit à l'état frais, soit sur coupes confectionnées après inclusion des tissus dans la paraffine, ou encore sur coupes semi-fines.

1 - Examens à l'état frais.

Ce type d'examen est effectué pour la détection initiale des parasites. Deux méthodes sont appliquées : les frottis et les appositions. Pour ces dernières, nous avons utilisé la coloration classique par la méthode de Giemsa.

2 - Coupes à la paraffine.

Leur observation permet de préciser la localisation du parasite, ses effets histopathologiques et sa morphologie, et apporte également des indications sur sa structure.

Les prélèvements sont fixés dans le mélange fixateur de Davidson (SHAW et BATTLE, 1957) préparé à partir d'une solution stock, dont la formule est la suivante :

| | |
|--------------------|--------|
| Eau de mer filtrée | 600 ml |
| Ethanol à 95° | 600 ml |
| Formol à 40 % | 400 ml |
| Glycerol | 200 ml |

et à laquelle on ajoute extemporanément 10 % d'acide acétique. Ce mélange, utilisé depuis peu d'années est particulièrement bien adapté pour la fixation du

matériel marin et permet de réaliser la plupart des colorations dans de bonnes conditions.

Pour l'inclusion à la paraffine (Histomed), les tissus sont déshydratés dans l'Ethanol, puis traités par le Butanol qui sert de bain intermédiaire.

Les coupes de 5 à 7 um d'épaisseur ont été colorées par :

- l'Azan de Heidenhain (GABE, 1968).

Cette coloration très utilisée en histologie pour les renseignements qu'elle donne sur la topographie générale, met également bien en évidence les granules réfringents chez les Marteilia, ainsi que les noyaux hémocytaires.

- la coloration de Mann-Dominici (MARTOJA et MARTOJA-PIERSON, 1967).

Elle donne de fins détails des noyaux et colore bien les structures basophiles en général, les cytoplasmes acidophiles et les nucléoles.

- la coloration de Vago-Amargier (VAGO-AMARGIER, 1963).

Adaptée à l'origine à la coloration des corps d'inclusions polyédriques des virus d'insectes, elle s'est montrée très utile pour révéler les inclusions cytoplasmiques à caractère fuchsinophile des formes parasitaires.

- la coloration de Prenant (MARTOJA et MARTOJA-PIERSON, 1967).

Bien que pouvant fournir des images fines des parasites elle convient surtout aux examens de contrôle en raison de sa rapidité d'exécution.

- la coloration de Feulgen-Rossenbeck (GABE, 1968).

Cette réaction nucléale a été principalement utilisée dans l'étude des plasmodés de l'Haplosporidie pour la mise en évidence des noyaux.

3 - Coupes semi-fines.

En microscopie photonique de nombreux examens ont été effectués sur des coupes semi-fines confectionnées à partir de tissus fixés et inclus pour la microscopie électronique. Ces coupes permettent d'obtenir des images fines et précises des parasites et sont naturellement nécessaires à la préparation des coupes destinées à la microscopie électronique.

Les coupes d'environ 1 μm d'épaisseur sont colorées par le bleu boracique de Sahli (LANGERON, 1949).

B - Microscopie électronique.

C'est la technique la plus importante, utilisée pour nos travaux.

Les fines pièces de tissus subissent une double fixation par le glutaraldéhyde et par le tétr oxyde d'osmium en utilisant le mode opératoire et les solutions suivantes :

- Fixation au glutaraldéhyde (1h à 24h à 4°C)

| | |
|-------------------------|-------|
| Glutaraldéhyde à 12 % | 1 vol |
| Tampon cacodylate 0.4 M | 1 vol |
| NaCl à 7 % | 1 vol |
| Eau distillée | 1 vol |

pH 7,4

- Lavage (1h à 24h à 4° C)

| | |
|-------------------------|-------|
| Tampon cacodylate 0.4 M | 1 vol |
| NaCl à 4 % | 1 vol |

- Post fixation au tétr oxyde d'osmium (1 h)

| | |
|-------------------------|-------|
| OsO ₄ à 2 % | 2 vol |
| Tampon cacodylate 0.4 M | 1 vol |
| NaCl à 10 % | 1 vol |

- Lavage (30 mn à 1h)

| | |
|-------------------------|-------|
| Tampon cacodylate 0.4 M | 1 vol |
| NaCl à 4 % | 1 vol |

Après déshydratation par l'alcool éthylique et pré-inclusion par l'oxyde de propylène, l'inclusion est faite dans l'Araldite ou dans l'Epon. Les coupes ultra fines de l'ordre de 750 Å sont recueillies sur grilles sèches puis contrastées à l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et au citrate de plomb selon la méthode de REYNOLDS. Les observations sont réalisées sur un microscope JEOL 100 B.

III - TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE.

Nous ne ferons ici, que mentionner la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose mise en oeuvre pour l'étude des effets pathogènes de Martelia refringens sous ses aspects biochimiques, dont le détail sera présenté dans le chapitre consacré à ce sujet (chapitre III, B, 2).

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR MARTEILIA REFRINGENS.

INTRODUCTION.

Parmi les maladies qui ont affecté gravement l'huître plate Ostrea edulis élevée sur les côtes françaises, la parasitose due à Marteilia refringens reste la plus importante tant par les dégâts qu'elle a provoqués, faisant au maximum de son intensité, passer la production des établissements ostréicoles de 19 000 tonnes en 1970 à 3 600 tonnes en 1978, que par sa durée puisqu'elle sévit maintenant depuis une quinzaine d'années.

Connue sous le nom de "maladie des Abers", ou plus couramment de "maladie de la glande digestive", cette épidémie toucha, bien qu'à des degrés divers, presque tous les élevages des régions de Bretagne, Marennes et Arcachon. Seules les huîtres plates de Méditerranée sont encore actuellement épargnées par l'infection.

Bien que cette épizootie ait suscité de nombreuses recherches en France comme à l'étranger et que l'agent responsable ait été étudié d'une façon approfondie, un certain nombre de points concernant sa biologie demandent encore à être précisés.

C'est dans ce contexte que nous avons été amenés à effectuer des recherches sur Marteilia refringens, recherches que nous présenterons après avoir fait le point sur les connaissances acquises sur ce parasite.

I - CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE PARASITE MARTEILIA REFRINGENS.

Les premiers cas de maladie ont été observés en 1969 chez les huîtres plates en cours d'affinage en claires dans le bassin de Marennes-Oléron (COMPS, 1970 a). Les signes les plus évidents de la parasitose ont été constatés au niveau des branchies qui présentaient des ulcérations auxquelles

étaient associées des formes d'un parasite nouveau. Ce dernier devait être rapidement retrouvé dans l'épithélium digestif d'huîtres plates de différentes provenances (COMPS, 1970 b).

Les lésions causées par le parasite entraînèrent des mortalités qui furent signalées aussi bien dans le bassin d'Arcachon que sur les côtes bretonnes et en particulier dans la zone des Abers (HERRBACH, 1971).

En Bretagne, où l'on cultivait principalement des huîtres plates, l'épizootie s'étendit essentiellement sur les côtes de la Manche et malgré de nombreuses mesures prophylactiques, gagna, mais tardivement la partie sud dont le golfe de Morbihan à partir de 1974.

Actuellement, la parasitose persiste dans plusieurs secteurs de Bretagne mais aussi dans le bassin d'Arcachon et dans le bassin de Marennes-Oléron. Pour Arcachon, après élimination de l'ensemble des stocks d'huîtres parasitées, toutes les tentatives de réimplantation de l'espèce ont conduit à de nouveaux développements de la maladie (DELTREIL, comm. pers.).

A - Description du parasite et de son cycle de développement.

Compte tenu de son importance économique, la maladie de la glande digestive de l'huître plate a fait l'objet, dès le signalement des premiers symptômes, de recherches histologiques sur les animaux malades.

Un parasite d'un type nouveau était mis en évidence par COMPS (1970 a : 1970 b) qui donna une description des différents stades présents dans les tissus de l'huître, stades qui représentaient de toute évidence des phases d'un cycle de développement chez l'huître.

Par la suite, HERRBACH (1971) retrouva chez les huîtres de Bretagne les différentes formes du parasite fournissant essentiellement des images des stades les plus avancés, observés en contraste de phase à partir de matériel frais.

Ultérieurement, des études plus approfondies du parasite furent effectuées en microscopie électronique, confirmant les particularités structurales indiquées par COMPS (1970 b) et révélant l'organisation complexe de l'agent pathogène (BONAMI et al., 1971 ; GRIZEL et al., 1974 a : 1974 b ; PERKINS, 1976 a ; FRANC, 1980).

Sur la base de ces différentes études nous résumerons les principales données relatives au cycle de développement du parasite.

Dans l'état actuel des connaissances, on peut admettre qu'il existe chez ce parasite une cellule souche ou cellule primaire, assimilable à une forme végétative et des formes de sporulation.

1 - La cellule primaire.

La forme de base de M.refringens est représentée par une cellule souche nommée "cellule primaire" par GRIZEL et al. (1974 a) ou encore "plasmode" par PERKINS (1976 a).

Persistant tout au long du développement du parasite, cette cellule, de forme arrondie voit sa taille varier suivant les phases du cycle de 10 à 30 μm selon GRIZEL et al. (1974 a). FRANC (1980) indique de son côté, pour les formes uninucléées, des dimensions extrêmes de 4,5 μm et de 23 μm .

Limitée par une membrane simple de type unitaire, cette cellule est caractérisée par un cytoplasme qui montre des affinités tinctoriales révélant une nature légèrement basophile. Le cytoplasme riche en ribosomes libres renferme un noyau généralement peu chromophile qui possède un nucléole volumineux bien apparent (GRIZEL et al., 1974 a). Le cytoplasme comporte par ailleurs divers organites originaux.

Parmi ceux-ci on observe des corps multivésiculaires renfermant à l'intérieur d'une membrane unitaire de nombreuses vésicules, elles-mêmes limitées par une membrane et dont la citerne est plus ou moins occupée par du matériel dense aux électrons (PERKINS, 1976 a). Par un phénomène de bourgeonnement ces vésicules se détacheraient de la formation vésiculaire en acquérant une deuxième membrane enveloppe (PERKINS, 1979).

Au voisinage de ces vésicules, mais aussi irrégulièrement réparties dans l'ensemble du cytoplasme, on trouve des particules denses structurées, vermiformes, de 50 à 130 nm de diamètre et de 130 à 370 nm de longueur (PERKINS, 1976 a) certaines pouvant atteindre 490 nm de long (PERKINS, 1979). Elles sont constituées d'une zone médullaire très opaque aux électrons, séparée par un espace clair, d'un cortex comportant une couche dense épaisse (10 à 11 nm), un feuillet clair et un feuillet dense externe (BONAMI et al., 1971). Présents par GRIZEL et al. (1974 a) comme des "particules d'allure virale", ces

corps ont été par la suite assimilés par PERKINS (1976 a) à des haplosporosomes par référence à ces organites cellulaires décrits par ce même auteur chez des Haplosporidies (PERKINS, 1971). Les haplosporosomes seraient issus des corps multivésiculaires précédemment décrits (PERKINS, 1976 a).

La cellule souche contient également des inclusions de taille variable pouvant atteindre 5 μm , caractérisées par une structure paracrystalline contenant du matériel de nature protéique (GRIZEL et al., 1974 a). Ces inclusions sont formées de vésicules aplaties, régulièrement empilées, séparées par une couche de matériel finement granuleux dense aux électrons. L'arrangement des couches denses et des feuilletts se fait suivant une période de 250 Å (GRIZEL et al., 1974 a). Les images fournies par PERKINS (1976 a) établissent clairement que ces corps se forment à partir du réticulum endoplasmique.

Enfin PERKINS (1976 a) a signalé dans cette cellule l'existence d'un petit nombre de mitochondries qui présentent peu de crêtes internes et renferment des fibrilles d'ADN.

2 - Formes de sporulation.

D'après les différents travaux réalisés sur Marteilia refringens et les protistes du même genre, Marteilia sydneyi (PERKINS et WOLF, 1976) ou présentant certaines affinités avec lui tel Paramarteilia orchestiae GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979 (GINSBURGER-VOGEL et al., 1976 ; DESPORTES et GINSBURGER-VOGEL, 1977 ; GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979 a : 1979 b) et Paramyxa paradoxa CHATTON, 1911 (DESPORTES, 1981), il semble que l'on puisse considérer comme première phase de la sporogénèse la formation à l'intérieur de la cellule primaire de M.refringens, d'une ou plusieurs cellules nommées "secondaires" (GRIZEL et al., 1974 a), "presporanges" (PERKINS, 1976 a) ou "sporontes" (DESPORTES, 1981).

La différenciation des cellules secondaires se fait par un processus de bourgeonnement réalisé par la coalescence de vésicules de type réticulum endoplasmique délimitant une portion de cytoplasme autour d'un noyau. La première cellule secondaire résulte d'un bourgeonnement endogène ("endogenous budding" de PERKINS, 1976 a), les autres étant dues à un bourgeonnement exogène (DESPORTES, 1981).

D'après PERKINS (1976 a) le cytoplasme des cellules secondaires dont le nombre peut atteindre 8 ne renferme comme organites à côté du noyau que des membranes sans ribosomes, du réticulum et des mitochondries. Ces dernières présentent des structures internes réduites (DESपोर्टES, 1981).

La multiplication cellulaire à l'intérieur des cellules secondaires, évoluant alors en "sporangies" (GRIZEL et al. 1974 a ; PERKINS, 1976 a) ou "pansporoblastes" (DESपोर्टES et GINSBURGER-VOGEL, 1977), conduit à la formation de 3 ou 4 unités constituées chacune de 3 sporoplasmes uninucléés emboîtés. La première unité est produite par bourgeonnement endogène, les unités suivantes ainsi que les sporoplasmes emboîtés résultant d'un bourgeonnement exogène. Ces unités sont les "cellules tertiaires" de GRIZEL et al. (1974 a), "spore primordia" de PERKINS (1976 a), ou "cellules sporales primaires" de DESपोर्टES (1981). Des transformations ultérieures font évoluer les cellules tertiaires en spores. Parallèlement à la maturation des spores GRIZEL et al. (1974 a) signalent une augmentation de la taille de la cellule primaire et l'apparition de masses protéiniques amorphes dans le cytoplasme des sporanges.

La spore : de la description détaillée de la spore de Marteilia refringens par PERKINS (1976 a) on peut résumer ainsi sa structure :

sphérique, mesurant alors 3,2 μm , ou ovoïde, la spore est limitée par une paroi épaisse de 29 nm. Elle est constituée de 3 sporoplasmes uninucléés emboîtés. Le plus interne est logé dans une vacuole du sporoplasme moyen lui-même situé dans une vacuole du sporoplasme externe. Entre la paroi sporale et le sporoplasme externe on observe des formations assimilables à des scindosomes.

Le sporoplasme externe contient un grand nombre d'haplosporosomes sphériques ou ovoïdes de 111 nm de diamètre et de 189 nm de long en moyenne ainsi que des éléments pouvant être considérés comme des précurseurs de ces haplosporosomes. Des mitochondries y sont présentes, alors que les ribosomes y sont rares ou absents.

Le sporoplasme moyen contient des vésicules vermiformes limitées par une double membrane, des corps de Golgi, des ribosomes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

Le sporoplasme interne possède des mitochondries et de très nombreux ribosomes, lui conférant un aspect dense.

Remarque : la terminologie utilisée par PERKINS et par GINSBURGER-VOGEL ou DESपोर्टES pour désigner les cellules primaire, secondaire et tertiaire de GRIZEL est due au fait que PERKINS fait référence dans ses descriptions aux

Haplosporidies, alors que GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES présentent les parasites voisins de M.refringens par analogie avec le cycle d'une Myxosporidie : Myxobolus BUTSCHLI.

B - Cycle de développement du parasite dans l'appareil digestif de l'huître et cycle de développement annuel.

Dès les premiers travaux sur M.refringens (COMPS, 1970 a ; HERRBACH, 1971 ; GRIZEL et TIGE, 1973 ; GRIZEL et al., 1974 b), il a été établi qu'il existe un lien étroit entre les stades successifs du développement du parasite et la localisation de ceux-ci dans les différentes parties de l'appareil digestif de l'huître.

Ainsi les premiers stades de la sporogénèse du parasite, représentés par la cellule primaire de petite taille et ne renfermant que 1 à 5 cellules secondaires sont essentiellement localisés dans l'épithélium cilié de l'estomac. Toutefois ces stades jeunes peuvent être également observés dans les diverticules digestifs ou dans l'oesophage.

A la suite de la prolifération des formes jeunes qui envahissent les diverticules digestifs, ont lieu dans cette partie du tractus digestif les stades suivants de la sporulation, conduisant à la formation des sporanges avec granules réfringents et spores.

Le cycle se termine par l'émission des sporanges dans la lumière des diverticules, puis par l'évacuation de ceux-ci hors de l'hôte par l'intestin et le rectum. Simultanément les sporanges peuvent éclater libérant les spores.

Nous reviendrons plus précisément sur cet aspect du cycle de M.refringens, au cours de notre étude des effets histopathogènes du parasite.

Il a été montré également que le parasite évolue selon un cycle saisonnier. TIGE et al. (1979) ont établi expérimentalement que l'infestation de l'huître a lieu durant les mois de juillet et août, par des formations jeunes du parasite. Ainsi durant l'été certains examens peuvent montrer des sujets présentant une récente infestation. Toutefois durant cette période de l'année les contrôles zoosanitaires, dans les secteurs anciennement atteints par la maladie, mettent essentiellement en évidence chez les huîtres parasitées des formes évoluées du parasite. Le taux des parasites matures ou en cours de maturation croît alors jusqu'en octobre, les formes jeunes étant rares dans les

tissus. L'intensité de la maladie est à cette époque généralement forte puisque touchant 20 à 100 % des sujets examinés. De septembre à octobre ont lieu les mortalités. Au cours de l'hiver suivant, le nombre des formes évoluées diminue chez l'huître. Simultanément l'intensité de la maladie est faible, le taux de sujets parasités pouvant être inférieur à 10 % des sujets examinés. En avril aucune forme du parasite n'est présente dans les tissus de l'hôte. Enfin en mai et juin les formes jeunes de M.refringens sont visibles chez l'huître et le cycle se poursuit avec l'apparition et l'augmentation des formes évoluées avec granules du parasite à la fin du printemps et au cours de l'été.

Le cycle tel que nous venons de le présenter est celui le plus généralement observé dans les élevages de Bretagne.

C - Position systématique.

Au cours des premiers travaux effectués sur l'agent responsable de la maladie de la glande digestive de l'huître plate, certains rapprochements ont été établis, avec cependant beaucoup de réserves entre ce pathogène et d'autres organismes de groupes connus. C'est ainsi que COMPS (1970 a) rapprocha les formes plasmodiales observées chez le parasite de celles présentes chez les Haplosporidies et en particulier chez l'espèce Minchinia nelsoni. Par ailleurs HERRBACH (1971) trouva certaines analogies entre le parasite et des champignons marins primitifs, les Chytridiales. Enfin GRIZEL et TIGE (1973) à la suite des travaux en microscopie électronique sur le parasite, effectués par BONAMI et al. (1971), le rapprochaient sur la base de la présence commune dans les sporanges de particules d'allure virale, de Labyrinthomyxa marina, parasite considéré alors comme ayant des affinités fongiques.

En 1974, GRIZEL et al. mettaient en évidence en partie grâce à la microscopie électronique l'impossibilité de rattacher le protiste à un groupe connu. Bien que le rapprochant des champignons inférieurs ces auteurs créaient pour lui un genre nouveau Marteilia et dans ce genre l'espèce Marteilia refringens.

L'affinité taxonomique de M.refringens a été par la suite révisée par PERKINS (1976 a). Cet auteur en fait un membre de la classe des Haplosporea CAULLERY, 1953. Cette inclusion repose essentiellement sur l'identification des particules d'allure virale de GRIZEL et al. (1974 a) à des haplosporosomes

(PERKINS, 1976 a), organites rencontrés chez les Haplosporidies (PERKINS, 1971). Les autres critères justifiant de telles affinités, étant la délimitation du sporoplasme par clivage interne (dont l'auteur signale que la particularité du processus ne suffit pas à exclure M.refringens des Haplosporidies, car il semble aussi exister chez Minchinia sp. PERKINS, 1975 (PERKINS, 1975 b)) et la formation de spores à partir d'un plasmode.

Après la mise en évidence de Marteilia sydneyi chez Crassostrea commercialis (WOLF, 1972 ; PERKINS et WOLF, 1976), SPRAGUE (1979) en créant pour le genre Marteilia la famille des Marteiliidae SPRAGUE, 1979, place celle-ci dans l'ordre nouveau des Occlusosporida PERKINS, 1975. Les caractères de cet ordre sont : spore comportant plus d'un sporoplasme, sporulation par bourgeonnements endogènes produisant un ou plusieurs sporoplasmes dans un ou plusieurs autres sporoplasmes, paroi sporale entière. La proposition de SPRAGUE (1979) de modification du phylum des Ascetospora SPRAGUE, 1978 isole ainsi au niveau de l'ordre, les Marteiliidae des Haplosporidiidae C. et M., 1905 ces derniers appartenant à l'ordre des Haplosporida, nouvellement nommé ici Balanosporida C. et M., 1899. Les deux ordres appartiennent à la classe des Stellatosporea, SPRAGUE, 1978, nom nouveau des Haplosporea. L'auteur signale que les Marteilia pourraient même être séparés des Haplosporidies typiques au niveau de la classe.

La position systématique des Marteiliidae a par la suite été modifiée au cours des études réalisées sur un parasite du crustacé Orchestia gammarellus présentant des affinités avec Marteilia (DESSPORTES et GINSBURGER-VOGEL, 1977) et identifié ultérieurement comme Paramarteilia orchestiae (GINSBURGER-VOGEL et DESSPORTES, 1979 b) représentant d'un nouveau genre des Marteiliidae. En considérant le processus particulier de la sporogenèse des Marteiliidae, ceux-ci sont rapprochés des Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. Ces trois derniers groupes étant considérés comme des ordres dans la classification de POISSON, DESSPORTES et GINSBURGER-VOGEL (1977) créent l'ordre des Marteiliida DESSPORTES et GINSBURGER-VOGEL, 1977 pour les Marteiliidies. Cette création est soutenue par FRANC (1980). GINSBURGER-VOGEL et DESSPORTES (1979 b) incluent ces quatre groupes dans l'embranchement des Myxozoaires. L'étude ultrastructurale de Paramyxa paradoxa parasite de l'annélide polychète Poecilochaetus serpens par DESSPORTES et LOM (1981) et DESSPORTES (1981) a récemment établi que l'organisation sporale des trois genres Paramyxa, CHATTON, 1911, Marteilia et Paramarteilia GINSBURGER-VOGEL et DESSPORTES, 1979 étant commune, ceux-ci pouvaient

être regroupés dans la classe des Paramyxea LEVINE, 1980 (DESPORTES et LOM, 1981).

DESPORTES (1981) propose alors en se référant à la nouvelle classification des Protozoaires de LEVINE et al. (1980), la position systématique suivante de l'ordre des Marteiliida :

Phylum ASCETOSPOREA SPRAGUE 1978

Classe I. STELLATOSPOREA - SPRAGUE 1978

Ordre : Balanosporida SPRAGUE 1978

Classe II PARAMYXEA LEVINE 1980

Ordre 1. Marteiliida. DESPORTES et GINSBURGER-VOGEL 1977

Genre Marteilia

Genre Paramarteilia

Ordre 2. Paramyxida CHATTON 1911

Genre Paramyxa

II - RECHERCHES PERSONNELLES SUR MARTEILIA REFRINGENS.

Les nécessités d'approvisionnement de l'étang de Thau en jeunes huîtres ont conduit à introduire régulièrement sur les parcs des huîtres originaires de Bretagne, certains lots pouvant être parasités comme l'ont montré des contrôles zoosanitaires effectués. Malgré ces introductions accidentelles d'huîtres contaminées, la parasitose ne s'est jamais développée ni étendue aux populations de l'étang. Cette constatation nous a incité à étudier le comportement de différents lots d'huîtres infestées afin de connaître les modalités du cycle de développement de Marteilia refringens dans ce biotope particulier.

Par ailleurs en suivant comparativement l'évolution du parasite dans des lots du bassin d'Arcachon nous avons pu préciser certains aspects relatifs aux effets pathogènes demeurés jusqu'alors peu étudiés tout en examinant des cas de proliférations hémocytaires atypiques fréquemment associées à la parasitose.

Au cours de ces travaux nous avons enfin mis en évidence, également chez des huîtres d'Arcachon, un cas d'hyperparasitisme de M.refringens par une Microsporidie dont l'ultrastructure et les effets pathogènes sur l'hôte ont été étudiés.

A - Etude du cycle de Marteilia refringens dans l'étang de Thau.

Introduction.

Très rapidement après l'observation des premières manifestations de la parasitose dans le secteur de Marennes-Oléron on constatait que le parasite M.refringens infestait les huîtres d'Arcachon et de Bretagne (COMPS, 1970 b : HERRBACH, 1971). Toutefois aucun développement de la maladie n'était constaté chez les huîtres plates de Méditerranée, en particulier dans l'étang de Thau où pourtant un certain nombre d'élevages étaient approvisionnés en jeunes huîtres originaires de Bretagne. Il convient de préciser par ailleurs qu'au cours d'examens périodiques des populations d'huître plate de l'étang un seul cas d'infestation par M.refringens a été décelé sans jamais cependant constater de signes d'extension de la maladie.

Dans ce contexte, nous avons étudié expérimentalement le comportement du parasite dans l'étang de Thau, après introduction de lots d'huîtres parasitées originaires de la rivière d'Auray en Bretagne, en vue de préciser le cycle de développement de M.refringens dans les conditions particulières de ce milieu, et conjointement nous avons effectué un certain nombre d'observations en microscopie électronique afin de déceler d'éventuelles modifications ultrastructurales du parasite en liaison avec les nouvelles conditions écologiques.

1 - Protocole expérimental.

L'approvisionnement de l'étang en huîtres parasitées a été réalisé au cours de l'année 1977 durant laquelle 9 lots ont été introduits entre les mois de mars et décembre. Pour chaque lot le taux de parasitisme représentant le pourcentage d'huîtres parasitées présentes parmi les huîtres examinées, a été déterminé après observation des sujets sur coupes histologiques. Ce taux a été établi avant réimmersion des huîtres de Bretagne dans l'étang et ultérieurement en juillet et octobre 1977 puis en février et juin 1978. Les dates d'immersion et de contrôle du taux de parasitisme, ainsi que les valeurs correspondantes de ce dernier sont données dans le tableau I.

| n° des lots | Dates d'immersion - 1977 - | Taux d'huîtres parasitées aux différents contrôles | | | | |
|-------------------|----------------------------------|---|---------|---------|---------|------|
| | | initial | 1 9 7 7 | | 1 9 7 8 | |
| | | | juillet | octobre | février | juin |
| 1 | mars | 0 | 40 | 37 | 9* | 0 |
| 2 | avril | 0 | 20 | 12 | 0 | 15 |
| 3 | mai | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| 4 | juin | 20 | 6 | 10 | 5* | 0 |
| 5 | juillet | 21 | | 31 | 0 | 0 |
| 6 | août | 11 | | 23 | 38* | 15 |
| 7 | octobre | 44 | | | 11 | 30 |
| 8 | novembre | 65 | | | 25 | 60 |
| 9 | décembre | 50 | | | 9* | 39 |

Tableau 1 : Taux de parasitisme contrôlés durant l'expérience de mise en culture d'huîtres parasitées bretonnes dans l'étang de Thau. (Les chiffres suivis d'un astérisque correspondent à des huîtres parasitées uniquement par des formes stomacales).

2 - Résultats.

Poursuivie sur deux années, cette expérience a permis de montrer certains aspects particuliers du cycle de M.refringens dans l'étang de Thau et de mettre en évidence des modifications structurales de l'agent pathogène qui pourraient leur être associées.

a - Cycle du parasite.

L'essai réalisé a établi que dans les conditions particulières de l'étang de Thau, le cycle complet de développement de M.refringens pouvait s'accomplir. Pour les lots 1, 2 et 4 notamment, nous avons pu suivre la première année d'immersion, le développement de tous les stades du cycle avec apparition des spores aux contrôles histologiques du début juillet puis leur disparition au cours de l'hiver suivant.

Toutefois on peut remarquer également que M.refringens, peut se développer chez des huîtres dont aucune forme du parasite n'a été décelée au moment de l'immersion (Lots 1 et 2) et dans le cas d'un second cycle, l'hiver précédant (lots 2 et 3). Cette constatation confirmerait que des formes infestantes persistent dans les tissus de l'huître malgré leur non observation à partir d'un contrôle histologique classique.

Les résultats des examens histologiques du parasitisme indiquent aussi que M.refringens peut ne pas présenter un deuxième cycle à la suite d'un premier cycle observé la première année d'expérimentation (lots 1, 4 et 5). Enfin au cours de la deuxième année d'élevage dans l'étang, le parasite peut se développer chez des huîtres ou il était absent l'année précédente (lot 3).

A côté de ces données générales sur le cycle, cette expérience a permis de préciser certaines caractéristiques de l'évolution de la parasitose en fonction de facteurs écologiques. Pour ce faire le développement du parasite observé dans l'étang de Thau a été comparé à celui réalisé en rivière d'Auray chez un même stock d'huîtres et au cours de la même période. En Bretagne le cycle de M.refringens a correspondu au développement habituellement observé que nous rappelions précédemment (Chapitre III, I : B). La comparaison des taux de parasitisme indique très nettement qu'au cours des deux années, le maximum d'infestation apparaît plus tôt dans l'étang Languedocien soit en juin-juillet

(lots 1 et 2 pour 1977 et lots 7, 8 et 9 pour 1978) qu'en Bretagne où il se situe en octobre-novembre. Le cycle de développement de M.refringens est en conséquence plus précoce à Thau que dans les eaux atlantiques. L'infestation minimale s'observe quant à elle durant l'hiver à Thau comme en Bretagne. Ainsi en février 1978, dans l'étang Languedocien le parasite était absent chez de nombreuses huîtres examinées (lots 2, 3 et 5) ou représenté uniquement par des stades de début de cycle dans l'estomac (lots 1, 4, 6 et 9) ou des formes jeunes dans les tubules digestifs (lots 7 et 8).

Enfin, l'expérience montre l'influence de l'époque de réimmersion des huîtres Bretonnes dans l'étang sur l'évolution du parasite dans les eaux méditerranéennes. Si la première année de mise en cultures d'huîtres parasitées à Thau, le développement de M.refringens ne paraît pas être lié à la date d'immersion puisque pour tous les lots on note une forte diminution du taux de parasitisme durant l'hiver (examens de février 1978), l'influence de l'époque de remise en culture est plus nette au cours de la seconde année d'élevage. En effet au début de l'été 1978 les taux de parasitisme étaient faibles ou nuls chez les huîtres introduites entre mars et août 1977 (lots 1 à 6) alors qu'ils indiquaient une reprise de l'infestation dans les lots mis en culture entre octobre et décembre 1977 (lots 7 à 9).

b - Données ultrastructurales.

L'étude en microscopie électronique de M.refringens chez les huîtres parasitées de l'étang de Thau a permis d'observer des modifications structurales dans certaines figures du parasite et notamment dans les formes de fin de sporulation.

Parmi les faits notés, on retiendra en premier lieu, l'accroissement du nombre des mitochondries dans les cellules secondaires (PL. II, Fig. 3) : par section, on dénombre au moins 5 à 8 mitochondries qui occupent la majeure partie du cytoplasme.

La structure de ces organites est caractérisée par la rareté, sinon l'absence de replis membranaires en forme de crêtes ; les deux membranes qui les limitent sont cependant bien visibles. A l'intérieur on distingue chez certaines d'entre-elles un réseau ténu de fibrilles.

Pour ce qui concerne la phase sporogonique, bien que sur coupes histologiques, les derniers stades du cycle de M.refringens apparaissent semblables

aux formes normales avec granules réfringents certaines différences ont été notées au niveau ultrastructural. Elles concernent aussi bien les spores que ce qui subsiste de la cellule secondaire ou sporonte (PL. II, Fig. 4).

Le sporonte qui contient toujours quatre spores (GRIZEL et al., 1974 a) est limité par une "paroi" épaisse de 300 A° formée par l'accroissement de plusieurs feuillets denses aux électrons. Cette paroi a un contour irrégulier avec des replis plus ou moins accentués. Dans le cas de l'expérience, ces replis sont très importants : la paroi s'invagine profondément en plusieurs points délimitant des îlots cytoplasmiques dans lesquels sont isolées les spores.

Parallèlement, à côté des granules réfringents apparaissant sous forme de corps amorphes opaques, on note la présence d'un nombre inhabituel d'inclusions sphéroïdes très denses aux électrons, dont la taille varie entre 300 nm et 1,5 µm ; ces dernières pourraient être de nature lipidique.

Par ailleurs, au niveau de la spore, l'examen en microscopie électronique révèle certaines différences par rapport aux descriptions connues pour M.refringens du secteur atlantique.

Comme on l'a vu antérieurement, le développement normal de M.refringens aboutit en fin de cycle à une spore tricellulaire (DESPORTES et LOM, 1981). Dans les conditions de l'essai, la spore présente deux entités bien distinctes : à l'intérieur de l'enveloppe sporale, on observe une large zone périphérique formée d'un cytoplasme clair pauvre en ribosomes mais comportant de nombreuses particules denses bipartites, régulièrement réparties sur toute la surface. Cette partie de la spore correspond au sporoplasme externe selon PERKINS (1976 a). En son centre est incluse une sphérule dense aux électrons, limitée par une paroi épaisse de 220 A° : aucune subdivision cellulaire n'y est apparente ; par contre on y trouve de nombreux ribosomes associés à des fibres denses.

Discussion-Conclusion.

La mise en culture expérimentale dans l'étang de Thau d'huîtres plates originaires de Bretagne parasitées par M.refringens, a permis de mettre en évidence que comme en Atlantique, le cycle complet de développement du pathogène pouvait s'accomplir dans l'étang et que dans ce milieu était également possible la contamination par le parasite d'huîtres originellement saines. Mais l'essai a montré aussi que dans le biotope Languedocien, M.refringens présente des particularités, par comparaison avec ce qui est généralement observé dans les eaux atlantiques.

Ainsi au cours de l'expérience, il a été constaté que les conditions du milieu induisent une évolution précoce du cycle du parasite en Méditerranée. La précocité du développement de M.refringens à Thau pourrait alors être liée au réchauffement plus rapide des eaux méditerranéennes que celles atlantiques.

Simultanément il a pu être observé que dans le cas d'un premier cycle complet à Thau, un second cycle pouvait ne pas avoir lieu dans ce milieu. Il semblerait alors que dans les conditions de l'étang, certains facteurs empêchent ou réduisent le développement de formes du parasite capables de provoquer la réinfestation ultérieurement.

Enfin nous avons mis en évidence durant l'expérimentation que l'ultrastructure des formes de M.refringens, principalement celle des spores est modifiée. La description des spores que nous donnons rappelle sur certains points celle des cellules tertiaires fournie par BONAMI et al. (1971). On pourrait donc admettre que dans les eaux méditerranéennes certains facteurs accélèrent ou accentuent un processus de maturation ou peut-être dans ce cas de dégénérescence du parasite.

Les observations ultrastructurales comme les observations sur le cycle du parasite n'ont pu être confirmées, l'expérience ne comportant pas de répétitions. Il convient cependant de les considérer comme des tendances probables liées non seulement aux nouvelles conditions hydrobiologiques du milieu mais également aux réactions particulières de l'hôte dans ce milieu.

B - Etude des effets pathogènes du parasite.

Introduction.

L'étude du rôle pathogène de Marteilia refringens a été jusqu'à ce jour limitée à quelques observations générales sur l'état des mollusques atteints. Ainsi au plan histopathologique aucun symptôme précis n'a été décrit. Cependant COMPS (1970 a) note un "déchiquetage" des cellules épithéliales des diverticules digestifs, accompagné de la difficulté d'en reconnaître les cellules sombres et PODER (1980) signale des nécroses épithéliales du tractus digestif accompagnées de réactions hémocytaires limitées. Mais ce dernier auteur note que ces réactions inflammatoires ne sont pas obligatoirement induites par

l'agression d'O.edulis par M.refringens. Inversement l'absence de lésions et d'altérations cellulaires aussi bien au niveau de l'épithélium stomacal que dans celui des diverticules digestifs a été mentionnée par GRIZEL et al. (1974 a). Ces auteurs suggèrent par contre que le parasite pourrait agir par limitation de l'activité métabolique des cellules épithéliales digestives de l'hôte, par obturation des canaux digestifs ou encore par l'effet de substances toxiques.

Les examens que nous avons été amenés à réaliser tant sur les huîtres d'Arcachon que sur celles mises en expérience dans l'étang de Thau ont révélé en fait que des lésions des épithéliums digestifs pouvaient s'observer à certains stades de la maladie.

Nous avons ainsi envisagé de préciser les symptômes histopathologiques associés à la présence du parasite.

Par ailleurs en s'inspirant de travaux effectués sur les altérations des protéines de l'hémolymphe de l'huître américaine Crassostrea virginica au cours de certaines parasitoses nous avons recherché l'existence éventuelle de modifications biochimiques dans l'hémolymphe des huîtres atteintes.

1 - Aspects histopathologiques.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les premières formes du cycle de Marteilia refringens sont localisées sur la bordure de l'épithélium stomacal. Souvent réparties immédiatement en dessous de la bordure ciliée elles apparaissent comme nidées entre les cellules épithéliales. Si généralement (ainsi que cela a déjà été signalé) aucune lésion importante ne paraît, liée à la présence des formes parasitaires, on peut noter toutefois la formation de lacunes autour du parasite (PL. III, Fig. 5). On observe également des modifications plus importantes de la structure de l'épithélium consécutives à une invasion d'hémocytes granuleux entre les cellules stomacales au voisinage du parasite (PL. III, Fig. 6). Ces symptômes sont toutefois trop limités et trop localisés pour que l'on puisse admettre qu'un effet pathogène sensible se manifeste au niveau de l'estomac.

Il est certain par contre qu'au cours du développement de la maladie les diverticules digestifs sont le siège d'altérations propres à influencer le comportement de l'hôte. L'évolution des lésions est étroitement liée aux

phases principales du cycle du parasite.

Au cours de la phase de prolifération des formes jeunes, le parasite investit les canaux et tubules digestifs, sans introduire de modifications de l'épithélium digestif. Dans les tubules digestifs, au voisinage du parasite, les massifs de cellules sombres de remplacement sont intacts ainsi que les cellules digestives riches en grains de sécrétion (PL. III, Fig. 7).

A la suite de la phase de sporulation caractérisée par l'accroissement important de la taille du parasite on note, outre un encombrement partiel de la lumière des tubules, des déformations de la partie distale des cellules épithéliales. Dans certains cas le parasite apparaît localisé plus profondément dans l'épithélium venant même en contact direct avec la basale (PL. IV, Fig. 8).

Les symptômes histologiques les plus caractéristiques s'observent au cours de la phase d'évacuation des diverticules par le parasite. Durant cette phase les sporontes sont libérés par rupture de la membrane de la cellule souche se trouvant ainsi disséminés dans la lumière des tubules et des canaux digestifs. A partir de là ils transitent jusqu'à l'intestin comme l'ont montré GRIZEL et al. (1974 a). Ce processus s'accompagne d'une altération profonde de l'épithélium portant essentiellement sur les cellules sécrétrices. Alors que de petits massifs de cellules sombres subsistent accolés à la basale, les cellules digestives sont éclatées et leur contenu dispersé dans la lumière des tubules (PL. IV, Fig. 9). De proche en proche ces lésions entraînent la disparition d'importants secteurs épithéliaux ne laissant subsister à ce niveau que la basale. A un stade plus avancé de la destruction de l'épithélium peut se produire une rupture de la basale (PL. V, Fig. 11).

Parallèlement à la dégradation des épithéliums on observe aussi un élargissement très important des conduits digestifs dont la lumière est occupée par des formes du parasite et par de nombreux débris cellulaires d'origine épithéliale, auxquels sont également associés des cellules sanguines (PL. V, Fig. 12).

Il convient enfin de mentionner que les symptômes décrits peuvent être différés selon les secteurs de la masse digestive, ceux-ci ne présentant pas tous le même degré d'infestation, ni le même état de développement du parasite.

2 - Aspects biochimiques.

Les travaux sur les modifications biochimiques de l'hémolymphe d'huîtres parasitées concernent pour l'essentiel les infestations de Crassostrea virginica par Minchinia nelsoni et par Bucephalus sp.

MENGEBIER et WOOD (1969) mettent en évidence une diminution de l'activité enzymatique et en particulier celle de la phosphohexose isomerase au cours de la parasitose par M.nelsoni.

FENG et CANZONIER (1970) rapportent les altérations de l'hémolymphe consécutives aux infestations par M.nelsoni et par Bucephalus sp. Si la protéinémie totale n'est pas changée au cours de ces parasitoses, par contre le parasitisme influence fortement l'activité enzymatique et modifie quantitativement les constituants protéiques révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

FENG et al. (1970) notent également une réduction de la concentration d'un grand nombre d'acides aminés dans l'hémolymphe d'huîtres parasitées par M.nelsoni et par Bucephalus sp.

Enfin DOUGLASS et HASKIN (1976) confirment les résultats obtenus par FENG et CANZONIER (1970) pour ce qui concerne l'absence de modification de la protéinémie entre huîtres saines et huîtres parasitées. Ils soulignent cependant une forte augmentation de l'activité de trois enzymes (asparate aminotransferase, alanine aminotransferase et phosphohexose isomerase) au cours d'infestations branchiales de l'huître par Minchinia nelsoni.

a - Matériel et techniques.

Les huîtres saines et parasitées, dont l'hémolymphe a été soumise à l'analyse biochimique provenaient du bassin d'Arcachon.

Les prélèvements d'hémolymphe sont réalisés à la pipette Pasteur stérile effilée, soit à la surface de la section du muscle adducteur de l'huître, soit par ponction cardiaque lorsque la taille du sujet le permet. Les prélèvements après centrifugation à 23 000 g pendant 30 minutes à + 4° C sont stockés en tubes à hémolyse et conservés à - 85° C jusqu'à analyse.

Le taux de parasitisme de chaque huître est contrôlé par la technique histologique décrite dans le chapitre II, après inclusion des masses digestives dans la paraffine. Seules sont retenues les hémolymphe des huîtres saines et

des huîtres fortement parasitées.

La protéinémie des échantillons est déterminée par une méthode colorimétrique faisant intervenir la réaction du biuret, suivant le protocole décrit en détail par PICHOT et POLLARD (1970) ; elle utilise comme sérum de référence du sérum humain normal Lyotrol N (B.D.Mérieux).

Le fractionnement des protéines de l'hémolymphe est obtenu par électrophorèse sur membranes de polyacétate de cellulose POLIPHOR (de POLIPHOR S.A Balerne, Suisse) de format 160 X 25 mm. Cette qualité de bandes, qui ne nécessitent pas de traitement spécial pour leur transparisation après décoloration, a été retenue après essais d'autres supports inertes (bandes Microphor, Cellogel...) en raison de leur résolution supérieure.

Le tampon utilisé tant pour le lavage des bandes d'acétate que pour les bacs à électrode de la cuve d'électrophorèse est un tampon Tris-Glycine 0.2 M de pH 8.5. Il permet de mettre en évidence comme nous le verrons dans le paragraphe suivant 5 à 6 fractions protéiques. Initialement l'utilisation d'un tampon véronal de pH 9 ou d'un tampon discontinu Tris-EDTA-acide borique pH 9,1 à l'anode et véronal pH 8,6 à la cathode (MATE et al., 1976) utilisés fréquemment pour l'analyse des protéines solubles du cristallin de poisson (OLIVER et al., 1980) ne révélait que 3 ou 4 fractions.

La quantité d'échantillon déposée à l'extrémité cathodique des bandes est déterminée à partir de leur protéinémie de façon à soumettre à l'électrophorèse 200 µg de protéines. Elle varie de 15 à 25 µl. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve type J.GROULADE (APELAB, J.C.MONTAGNE constructeur), l'alimentation étant fournie par un générateur ECPS 2000/300 PHARMACIA. Elle est menée à voltage constant de 300 volts pendant 120 minutes.

Les protéines sont ensuite colorées à l'amidoschwarz en solution méthanol-acide acétique. Après séchage, les bandes sont photométrées sur un densitomètre-enregistreur VITATRON muni d'un intégrateur permettant de déterminer la valeur relative de chaque fraction.

b - Résultats.

- Concentration en protéines de l'hémolymphe : le poids de protéines contenues dans l'hémolymphe des huîtres plates saines est en moyenne de 13.3 g/l. On peut observer que cette protéinémie est relativement élevée en

comparaison avec celle déterminée chez d'autres espèces d'huîtres. Chez C. virginica elle varie de 6,97 à 7,24 g/l d'après FENG et CANZONIER (1970) et est de 8,3 g/l selon DOUGLASS et HASKIN (1976). Chez C.gigas elle est comprise entre 2,2 et 2,7 g/l (COUSSERANS, 1975).

Chez les huîtres fortement parasitées la concentration en protéines baisse considérablement et ne dépasse pas 8 g/l en moyenne. Cette diminution de la concentration protéique de l'hémolymphe des huîtres plates infestées par M.refringens montre l'influence du parasite sur le métabolisme protéique de l'hôte.

- Diagrammes électrophorétiques : L'électrophorèse sur acétate de cellulose des protéines de l'hémolymphe d'huîtres saines, permet de mettre en évidence cinq fractions, identifiées de la cathode vers l'anode de 1 à 5 (PL VI, Fig. 13 et 14) ; la fraction la plus rapide 5 est la plus importante représentant 73,7 % des protéines totales. Cette fraction est suivie des fractions 4, 3 et 1 de valeurs relatives sensiblement égales (respectivement 8,7 ; 7,1 et 7,0 %) ; la fraction 2 en avant de 1 est faible : 3,5 % .

Les huîtres parasitées présentent un électrophorégramme sensiblement différent (PL VI, Fig. 13 et 14). Des fractions précédentes, seules subsistent les fractions 3, 4 et 5. Leur mobilité est identique à celle notée pour l'hémolymphe "saine". Toutefois les fractions 3 et 4 d'importance égale entre elles (respectivement 4,3 et 4,4 %) ont une valeur réduite de moitié par rapport à celle du protéinogramme des huîtres saines, alors que la fraction 5 est légèrement augmentée (82,6 %). On observe enfin en avant de la fraction 5 une nouvelle fraction 6 importante (8,7 %).

Discussion - conclusion.

L'étude des effets histopathogènes de M.refringens a mis en évidence que le parasite provoque d'importantes lésions des épithéliums digestifs de l'huître. La destruction des épithéliums s'observe essentiellement dans les canaux et tubules digestifs au cours de la phase d'évacuation de ceux-ci par les formes les plus évoluées du parasite. Consécutivement à la dégradation des épithéliums on observe une obturation des diverticules par les débris des cellules épithéliales et par des hémocytes.

On peut ainsi admettre que le rôle pathogène de M.refringens s'exerce par suppression ou limitation des fonctions digestives de l'huître infestée. Il a été en effet démontré (YONGE 1926 a : 1926 b) que les diverticules digestifs sont les organes de la digestion et de l'absorption, leurs cellules absorbant par les vacuoles et digérant par les enzymes les particules alimentaires.

L'analyse biochimique de l'hémolymphe d'huîtres saines et d'huîtres parasitées a montré que la présence du parasite entraîne une diminution importante de la protéinémie et des modifications de l'électrophorégramme obtenu après électrophorèse sur acétate de cellulose des protéines de ce tissu.

La différence la plus significative observée entre les diagrammes électrophorétiques des huîtres saines et des huîtres parasitées, concerne la disparition de deux fractions de mobilité lente (fractions 1 et 2 des huîtres saines) et l'apparition d'une fraction supplémentaire de mobilité rapide (fraction 6) chez les sujets infestés. Le nombre de sujets analysés n'a pas permis d'établir si les différences des pourcentages relatifs des fractions de mobilité moyenne (fractions 3, 4 et 5) sont statistiquement, significatives entre les animaux sains et infestés.

Les altérations de l'hémolymphe d'Ostrea edulis consécutives à la présence de M.refringens mettent donc en évidence que la parasite interfère avec le métabolisme protéique de l'hôte. Ces résultats préliminaires devraient toutefois être précisés en recherchant en particulier les modifications de l'activité enzymatique liées à la parasitose. D'autre part l'analyse biochimique devrait être aussi orientée vers la recherche d'éventuelles substances toxiques émises par le parasite.

En conclusion notre étude montre que l'action pathogène de M.refringens s'exerce selon au moins les deux processus décrits, ceux-ci pouvant être indépendants ou étroitement liés.

C - Etude de cas de proliférations hémocytaires atypiques associées à la parasitose.

Introduction.

Bien qu'il soit assez fréquent d'observer dans les tissus de l'huître et tout particulièrement au niveau du tissu conjonctif interstitiel de la glande

digestive, des cas d'hyperplasie hémocytaire, ces infiltrations cellulaires sont fréquemment de type réactionnel ou inflammatoire. Leurs caractères ont été définis récemment par PODER (1980). Plus rarement on rencontre dans ces mêmes tissus des proliférations hémocytaires atypiques, généralement de nature néoplasique et le plus souvent mises en évidence indépendamment de l'existence de parasite.

Au cours de nos recherches sur Marteilia refringens, nous avons pu constater, cependant, parmi des lots provenant du bassin d'Arcachon des hémocytoses atypiques associées à l'infection de la glande digestive par ce parasite. Ce syndrome avait déjà été signalé par BALOUET et PODER (1978) chez des huîtres plates originaires de Bretagne.

Dans le cadre de nos recherches sur Marteilia refringens, nous avons développé l'étude des cas d'hyperplasies atypiques associées à la parasitose.

Toutefois avant de présenter les résultats de nos observations nous rappellerons les principales caractéristiques des hyperplasies hémocytaires signalées chez les mollusques bivalves marins en distinguant celles qui se rapportent à l'huître plate O.edulis de celles ayant trait aux autres mollusques.

1 - Rappels bibliographiques sur les hyperplasies hémocytaires atypiques des mollusques bivalves marins.

Les études sur les proliférations hémocytaires atypiques chez l'huître plate sont peu nombreuses.

FRANC (1975) observe sur des huîtres de Méditerranée présentant d'importantes lésions branchiales une abondance anormale d'hémocytes au niveau de l'intestin, de l'estomac et des branchies. Ces hémocytes dont le diamètre moyen est de 5,5 μm à 6 μm présentent en majorité un noyau de 2 μm de diamètre, alors que pour d'autres plus rares, celui-ci varie entre 4 et 4,5 μm . Leur cytoplasme est réduit et les mitoses sont exceptionnelles. Si la cause de cette hyperplasie est demeurée inconnue, il semble qu'elle soit à l'origine des lésions puisque par ailleurs aucun agent pathogène n'a été décelé chez les huîtres atteintes.

ALDERMAN et al. (1977) ont signalé des infiltrations hémocytaires similaires au cours de mortalités anormales d'huîtres cultivées en Espagne et en Yougoslavie. Les hémocytes hyalins impliqués dans cette prolifération envahissent le tissu conjonctif et tout particulièrement les régions sub-épithéliales des tubules digestifs et de l'intestin ainsi que les branchies. Ils présentent une

grande taille, avec un noyau très basophile et agrandi alors que le cytoplasme est réduit, le rapport nucléo-cytoplasmique est de 0,77 alors qu'il est de 0,35 pour les hémocytes normaux. Dans ces hémocytes les mitoses sont rares. Chez ces huîtres aucun pathogène n'a été mis en évidence et les auteurs attribuent les mortalités à la qualité de l'eau et à des facteurs physiques de stress, qui pourraient être également à l'origine de la néoplasie.

Enfin BALOUET et PODER (1978), puis PODER (1980), au cours de recherches sur des huîtres plates des côtes Bretonnes, ont rapporté également des cas d'hyperplasie hémocytaire. Selon ces auteurs, l'hyperplasie se manifeste autour de l'estomac et des diverticules digestifs et s'étend même aux branchies et aux gonades. Elle donne lieu aussi à des embolies intravasculaires. Les cellules pathologiques se rapprochent des deux types hyalins et granuleux, bien que ce dernier soit exceptionnel puisque rencontré chez un seul sujet parmi les 51 présentant une prolifération cellulaire tumorale. Chez les sujets où prolifèrent des hémocytes de type hyalin, les cellules anormales ont un diamètre moyen de 5,6 μm mais sont caractérisées par une forte anisocytose. Leur noyau irrégulier est grossi, leur diamètre étant de 4,5 μm : il présente de nombreuses mitoses et atypies, alors que le cytoplasme est restreint. Ceci leur confère un rapport nucléo-cytoplasmique de 0,75. Dans le cas d'hyperplasie à hémocytes granuleux, ceux-ci sont volumineux avec un diamètre moyen de 6,3 μm et une importante anisocytose. Leur cytoplasme qui reste abondant et leur noyau arrondi de 3,5 μm donne un rapport nucléo-cytoplasmique de 0,55. Dans ces cellules, les figures mitotiques sont assez nombreuses.

L'ultrastructure des hémocytes hyalins a été précisée par PODER (1980). Le cytoplasme contient de nombreuses mitochondries, un reticulum granulaire et des ribonucléotides. Le noyau dont le nucléole est important, présente des invaginations de sa membrane et une chromatine dispersée.

Bien que deux agents pathogènes, dont Marteilia refringens, aient été observés associés à quelques cas d'hyperplasie de type hyalin, ceux-ci semblent ne constituer pour l'huître qu'un stress, les proliférations hémocytaires paraissant être de nature néoplasique.

Chez les autres mollusques bivalves marins le phénomène de prolifération atypique est fréquent. De nombreux auteurs en font état.

FARLEY (1969 a) en décrit chez Crassostrea virginica et C.gigas des côtes est et ouest des Etats-Unis. La maladie à caractère néoplasique et dont les causes sont inconnues est représentée par une invasion du tissu conjonctif

vésiculaire par des hémocytes hyalins caractérisés par un accroissement de la taille du noyau et par l'existence de nombreuses mitoses. Cet auteur, la même année (FARLEY, 1969 b), met en évidence chez Mytilus edulis de Yaquina Bay (Orégon, USA) une prolifération de cellules, représentant probablement des hémocytes atypiques au niveau du conjonctif vésiculaire. Les cellules ont ici la particularité d'être binucléées, ce qui laisse à penser qu'elles sont le siège de divisions asynchrones.

FARLEY et SPARKS (1970) signalent des cas de maladie hémocytaire chez les huîtres Ostrea lurida, C.virginica et C.gigas de Yaquina Bay. Le tissu interstitiel de nombreux organes est envahi par des hémocytes hyalins présentant communément des mitoses et un noyau atypique. Bien que pour les auteurs il s'agisse d'un cas de néoplasie leucémique, ils n'excluent pas le rôle possible d'un parasite ou d'autres stress.

YEVICH et BARSZCK (1976) observent chez Mya arenaria de l'état de Maine (USA) une importante accumulation d'hémocytes néoplasiques. Le noyau de ceux-ci peut être lobé et montre de nombreuses mitoses atypiques.

FRIERMAN (1976) met en évidence chez C.virginica une prolifération au niveau du tissu interstitiel d'hémocytes hyalins atypiques dont le grand noyau peut présenter de fréquentes mitoses. Ces hémocytes provoquent également des embolies vasculaires. Chez certains sujets montrant de telles proliférations cellulaires, on note la présence simultanée d'une Haplosporidie Minchinia nelsoni.

BROWN et al. (1977) décrivent dans des populations de Mya arenaria de la Nouvelle Angleterre des proliférations de cellules hyalines parfois binucléées ou contenant un grand noyau fréquemment lobé. Dans ces hémocytes le rapport nucléo-cytoplasmique est le double de celui des cellules normales. Bien que l'étiologie de cette condition néplastique ne soit pas déterminée, l'action d'un agent infectieux n'est pas exclue. Des travaux ultérieurs (OPRANDY et al., 1981 COOPER et al., 1982) mettent en évidence l'action d'un virus dans le processus décrit chez Mya arenaria.

LOWE et MOORE (1978) font état d'une prolifération hémocytaire atypique chez Mytilus edulis de Plymouth (Angleterre). Le tissu conjonctif est infiltré d'hémocytes hyalins de grande taille, atypiques et dont le noyau présente une forte activité mitotique.

Enfin, MIX et al. (1979) observent des cellules atypiques chez des moules Mytilus edulis de Yaquina Bay (Orégon, Etats Unis). Etudiées en microscopie électronique ces cellules ont un diamètre de 15 μ m et un rapport nucléo-cytoplasmique égal à 0,66. Leur noyau est très polymorphe, souvent lobé, et contient de

multiples nucléoles. Dans le cytoplasme les mitochondries sont agrandies et présentent parfois des inclusions cristallines. L'appareil de Golgi est généralement hypertrophié. Dans les cellules les figures de mitose sont fréquentes. Bien que le type cellulaire de ces cellules ne soit pas déterminé avec certitude, il n'est pas exclu qu'elles puissent être des leucocytes. Elles semblent d'autre part être associées à une réponse à un stress lié à l'environnement.

2 - Observations en microscopie photonique.

Les observations en microscopie photonique des cas d'hyperplasie hémocytaire associée à Marteilia refringens ont permis d'une part de préciser les aspects topographiques du phénomène et d'autre part d'aborder la cytologie des hémocytes atypiques.

Ces hyperplasies atypiques ont été observées chez des huîtres âgées de 18 mois à 2 ans et rencontrées chez seulement 8 % de sujets parasités par M.refringens.

a - Données histologiques.

La manifestation histologique du phénomène de prolifération hémocytaire est caractérisée par une forte densité de cellules sanguines au niveau du tissu conjonctif de la glande digestive, c'est-à-dire dans tous les espaces situés entre les tubules et canaux digestifs, l'estomac et l'intestin (PL. VII, Fig. 15). Toutefois on note que la densité hémocytaire est maximale dans les zones situées au voisinage immédiat de la basale des épithéliums. Dans les autres zones la diffusion des cellules est généralement de moindre importance, si ce n'est au sein d'un grand nombre de petites lacunes formées dans le conjonctif. Au niveau de ces lacunes le tissu interstitiel est relativement dégradé et présente un maillage de fibres de collagène plus ou moins denses. Dans la glande digestive on observe également une accumulation importante d'hémocytes dans les sinus sanguins qui peuvent alors être complètement obstrués, provoquant ainsi de nombreuses embolies vasculaires (PL. VII, Fig. 16). Les épithélium digestifs, lorsqu'ils ne présentent pas de forme du parasite M.refringens, restent intacts. Enfin on n'observe jamais l'invasion des lumières des tubules ou diverticules par les hémocytes.

La prolifération hémocytaire s'étend aussi assez fortement au conjonctif du manteau, sans atteindre toutefois les épithéliums. D'autre part elle gagne également les gonades et les branchies.

En ce qui concerne la concomitance des deux phénomènes, parasitose et prolifération hémocytaire, il convient de souligner que cette dernière s'observe essentiellement alors que l'infection par M.refringens est à un stade avancé de sa sporulation.

b - Données cytologiques.

A partir de coupes à la paraffine, et de coupes semi-fines, nous avons pu préciser un certain nombre de caractères des hémocytes atypiques.

- Forme et taille : la forme des cellules atypiques est particulièrement visible sur coupes semi-fines. Isolées ou en contact entre elles, elles présentent le plus généralement un contour irrégulier souvent anguleux. Ces hémocytes ont un diamètre moyen de 7,5 μm et sont caractérisés par une forte anisocytose leur taille variant de 6,8 μm à 8,6 μm . Cette variation de taille correspond en général, comme nous le préciserons ultérieurement, à l'existence de formes uni ou polynucléées.

- Structure : alors que dans la majorité des cas les cellules possèdent un noyau unique, on observe fréquemment des formes polynucléées pouvant avoir jusqu'à 6 noyaux (PL. VII, Fig. 17). Ces hémocytes ont un diamètre supérieur à celui des hémocytes uninucléés. Les noyaux dont la chromatine dense semble irrégulièrement répartie dans le nucléoplasme ont un nucléole bien distinct ; leur forme est irrégulière. Dans les hémocytes les figures de mitose sont rares (PL. VII, Fig. 18). Elles sont marquées par des barres ou des plages très basophiles, irrégulières et réparties dans tout le cytoplasme.

Autour du noyau le cytoplasme non granuleux est réduit à une mince frange dont l'épaisseur est inférieure au micron, difficile à observer sur coupes à la paraffine. Sur coupes semi-fines il apparaît légèrement basophile et présente de petites vacuoles claires.

On peut observer enfin des cas de phagocytose de ces cellules par d'autres hémocytes (PL. VII, Fig. 19).

3 - Microscopie électronique.

La morphologie et l'ultrastructure des cellules atypiques ont été étudiées en microscopie électronique.

a - Morphologie des hémocytes.

De forme irrégulière la cellule est caractérisée par une membrane cytoplasmique très accidentée (PL. VIII, Fig. 20). On observe en effet à la périphérie des hémocytes d'une part de nombreuses extensions digitées du cytoplasme, de taille irrégulière et d'autre part un grand nombre de micro-pseudopodes également de nature cytoplasmique. Selon le plan de section des coupes, certains de ces pseudopodes semblent détachés des hémocytes et paraissent libres entre les cellules. Comme cela a été observé en microscopie photonique le cytoplasme est réduit en une mince couche autour du noyau. L'examen ultrastructural permet de préciser que le rapport nucléo-cytoplasmique est de 0.75 en moyenne (0.73 à 0.77).

b - Le cytoplasme.

Il est constitué d'un matériel finement granuleux, généralement homogène. Dans certains cas cependant il comporte de nombreuses vésicules de taille variée et de forme irrégulière (PL. IX, Fig. 23). Ces vésicules limitées par une membrane à deux feuillets bien que fréquemment vides, renferment parfois d'autres formations vésiculaires ou dans certains cas un matériel faiblement opaque. Le cytoplasme est également caractérisé par la présence de travées ergastoplasmiques et de nombreuses mitochondries. Ces dernières sont souvent regroupées en amas paraissant alors agglomérées dans un "ciment" de matériel dense (PL. IX, Fig. 21). Isolées ou groupées, les mitochondries ont dans la plupart des cas une forme allongée, donnant des figures mitochondriales avec notamment une distension des membranes limitant les citernes. On observe également dans le cytoplasme des hémocytes atypiques de nombreux grains assimilables à des ribosomes et que PODER (1980) interprète comme étant des ribonucléotides.

c - Le noyau.

Il a été observé en microscopie photonique que les hémocytes atypiques pouvaient être uninuclées ou polynuclées. La microscopie électronique confirme ces observations. Toutefois cette technique a permis aussi de mettre en évidence que non seulement le noyau est très polymorphe mais également que dans certaines cellules binuclées les deux noyaux pouvaient être en "contact" l'un de l'autre, la zone de contact entre les deux noyaux étant alors très particulière. Ces variations afférentes au noyau seront détaillées après que soit décrite l'ultrastructure de celui-ci.

- ultrastructure : limité par la membrane nucléaire le nucléoplasme comporte de très nombreuses petites granulations très denses aux électrons, arrondies et régulièrement disséminées. Des plages de chromatine sont réparties le plus généralement dans tout le nucléoplasme ; elles peuvent toutefois être regroupées en formation plus étendues, le plus souvent localisées à proximité de la membrane nucléaire, formant alors un liseré discontinu. Dans le noyau le nucléole est sphérique et a un diamètre moyen de 1,3 μm .

- particularités du noyau : certains hémocytes possèdent dans leur cytoplasme deux noyaux en "contact" étroit l'un de l'autre. Ces figures sont remarquables par le dispositif membranaire caractérisant la zone de contact entre les deux noyaux (PL. IX, Fig. 22). Cette zone présente généralement, les deux membranes nucléaires des noyaux juxtaposés, directement accolées avec toutefois entre elles du matériel granuleux dense. En certains endroits cependant on observe l'absence de ce matériel, absence qui identifie des lacunes, au niveau desquelles la membrane nucléaire de chaque noyau s'incurve vers l'intérieur de chacun d'eux. En d'autres points apparaît entre les deux membranes nucléaires voisines, une membrane identique à deux feuillets denses séparés par un espace clair ; entre cette membrane et les membranes nucléaires on observe une couche de matériel granuleux dense. Dans ce dernier cas l'espace entre les deux noyaux est double en dimension par rapport à celui dont les noyaux sont directement accolés.

Le noyau des hémocytes atypiques présente également la particularité d'être très pléomorphe. En effet bien que la plupart des hémocytes possèdent un noyau de forme générale arrondie et au contour régulier, dans de nombreuses autres cellules atypiques le noyau a un contour très irrégulier (PL. VIII, Fig. 20). L'irrégularité du profil du noyau conduit fréquemment à la formation

d'extensions en forme de lobes (PL. IX, Fig. 23). Ces extensions sont repliées contre la membrane nucléaire ou en sont nettement détachées ; selon le plan de section du noyau les lobes apparaissent de taille irrégulière, les plus petits étant réduits à de courtes digitations, les plus grands pouvant apparaître comme d'autres noyaux à l'intérieur de la cellule (PL. X, Fig. 24 et 25). Mais leur profil accidenté permet de les distinguer des noyaux des hémocytes polynucléés qui sont de forme plus régulière (PL. X, Fig. 26).

Discussion - conclusion.

De nombreux cas d'hyperplasies hémocytaires atypiques comparables à celui que nous venons de décrire ont été signalés chez les mollusques bivalves marins. Ceci tendrait à montrer que l'on se trouve en présence d'un phénomène largement répandu dans les différents secteurs où se sont développés des élevages ou subsistent des gisements naturels.

Les caractères de la prolifération hémocytaire atypique associée à M.refringens chez O.edulis présentent de nombreuses analogies avec ceux d'hémocytoses du même type signalées chez d'autres espèces. Ces analogies et particulièrement celles que l'on peut observer entre les lésions décrites chez le même hôte O.edulis, lésions dont nous rappelions précédemment les caractères essentiels (§ 1) permettent d'établir, que comme dans la plupart des processus décrits, l'hémocytose atypique associée à M.refringens est de nature néoplasique. La nature de l'hyperplasie que nous venons de décrire est confirmée si l'on se réfère aux critères topographiques et cytologiques donnés par BALOUET (1980) pour définir le caractère tumoral des proliférations hémocytaires observées chez O.edulis et que l'on peut résumer comme suit :

- topographie :

- . grande densité de cellules dans les zones interstitielles de la glande digestive.
- . extension des lésions autour de l'estomac, aux gonades et parfois aux branchies.
- . manchons cellulaires peri-vasculaires et embolies intravasculaires massives.

- cytologie ultrastructurale :

- . augmentation du nombre des mitochondries souvent déformées.
- . nombreux ribonucleotides dans le cytoplasme
- . invagination de la membrane nucleaire.

La multiplication des hémocytes étant assurée par des divisions avec mitoses, celles-ci étant observées, et les cellules atypiques pouvant être le siège de divisions asynchrones comme le suggère FARLEY (1969 b), les figures particulières de deux noyaux en "contact" que nous avons pu mettre en évidence dans certains hémocytes pourraient alors correspondre à des formes de fin de mitose précédant la division cytoplasmique. Pour ce qui concerne le signalement de leucocytes à plusieurs noyaux, la configuration régulière de ces derniers est telle qu'il n'est pas douteux qu'il s'agisse de véritables hémocytes polynucléés. Les formes nucléaires lobées pourraient alors correspondre à des figures de division. Les divisions nucléaires par amitose sans partition cytoplasmique conduisant aux formes polynucléées des hémocytes atypiques.

Quant à l'étiologie du phénomène elle peut être recherchée parmi plusieurs causes. En effet si on ne peut exclure que le processus néoplasique étudié, puisse être lié directement à la présence de M.refringens certaines observations empêchent de toute évidence, d'établir valablement un rapport entre la prolifération hémocytaire et la parasitose. Ainsi il convient de rappeler que de telles hyperplasies atypiques sont généralement observées hors de la présence de parasites et que lorsque exceptionnellement la concomitance du phénomène et d'une parasitose est signalée, le rôle du parasite n'a jamais été clairement établi (FRIERMAN, 1976 ; FARLEY et SPARKS, 1970) ou seulement envisagé comme pouvant être à l'origine d'un stress (PODER, 1980). On peut signaler d'autre part qu'au cours de nos propres recherches nous avons également observé des cas semblables d'hémocytoses à celui décrit ici, chez des huîtres ne présentant pas la parasitose à M.refringens.

Il semble donc que les causes du phénomène soient à rechercher parmi celles généralement avancées dans la bibliographie. La prolifération atypique observée chez O.edulis pourrait être associée à un stress lié aux conditions physico-chimiques du milieu comme le suggèrent de nombreux auteurs (ALDERMAN et al., 1977 ; MIX et al. 1979) ou d'origine biologique (fraie). La néoplasie pourrait aussi avoir pour origine des agents polluants (FARLEY, 1969 a). Enfin

on ne peut écarter la possibilité de l'action d'un virus dans le processus décrit. L'action d'un tel agent infectieux a été mise en évidence dans la condition néoplasique observée chez Mya arenaria. Bien que nous n'ayons pas identifié au cours de nos examens histologiques ou ultrastructuraux d'agent viral, nous ne pouvons rejeter une telle hypothèse n'ayant pas utilisé les méthodes d'isolement et de purification des virus.

D - Etude d'un cas d'hyperparasitisme de *Marteilia refringens* par une Microsporidie.

Introduction.

Au cours des études menées sur différents parasites de l'huître plate Ostrea edulis du bassin d'Arcachon, certains examens histologiques ont permis de noter l'existence de spores de Microsporidie dans les tissus de quelques spécimens d'huîtres. Localisé dans les diverticules digestifs, il s'est rapidement avéré que ce parasite, d'une part se trouvait associé à Marteilia refringens, cette présence simultanée rappelant un cas similaire observé chez la coque Cardium edule L. (COMPS et al., 1975) et par ailleurs représentait pour l'agent de la maladie de la glande digestive un hyperparasite.

Bien que de très nombreuses Microsporidies aient été signalées chez les invertébrés, rares sont les infections de mollusques bivalves marins par des parasites de ce groupe. Outre l'exemple de la coque précédemment cité, on signalera Steinhausia mytilovum FIELD, 1924 et Steinhausia ovicola LEGER et HOLLANDE, 1917 respectivement parasites des ovules de Mytilus edulis et de Ostrea edulis, rattachés aux Microsporidies seulement depuis 1972 par SPRAGUE et al. (1972).

Plus fréquents, sont chez les bivalves marins, les cas d'hyperparasitisme par une Microsporidie. Cette dernière a alors essentiellement pour hôte des vers plats de la classe des Trématodes. On peut signaler ici les identifications suivantes :

Nosema legeri DOLLFUS, 1912, dans des larves de Brachycoelium sp. parasites des Pélécy-podes Donax trunculus, Tellina fabula, T.tenius et T.solidula (GIARD, 1897).

Nosema legeri dans une métacercaire de Gymnophallus somateriae strigatus parasite de Donax vittatus (DOLLFUS, 1912).

Unikaryon legeri (DOLLFUS, 1912) CANNING et NICHOLAS, 1974 dans des métacercaires de Meigymnophallus minutus parasite de Cardium edule (CANNING et NICHOLAS, 1974).

Nosema dollfusi SPRAGUE, 1964 dans les sporocystes du Trématode Bucephalus cuculus parasite de Crassostrea virginica (SPRAGUE, 1964).

A ces cas on peut ajouter les observations de DOLLFUS (1946) qui reconnaît dans des larves de Lecithodendrium somateriae parasite mis en évidence par JAMESON en 1902 chez Mytilus edulis et Cardium edule, un hyperparasite similaire à N. legeri, et dans le même Trématode mis en évidence par DUBOIS en 1901 chez M. edulis des spores de Nosema.

Par référence à BOWERS et JAMES (1967) qui regroupent sous le nom de Meigymnophallus minutus les Trématodes cités Brachycoelium sp., Gymnophallus strigatus et Lecithodendrium somateriae et à CANNING et NICHOLAS (1974) qui ont transféré dans le genre Unikaryon CANNING, LAI et LIE, 1974 avec le nom Unikaryon legeri l'espèce Nosema legeri, on peut conclure que la plupart des cas d'hyperparasitisme connus chez les mollusques bivalves marins par une Microsporidie ont pour parasite le distome M. minutus et pour hyperparasite l'espèce Unikaryon legeri.

L'aspect original de la parasitose mise en évidence chez O. edulis nous a donc incité à en développer l'étude en microscopie électronique afin de préciser les caractéristiques et le cycle de développement de l'hyperparasite et d'étudier le rôle pathogène de la Microsporidie vis-à-vis de son hôte Marteilia refringens.

1 - Description du parasite.

Initialement décelée sur coupes histologiques à la paraffine, la Microsporidie a pu être étudiée par la suite sur coupes semi-fines et naturellement au plan ultrastructural en microscopie électronique.

a - Microscopie photonique.

Que ce soit sur coupes colorées par la technique de Mann-Dominici ou sur coupes colorées au bleu boracique de Sahli, on observe

dans les diverticules digestifs de l'huître au côté de formes normales de M.refringens des formes anormales du parasite (PL. XI, Fig. 27). Certaines en effet renferment à côté de cellules secondaires (PL. XI, Fig. 28) ou encore de sporontes (PL. XI, Fig. 29) des corps d'aspect ovoïde de petite taille (2 μ m environ), fortement colorés. D'autres sont presque entièrement occupées par de petites cellules aux affinités tinctoriales peu marquées (PL. XI, Fig. 30). Corps ovoïdes et petites cellules correspondent respectivement aux spores et aux différentes formes du cycle de développement de l'hyperparasite.

La microscopie photonique permet par ailleurs d'établir que l'infection est limitée à un petit nombre de formes de M.refringens et cela seulement dans quelques diverticules. Nous n'avons jamais observé d'infection généralisée.

b - Microscopie électronique.

Les examens en microscopie électronique ont confirmé d'une façon indiscutable que la Microsporidie se développait à l'intérieur de M.refringens (PL. XII, Fig. 31) et plus précisément dans le cytoplasme de la cellule primaire et constituait ainsi pour l'agent de la maladie de la glande digestive de l'huître plate un hyperparasite. Les différentes formes observées sont libres dans la cellule parasitée sans regroupement particulier. Les stades parasitaires sont en contact direct durant tout le cycle avec le hyaloplasme de la cellule hôte, les stades mérogoniques et sporogoniques n'en étant séparés que par leur membrane limitante et les spores par leur exospore.

- Cycle de développement : bien qu'il soit souvent difficile de séparer les différentes phases du cycle de développement du parasite, nous avons distingué les stades mérogoniques des stades sporogoniques, par référence à LOUBES (1979) en nous basant sur l'épaississement de l'enveloppe des éléments de la phase sporogonique.

α - Stades mérogoniques : bien qu'ils n'aient été observés que dans des cas très rares, les premiers stades de la Microsporidie mis en évidence dans le cytoplasme de M.refringens se présentent sous forme de cellules arrondies limitées par une membrane plasmique simple (PL. XIII, Fig. 33). L'appareil nucléaire y est représenté par un diplocaryon à nucléoplasme homogène et donc la membrane nucléaire est plus ou moins nette. Aucune organite n'est visible dans le hyaloplasme.

β - Stades sporogoniques : entre les stades mérogoniques et les spores nous n'avons pu mettre en évidence que des formes correspondant au début de la sporogonie. Cela pourrait être dû au fait que la sporogénèse soit rapide chez l'espèce étudiée. Ces éléments (PL. XIII, Fig. 34) qui ont valeur de sporonte sont de forme généralement arrondie et leur taille varie entre 2,3 et 3 μm . Leur contour peut être parfois modifié par les contacts qu'elles ont entre elles. Leur enveloppe est fortement épaissie par rapport à celle des formes mérogoniques. Elles renferment deux noyaux accolés en diplocaryon dont le nucléoplasme présente des amas de chromatine alors qu'il était uniforme dans les stades précédents. Le cytoplasme généralement clair contient du matériel granuleux souvent regroupé en amas ainsi que des formations réticulées (PL. XIII, Fig. 35) et de rares vacuoles.

- La spore : de forme ovoïde ou ellipsoïdale, les spores ont une longueur variant entre 2,3 et 2,8 μm pour une largeur comprise entre 1,5 et 1,9 μm . On note toutefois dans quelques cas un certain polymorphisme sporal avec des spores allongées en fuseau et au contour irrégulier dont la taille est sensiblement supérieure à celle des formes normales (4 μm x 1,8 μm).

La spore (PL. XIV, Fig. 36) est entourée d'une enveloppe sporale de 100 nm d'épaisseur constituée d'une exospore dense sans ornements et d'une endospore claire. L'importance relative de ces deux formations varie selon les fixations (artefacts) et vraisemblablement en fonction de l'âge de la spore.

A l'extrémité antérieure de la spore est visible sur certaines coupes le polaroplaste. Celui-ci est surmonté par le sac polaire en forme d'ancre (PL. XIV, Fig. 37) d'où émerge le filament polaire en un point : l'ouverture polaire. Le polaroplaste a une structure unique lamellaire et est traversé par la partie rectiligne du filament (PL. XIV, Fig. 38).

Le filament polaire est spiralé sur 5 à 6 tours dans la partie postérieure de la spore. Son diamètre uniforme de la partie proximale à la partie distale est de 120 nm environ. Sa structure est complexe. On distingue de l'intérieur vers l'extérieur (PL. XIV, Fig. 39) :

- un axe central peu dense aux électrons dont on admet généralement à la suite des travaux de VAVRA et al. (1966) qu'il constitue l'intérieur d'un tube. Cet axe est entouré d'une couche dense qui formerait alors la paroi du tube,

- une large couche claire dans laquelle on peut distinguer une fine partie dense,

- une partie large dense enveloppe les précédentes et est elle-même entourée d'une zone claire en contact avec le sporoplasme de la spore.

Enfin dans les spores, il semble que l'on puisse observer deux noyaux accolés en diplocaryon. Toutefois ce dernier n'est pas toujours bien distinct en raison de la grande opacité des spores.

2 - Données taxonomiques.

A la suite d'une première description de cet hyperparasite nous avons, en retenant parmi les caractéristiques essentielles la morphologie de la spore et surtout le cycle de développement aplanosporoblastique avec diplocaryon à tous les stades, rattaché cette Microsporidie au genre *Nosema* (COMPS et al., 1979). L'originalité de l'hôte a par ailleurs conduit à créer l'espèce nouvelle *Nosema ormieresi* COMPS, PICHOT et DELTREIL, 1979.

Ce rattachement au genre *Nosema* est confirmé à la suite de la présente étude par le type du cycle biologique de *Nosema ormieresi*. Il semblerait en effet que ce parasite ne présente aucun phénomène sexuel. Le seul fait que nous ayons pu observer au cours de la sporogonie étant une plasmotomie par bipartition cellulaire. Ce caractère de multiplication asexuée différencie le genre *Nosema* des autres genres de Microsporidie (LOUBES, 1979).

3 - Effets pathogènes de *Nosema ormieresi* sur *Marteilia refringens*.

Les effets pathogènes de *Nosema ormieresi* vis à vis de *Marteilia refringens*, différent non seulement selon les stades de la sporogénèse de la Microsporidie, mais également selon que l'hyperparasite infeste les formes jeunes ou les formes évoluées du cycle de développement de l'hôte.

Dans les formes jeunes de *M.refringens* aucun effet pathogène n'est visible lorsque le cytoplasme de la cellule primaire est infesté par les spores de la Microsporidie. Par contre, certains effets sont observés lorsque *M.refringens* est envahi par les cellules sporogoniques à diplocaryon de l'hyperparasite.

Dans ce cas les cellules secondaires de l'hôte sont rares et semblent dégénérées, étant le plus généralement de taille réduite ou difficilement indentifiables (PL. XV, fig. 40). Le cytoplasme de la cellule primaire reste intact et les particules denses et inclusions paracrystallines y subsistent.

Les effets cytopathogènes de N.ormieresi sont plus importants quand l'infestation microsporidienne est localisée dans les stades les plus évolués de M.refringens. Les altérations s'observent alors dans la cytoplasme de la cellule souche de l'hôte et dans les sporanges.

Lorsque les cellules sporogoniques à diplocaryon de la Microsporidie prédominent, le cytoplasme de la cellule primaire de M.refringens environnant les sporanges présente de nombreuses vacuoles de 0,5 à 1 μ m de diamètre (PL. XV, fig. 41). Simultanément le cytoplasme des cellules secondaires limitées par une paroi fortement amincie, est condensé autour des cellules tertiaires. Dans ce cytoplasme les mitochondries sont rares.

Lorsque au contraire, on observe essentiellement les spores de N.ormieresi dans les formes à sporanges de M.refringens, le cytoplasme de la cellule primaire de l'hôte est fragmenté et condensé en masses cytoplasmiques de forme irrégulière (PL. XV, fig. 42). Les particules denses sont incluses dans les masses cytoplasmiques alors que les structures paracrystallines apparaissent généralement libres dans la cellule. Dans les sporanges qui présentent une ou plusieurs masses protéiniques amorphes sont visibles des travées cytoplasmiques (PL. XV, fig. 43). Dans ces sporanges dégradés le nombre de cellules tertiaires est réduit. Enfin aucune paroi n'est visible aussi bien autour des sporanges que autour des cellules tertiaires.

Discussion - conclusion.

Si les données ultrastructurales du cycle de développement et la spore de Nosema ormieresi n'apportent que peu d'éléments intéressants directement les problèmes posés actuellement chez les Microsporidies et en particulier la structure taxonomique de ce groupe où ceux relatifs à la sexualité, l'étude du cas d'hyperparasitisme de M.refringens, présente un grand intérêt sous plusieurs aspects.

Elle représente le seul cas d'hyperparasitisme signalé chez l'agent de la maladie de la glande digestive de l'huître plate. Des associations parasitaires ont bien été signalées conjointement à la présence de M.refringens mais la concomitance n'a jamais conduit au parasitisme de M.refringens par les agents avec qui il était associé. Ce fut le cas de la présence simultanée d'une Microsporidie avec M.refringens observé chez la coque Cardium edule, ou encore celui

que nous évoquerons ultérieurement de l'observation chez une même huître O.edulis du Bassin d'Arcachon, au côté de M.refringens de Ciliés du genre Ancistrocoma et de l'Haplosporidie H.armoricanum.

Elle montre également que M.refringens agent hautement pathogène se révèle être très sensible à une infection parasitaire, comme l'atteste notre étude des effets pathogènes de N.ormieresi vis à vis de son hôte.

CONCLUSION.

Les recherches effectuées sur M.refringens agent de la maladie de la glande digestive de l'huître plate O.edulis, permettent de préciser certains aspects de la biologie de cet organisme.

L'étude du développement de M.refringens dans l'étang de Thau, montre que si le cycle complet du parasite peut s'accomplir dans ce biotope, les conditions hydrobiologiques particulières du milieu, soit par une action directe sur le parasite, soit en modifiant les réactions de l'hôte peuvent transformer certains aspects de ce cycle.

L'étude des effets pathogènes de M.refringens vis à vis de son hôte met en évidence que l'action pathogène du parasite non seulement conduit à la destruction des épithéliums digestifs de l'huître, mais également s'exerce en interférant avec le métabolisme protéique d'O.edulis.

L'étude des proliférations hémocytaires atypiques associées à M.refringens aboutit à préciser la structure des cellules impliquées dans le phénomène et la nature néoplasique du processus. Bien que l'étiologie de l'hémocytose ne puisse être déterminée avec certitude, la concomitance de l'hyperplasie et de la parasitose, ne permet pas d'écarter complètement l'action du pathogène comme origine de la prolifération.

Enfin le cas d'hyperparasitisme de M.refringens par une Microsporidie fourni les éléments ultrastructuraux des stades du cycle de développement de N.ormieresi en particulier ceux de la spore, et montre la sensibilité de l'hôte à l'infestation microsporidienne, N.ormieresi pouvant altérer de façon importante certains stades de M.refringens.

Nous reviendrons dans le dernier chapitre de notre étude, sur un certain nombre d'observations à faire consécutives à ces résultats

CHAPITRE IV

RECHERCHES SUR UNE HAPLOSPORIDIE HAPLOSPORIDIUM

ARMORICANUM PARASITE D'OSTREA EDULIS

DU BASSIN D'ARCACHON

INTRODUCTION.

La persistance de la "maladie de la glande digestive" d'Ostrea edulis sur les côtes françaises de l'Atlantique a conduit à examiner de façon systématique des lots de cette espèce d'huître afin de surveiller l'évolution de l'épizootie due à Marteilia refringens.

C'est au cours de ces examens qu'a pu être mis en évidence chez des huîtres plates natives du bassin d'Arcachon, un Protozoaire parasite du groupe des Haplosporidies, Haplosporidium sp. (PICHOT et al., 1979 b).

Bien que des contrôles d'huîtres plates du bassin d'Arcachon aient été effectués tout au long de l'année 1980, le parasite n'a été décelé qu'au cours du mois de juin. Trois cas d'infestation ont alors été observés dans un lot de 40 sujets âgés de 2 et 4 ans examinés. Le développement du parasite est donc resté très limité et n'a pas provoqué de mortalité.

Il apparaît donc, que comme une autre Haplosporidie Minchinia armoricana décrite chez le même hôte par VAN BANNING (1977, 1979) et CAHOUR et al. (1980), ce protiste n'a pour le moment qu'un rôle pathogène très limité vis à vis de l'huître plate.

Cependant compte tenu que ce Protozoaire appartient au même groupe que les parasites du genre Minchinia, dont deux espèces M.nelsoni et M.costalis ont décimé l'huître américaine Crassostrea virginica, il revêt un rôle pathogène potentiel important pour l'huître plate.

C'est la raison pour laquelle nous avons développé, plus particulièrement en microscopie électronique, l'étude de la sporogénèse et de la structure de la spore de ce parasite et en microscopie photonique ses effets pathogènes vis à vis de l'hôte.

I - EXAMENS SUR LE FRAIS.

Les huîtres infestées sont caractérisées par une coloration blanchâtre de la masse digestive et des branchies alors que les individus sains présentent une masse digestive fortement pigmentée et des filaments branchiaux grisâtres. Aucune lésion externe n'est observée.

Des étalements réalisés à partir de tissus frais montrent des spores de forme ovoïde mesurant de 4,5 à 5 μm par 3,5 à 4,5 μm , avec un pôle tronqué ou est visible l'opercule. De chaque pôle de la spore partent deux prolongements effilés ou "queues" de 20 μm de long en moyenne (PL. XVI, fig. 44).

II - ETUDE DE L'INFESTATION EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Les coupes réalisées en histologie classique après inclusion des tissus dans la paraffine, permettent de préciser la localisation du parasite chez l'hôte. Elles mettent également en évidence l'existence de différentes formes du Protozoaire dont les caractéristiques ont pu être précisées à partir de l'observation de coupes semi-fines.

A - Localisation du parasite.

Les différentes formes du parasite sont observées principalement dans la masse digestive et dans les branchies de l'huître. Mais on note également, bien qu'à un degré moindre d'infection leur présence dans les palpes labiaux et le manteau.

Dans la masse digestive, l'Haplosporidie gagne tous les tissus. On observe en effet tous les stades du cycle du parasite aussi bien dans le conjonctif interstitiel, que dans les épithéliums digestifs ou dans les sinus sanguins. Dans les branchies, le Protozoaire envahit le conjonctif des zones de jonction interfilamentaire et les filaments branchiaux. Enfin dans les palpes et le manteau seules les formes plasmodiales ont été observées.

La localisation du parasite sera précisée dans l'étude des effets histopathogènes qui seront développés ultérieurement.

B - Les formes parasitaires.

Les formes parasitaires observées en microscopie photonique suggèrent un processus évolutif aboutissant à la formation des spores. Ce processus correspond au cycle de développement généralement observé chez les Haplosporidies.

Il convient ici de signaler comme l'a fait PERKINS (1969) dans son étude de la sporulation de Minchinia costalis, que la terminologie utilisée pour la présentation des différentes formes du parasite, est celle que l'on trouve dans la littérature relative aux Haplosporidies. Ainsi, en particulier, les termes sporonte, sporoblaste et sporocyste n'impliquent pas l'existence d'un processus sexuel dans le développement d'Haplosporidium armoricanum.

Les premiers stades du cycle de développement du parasite sont représentés par des plasmodes dont deux types sont identifiables (PL. XVI, fig. 45).

Le premier type correspond à des petits plasmodes de forme le plus généralement arrondie dont le diamètre varie de 4 à 5 μm . Quelques plasmodes ovoïdes ou fusiformes peuvent également être observés. Le cytoplasme d'aspect homogène et fortement coloré par le bleu de Sahli contient un, deux ou quatre noyaux dont le diamètre moyen est de 1,5 μm et quelques inclusions claires.

Le second type comprend des plasmodes au contour très sinueux et de forme générale allongée. Leur longueur varie de 12 à 20 μm et leur largeur est comprise entre 6 et 10 μm . Dans le cytoplasme moins dense que celui des petits plasmodes, les noyaux arrondis ont un diamètre moyen de 2 μm . Leur nombre évalué sur les coupes se situe le plus fréquemment entre 6 et 10. Au côté de noyaux isolés on peut observer des noyaux groupés par 2 ou par 3. Dans les noyaux le nucléole se présente sous forme d'une petite granulation fortement basophile située en position pariétale. Le cytoplasme contient également des inclusions claires identiques à celles des petits plasmodes, et de rares petites granulations très denses.

La première phase d'évolution de ces plasmodes (PL. XVI, fig. 46) est marquée par un accroissement de la taille, par une augmentation du nombre des noyaux et par la prolifération des granulations denses observées dans les grands plasmodes. Par ailleurs le profil général de ces formes est plus arrondi et régulier que celui des grands plasmodes.

La phase suivante (PL. XVI, fig. 47) est caractérisée par un découpage du cytoplasme aboutissant à l'intérieur de la paroi des nouveaux éléments, à des fragments cytoplasmiques polymorphes, multilobés et polynucléés. Ces formes

peuvent être assimilées à des syncytiums suivant la terminologie utilisée par ORMIERES et al. (1973). Ce processus conduit à l'isolement de chaque noyau au sein d'unités cytoplasmiques qui acquièrent une forme régulière, arrondie de 3 à 4 μm de diamètre. A ce stade on a affaire à des sporoblastes contenus dans un sporonte (PL. XVI, fig. 48). Sur coupes médianes, le nombre de sporoblastes est en moyenne de 25. Dans le sporonte subsistent entre les sporoblastes quelques fragments de cytoplasme. Les granulations denses basophiles se retrouvent incluses dans le cytoplasme des sporoblastes.

La structure des sporoblastes se modifie avec l'apparition dans leur cytoplasme d'une aire basophile arrondie à côté du noyau et de vacuoles peu chromophiles et avec l'acquisition d'un cytoplasme concentrique externe. Cette transformation marque l'évolution des sporoblastes en préspores (PL. XVI, fig. 49). Le sporonte devient alors un sporocyste.

Le cycle s'achève par le développement des préspores en spores (PL. XVI, fig. 50). Dans les sporocystes on peut distinguer deux types de spores suivant leur état de maturité. Les spores jeunes sont peu basophiles. On distingue dans le sporoplasme des éléments de leur structure. Les deux prolongements cytoplasmiques partant de chacun des pôles sont également bien visibles. Les spores "mûres" présentent au contraire une grande affinité au bleu de Toluidine. De ce fait aucune structure interne n'est observable. Seul l'opercule est bien visible. Les prolongements cytoplasmiques ou "queues" sont rares. Chaque sporocyste ne renferme que des spores au même stade de maturation. Le nombre de spores par sporocyste sur un plan de coupe peut atteindre 33.

III - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU PARASITE.

La microscopie électronique a permis de préciser l'ultrastructure des formes du parasite observées en microscopie photonique. Elle a également mis en évidence certains aspects de l'évolution de ces formes non décelés en photonique apportant ainsi les éléments nécessaires à l'établissement du cycle de développement de l'Haplosporidie étudiée.

A - Description des formes plasmodiales.

Les petits plasmodes observés en microscopie photonique, sont caractérisés en microscopie électronique (PL. XVII, fig. 51) par une membrane plasmique unitaire peu plissée et un cytoplasme riche en ribosomes parfois agglomérés. Dans ces plasmodes les noyaux sont toujours appariés en diplocaryon. La forme des noyaux est alors régulièrement arrondie sauf dans la zone où les membranes nucléaires sont vis à vis, le profil étant aplati et les membranes séparées par un espace internucléaire de 33 nm en moyenne. Fréquemment au centre de cette zone de contact les membranes nucléaires s'incurvent vers l'intérieur des noyaux aménageant une chambre internucléaire. Le nucléoplasme renferme un nucléole très réfringent situé contre la membrane nucléaire. Le cytoplasme des plasmodes contient également de volumineuses mitochondries pouvant atteindre 1 μm de diamètre, et de grosses granulations denses aux électrons. Ces granulations non structurées et rondes ont un diamètre de 0,4 μm . Elles peuvent être identifiées aux gouttelettes lipidiques que l'on retrouve en particulier chez Minchinia sp. du crabe Panapeus herbstii (PERKINS, 1975 b) ou Minchinia armoricana (CAHOUR et al. 1980). On peut observer aussi dans le hyaloplasme des corpuscules denses, sphériques à structure bipartite de 150 à 200 nm correspondant aux haplosporosomes de PERKINS (1971). Ceux-ci présentent (PL. XVII, fig. 52) une zone interne dense aux électrons de 154 nm de diamètre en moyenne, séparée d'une zone externe également dense de 24 nm d'épaisseur, par une zone moyenne claire.

Les grands plasmodes (PL. XVII, fig. 53) sont limités par une membrane constituée par un seul feuillet sombre de 55 nm d'épaisseur et présentant de très nombreuses villosités. Sur sa face externe (PL. XVIII, fig. 54) sont visibles accolées à elle, des microformations circulaires, qui pourraient correspondre à la phase initiale de la formation des villosités. Dans le cytoplasme de ces plasmodes, la densité des ribosomes est plus faible que celle des petits plasmodes, ce qui explique la différence de basophilie observée en microscopie photonique entre les deux types de plasmode. Le cytoplasme ne contient pas d'haplosporosome. Il renferme de nombreuses mitochondries à crêtes distinctes dont les plus grandes voisinent 1,3 μm de diamètre. On peut observer aussi un grand nombre de granulations denses aux électrons, identiques aux gouttelettes lipidiques des petits plasmodes, mais de diamètre plus grand, celui-ci variant de 0,5 à 0,7 μm . Si les granulations de réserve sont dispersées dans tout le cytoplasme, les mitochondries sont pour la plupart rapprochées des noyaux qui occupent dans le cytoplasme une position centrale. Les noyaux bien que parfois isolés apparaissent le plus

souvent en diplocaryons et quelques-fois associés par trois. Entre les noyaux peuvent être visibles un espace et une chambre internucléaires dans le cas des diplocaryons ou un espace perinucléaire lorsque trois noyaux sont associés (PL. XVIII, fig. 57). Les noyaux de ces plasmodes diffèrent de ceux des petits plasmodes par leur forme générale allongée et leur contour très irrégulier. Ils sont aussi plus grands pouvant mesurer jusqu'à 2,2 μm . Leur nucléoplasme possède de nombreux amas de chromatine et un nucléole dense aux électrons. Certains noyaux présentent un faisceau de microtubules parallèles les uns aux autres (PL. XVIII, fig. 57), à chaque extrémité duquel est visible, sur certaines coupes un corps polaire (PL. XVIII, fig. 58) Microtubules et corps polaires constituent ce que JIROVEC (1936) appelle "Kernstab". Les grands plasmodes sont également caractérisés par la présence dans le cytoplasme d'un réseau de deux feuilletts parallèles qui entoure l'ensemble des noyaux mais aussi s'insinue entre eux (PL. XVIII, fig. 55 et 56).

L'existence d'une paroi épaisse limitant le cytoplasme des grands plasmodes et l'absence d'haplosporosome, font que ces éléments pourraient être en fait assimilés à des sporontes si l'on se réfère à PERKINS (1971, 1975 b) qui distingue par ces caractères les plasmodes végétatifs des plasmodes entrant dans la sporulation ou sporontes précoces. Nous conviendrons toutefois par souci de simplicité et par référence à CAHOUR et al. (1980) et VIVARES et al. (1982) qui nomment également plasmodes les éléments identiques à ceux que nous présentons comme grands plasmodes chez Haplosporidium armoricanum de conserver cette terminologie, et de réserver le terme de sporonte précoce au stade suivant du cycle du parasite.

B' - Sporontes et formation des sporoblastes.

L'évolution des grands plasmodes en sporontes précoces se fait d'une part par la prolifération des noyaux dans tout le cytoplasme et d'autre part par l'accumulation contre les feuilletts du réseau interne alors bien marqué, sur leur face en relation avec le cytoplasme, de matériel dense sous forme de nodules ou de structures continues (PL. XIX, fig. 59). Ce matériel pourrait être des grains de ribosomes, de semblables formations étant également observées disséminées dans le cytoplasme de ces sporontes.

La microscopie photonique avait permis d'observer que le premier stade de la formation des sporoblastes est caractérisé par la fragmentation du cytoplasme des formes présentant de nombreux noyaux disséminés dans tout le cytoplasme,

individualisant des masses cytoplasmiques polymorphes et polynucléées. L'étude en microscopie électronique confirme ces observations (PL. XIX, fig. 60 et 61). Ces masses cytoplasmiques sont limitées par une fine membrane simple contre laquelle subsiste le matériel dense observé contre les membranes du réseau interne des sporontes précoces. Cette structure permet d'établir que la fragmentation du cytoplasme s'opère à partir de la séparation des deux feuilletts du réseau de ces sporontes.

Dans ces masses cytoplasmiques les mitochondries et inclusions denses sont nombreuses. Toutefois les mitochondries sont plus petites que celles des plasmodes, mesurant de 0,5 à 0,7 μm .

Le stade suivant est marqué par la scission des masses polynucléées pour donner des unités uninucléées. Cette scission semble ici consécutive à des constriction du cytoplasme (PL. XIX, fig. 62). D'abord de forme irrégulière les unités s'arrondissent donnant les sporoblastes (PL. XX, fig. 63).

Dans les sporontes, dont la membrane qui les limite reste très accidentée, les sporoblastes ont un noyau de 1,8 μm de diamètre en moyenne, des mitochondries et des inclusions denses lipidiques de 0,5 μm de diamètre. Parmi ces sporoblastes aucune forme binucléée n'a été observée. Quelques sporoblastes montrent dans leur cytoplasme des condensations de matériel dense qui pourraient correspondre à la phase initiale de la formation de la sphérule présente dans les futures spores. Dans d'autres sporoblastes cette sphérule apparaît déjà bien marquée (PL. XX, fig. 64). Elle est également constituée de matériel dense, en amas, enfermés dans une grosse vacuole formée dans le cytoplasme.

C - Sporocystes et formation des spores.

L'évolution des sporoblastes est marquée par l'apparition d'un cytoplasme externe autour de ces formes donnant ce que l'on peut identifier comme des prés pores. Bien que nous ne puissions définir avec précision l'origine du cytoplasme externe ou extrasporoplasme, certaines figures (PL. XX, fig. 65), semblent indiquer qu'il peut provenir de fragments cytoplasmiques anucléés, présents dans le sporonte, englobant progressivement les sporoblastes. L'englobage pouvant être précédé par un rapport particulier s'établissant entre le sporoblaste et la masse cytoplasmique anucléée (PL. XX, fig. 64). Ce rapport est caractérisé par la formation d'un matériel fin au niveau de la zone de contact des deux éléments.

Les préspores à deux cytoplasmes concentriques évoluent en spores à la suite de la formation d'une paroi entre le sporoplasme et l'extrasporeplasme et d'un opercule.

La paroi semble formée par l'accumulation progressive de matériel dense à proximité de la membrane interne du cytoplasme extrasporeplasmique. D'abord sous forme de dépôts irréguliers, visibles chez les spores jeunes (PL. XXII, fig. 69), ce matériel s'accumule pour former une paroi continue fine au cours de la maturation des spores et donne une paroi épaisse à la spore mûre. La membrane interne de l'extrasporeplasme devient la couche interne de la paroi sporale, l'accumulation de matériel dense en devenant la couche externe. Entre ces deux couches est constituée la couche moyenne de la paroi.

L'opercule quant à lui semble être formé au niveau de la zone de jonction de l'extrasporeplasme après que celui-ci ait englobé le sporoplasme interne (PL. XX, fig. 66).

Bien que le processus de formation des spores à partir des sporoblastes soit celui le plus fréquemment observé, nous avons pu mettre en évidence dans un cas exceptionnel, des spores formées avant fragmentation et condensation du cytoplasme des "plasmodes" donc sans formation de sporoblastes initiaux (PL. XXI, fig. 68). Dans ce cas l'opercule semble être formé par une évagination à angle droit de la paroi dans l'extrasporeplasme (PL. XXI, fig. 67).

D - Description de la spore.

En microscopie électronique les dimensions de la spore varient entre 2,5 et 3,5 μm sur 3 à 5 μm . Dans la spore, trois parties peuvent être distinguées : le cytoplasme interne ou sporoplasme contenant en particulier une sphérule, un noyau, des haplosporosomes et des mitochondries ; la paroi sporale à laquelle on peut associer l'opercule et les filaments ; enfin le cytoplasme externe ou extrasporeplasme.

1 - Le sporoplasme.

Fortement vacuolisé chez la spore jeune, il se densifie avec la maturation de la spore. Limité par une fine membrane simple, de nombreux organites y sont présents.

a - La sphérule.

Située juste au dessous de l'opercule, la sphérule à qui on attribue la fonction d'un appareil de Golgi (PERKINS, 1968 ; ROSENFELD et al., 1969) et qui pourrait avoir un rôle dans l'ouverture de l'opercule (ORMIERES et PUYTORAC, 1968) où dans la polarisation de la spore et le contrôle de la différenciation des structures antérieures de celle-ci (SPRAGUE, 1963 b), occupe une grande partie du cytoplasme. Elle paraît constituée (PL. XXII, fig. 69) par un réseau enchevêtré de deux membranes parallèles espacées de 22 nm. A l'intérieur de la sphérule sont visibles des amas de matériel dense aux électrons de forme allongée ou en corpuscules de 70 nm. Associés à la sphérule des formations allongées terminées en massue partent se disséminer dans le cytoplasme et dans l'espace compris entre la paroi de la spore et le sporoplasme (PL. XXII, fig. 70 et 71). Ces amas de matériel dense et ces formations allongées particulièrement visibles chez les spores jeunes sont appelés respectivement granules et corps sécréteurs par ROSENFELD et al. (1969). Dans le sporoplasme les corps sécréteurs sont nombreux et leur extrémité arrondie est très variable en taille.

b - Le noyau.

Situé dans la région postérieure de la spore, la région antérieure étant celle de l'opercule (SPRAGUE, 1963 b), le noyau (PL. XXIII, fig. 72) est volumineux ayant un diamètre de 1,5 μm . Il présente un important nucléole de 0,4 μm le plus souvent situé en position pariétale. Dans le nucléoplasme sont fréquemment présents des amas de chromatine.

c - Les haplosporosomes.

Ces organites ainsi nommés par PERKINS (1971) ne sont visibles que chez les spores mûres c'est à dire celles possédant une paroi sporale épaisse. Très nombreux, ils sont localisés dans tout le sporoplasme. Leur structure est bipartite. Ils sont constitués (PL. XXIV, fig. 77) par un volume interne ou cortex dense aux électrons entouré d'une enveloppe externe ou médulla également dense. Une zone claire sépare ces deux structures. Cet ensemble est entouré d'une fine membrane dense. De forme parasphérique ou en bâtonnet, ils mesurent de 100 à 200 nm. Un haplosporosome moyen de 150 nm a un cortex de 108 nm de diamètre et une médulla de 20 nm d'épaisseur.

d - Les mitochondries.

De 0,6 μm de diamètre en moyenne elles présentent des crêtes bien distinctes (PL. XXII, fig. 69).

e - Les corps denses.

Ces corps (PL. XXIV, fig. 77) de forme allongée ou sphérique ont des dimensions très variables puisque mesurant de 100 à 300 nm. Généralement localisés parmi les haplosporosomes ils présentent un fin feuillet externe séparé d'une partie dense centrale par un espace clair. Bien que nous n'ayons pu observer de façon précise la structure de la partie dense centrale, l'épaississement de la pellicule externe de certains de ces corps donne des images identiques aux inclusions formatrices des haplosporosomes décrites par PERKINS (1975 b) chez Minchinia sp.

f - Les autres organites.

Outre les éléments décrits précédemment, le sporoplasme contient des vésicules, des vacuoles, de grosses inclusions denses non structurées et des fragments de reticulum endoplasmique.

Les vésicules (PL. XXIV, fig. 76) arrondies sont nombreuses et très variables en taille. Elles sont constituées d'une partie interne peu dense aux électrons entourée d'une enveloppe externe dense. Une zone claire sépare les deux parties.

Les vacuoles qui comme nous l'avons signalé sont importantes chez les spores jeunes, sont réduites chez les spores en cours de maturation ne mesurant que 0,3 μm et disparaissent dans les spores mûres.

Les inclusions denses amorphes (PL. XXII, fig. 69) sont de forme ovoïde avec une longueur moyenne de 350 nm et un diamètre moyen de 260 nm. Leur taille peut toutefois atteindre 500 nm. Ces inclusions sont identiques aux inclusions lipidiques décrites par PERKINS (1968) chez Minchinia nelsoni.

Enfin le reticulum endoplasmique est lisse.

2 - La paroi, l'opercule et les filaments.

Épaisse de 0,1 μm la paroi sporale qui forme un étui au sporoplasme est constituée de trois couches superposées (PL. XXII, fig. 69). Une couche interne d'apparence discontinue qui, bien que fine ne mesurant que 5 nm est très dense aux électrons ; une couche moyenne claire de 10 à 15 nm d'épaisseur et une couche externe dense de 95 nm. Cette dernière est elle même formée d'une succession de trois parties denses séparées par deux claires (PL. XXIV, fig. 74). Les parties denses sont constituées de deux feuilletts parallèles. Chez les spores jeunes cette couche ne présente que deux parties denses séparées par une claire. La structure en lamelles parallèles aux marges de cette couche est fréquente chez les Haplosporidies (PERKINS, 1969, 1971, 1975 b ; ORMIERES, 1980 ; BALL, 1980). Elle diffère cependant de celle de *Minchinia cadomensis* MARCHAND et SPRAGUE, 1979 (MARCHAND et SPRAGUE, 1979) et de *M. nelsoni* (ROSENFELD et al., 1969) qui présentent des stries perpendiculaires à ces marges.

L'opercule (PL. XXIII, fig. 72 et 73) forme clapet sur un orifice circulaire de 1 à 2 μm de diamètre créé dans la paroi sporale au pôle opposé à celui de la zone du noyau. Le pourtour de l'orifice est bordé par un repli vers l'extérieur de la paroi sporale. Ce repli est en liaison avec le bord libre de l'opercule qui s'étend au-delà de l'orifice par l'intermédiaire de filaments d'interconnection. Le repli et le bord libre de l'opercule s'incurvent vers l'extérieur à leur extrémité, contre la membrane externe de l'extrasporeplasme. L'opercule qui est recouvert de cytoplasme extrasporal est solidaire de la paroi sporale au niveau d'une charnière. Celle-ci est formée par l'invagination de la paroi dans l'extrasporeplasme. La structure de la partie de l'opercule recouvrant l'orifice est la même que celle de la paroi. Celle du repli et du bord libre de l'opercule est différente. Elle n'en possède pas les couches interne et moyenne et la couche externe est moins épaisse.

Les filaments dont le nombre varie de 2 à 4, sont insérés à la paroi sporale (PL. XXIV, fig. 74). Rarement observés sur les coupes des spores jeunes, ils pourraient être formés durant le développement de la spore. Ils s'étendent dans deux étirements en forme de queue du cytoplasme extrasporoplasmique ou ils forment de nombreux replis (PL. XXIV, fig. 78). Ces filaments sont formés d'un axe central fin dense aux électrons, enveloppé dans une gaine plus claire de 80 nm de diamètre. Sur section transversale l'axe central semble être une formation tubulaire (PL. XXIV, fig. 75).

3 - L'extrasporoplasme.

Ce cytoplasme qui constitue chez la spore jeune une enveloppe concentrique au sporoplasme présente chez la spore mûre deux étirements en forme de queue. Ces étirements se font dans un axe légèrement décalé par rapport à l'axe polaire de la spore. Riche en ribosomes l'extrasporoplasme comporte outre les filaments de nombreuses mitochondries et quelques rares inclusions lipidiques. Il est limité par une membrane externe simple.

IV - ASPECTS PARTICULIERS DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU PARASITE.

Les éléments ultrastructuraux fournis à la suite de notre étude d'Haplosporidium armoricanum nous amènent, en particulier en les comparant avec ceux observés chez d'autres Haplosporidies à préciser certains aspects du cycle de développement du parasite.

Les premiers stades du cycle de développement d'Haplosporidium armoricanum représenté schématiquement PL. XXV, fig. 79, sont caractérisés par des plasmodes dont on peut admettre qu'ils évoluent de cellules uninucléées en formes binucléées puis polynucléées. Bien qu'aucune figure de mitose n'ait été observée en particulier dans les nombreuses formes binucléées et à quatre noyaux rencontrées, il paraît probable que l'augmentation du nombre des noyaux, soit consécutive à des caryocinèses successives. Ce type de développement est généralement proposé à ce stade du cycle des Haplosporidies (FARLEY, 1967 ; PERKINS, 1969, 1975 b). Ce même processus intervient dans la prolifération des noyaux lors de l'évolution des grands plasmodes en sporontes précoces ou dans ces deux catégories d'éléments sont visibles dans les noyaux l'appareil mitotique ou "kernstab". L'absence de signe évident de cytogamie et de caryogamie (la présence de diplocaryon n'étant pas la preuve d'une fusion nucléaire, les éléments le constituant pouvant au contraire se séparer) ou de méiose (à laquelle sont associés des complexes synaptonématiques) semble exclure l'existence d'un phénomène sexuel dans le cycle d'H.armoricanum. A ce stade, le développement du parasite d'Ostrea edulis s'oppose à celui de M.nelsoni proposé par FARLEY ou interviennent dans l'évolution des formes uninucléées en jeunes sporontes des phases asexuée et sexuée.

Simultanément à l'augmentation du nombre des noyaux, il a été observé que les grands plasmodes acquièrent une paroi épaisse dont la face externe ne présente que des microformations circulaires. Cette paroi reste donc simple comme chez M.armoricana (CAHOUR et al., 1980), sans pellicule externe comparable

à celle visible autour des plasmodes de M.cadomensis décrite par MARCHAND et SPRAGUE (1979) ou de l'Haplosporidie décrite par VIVARES et al. (1982).

A partir des sporontes précoces, la sporogénèse d'H.armoricanum semble caractérisée par l'existence de deux processus de formation des spores.

Dans le premier processus la sporogénèse débiterait directement dans les "sporontes précoces" sans formation initiale de sporoblaste comme cela est généralement observé chez les Haplosporidies. Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence l'origine de l'individualisation des deux cytoplasmes concentriques de la spore dans ce processus, on peut concevoir que la délimitation du sporoplasme et de l'extraporoplasme se réalise comme cela est signalé chez M.costalis (PERKINS, 1969) ou chez Minchinia sp. (PERKINS, 1975 b), c'est à dire :

- soit par invagination à une extrémité de la spore de la membrane délimitant le sporoplasme externe (celle du sporoblaste chez les espèces citées, celle du réseau interne du sporonte précoce chez H.armoricanum) et progression de cette membrane dans le cytoplasme,

- soit par déploiement de citernes du reticulum endoplasmique, "tail-lant" ainsi le sporoplasme.

Dans le second processus, les spores seraient formées après que dans les sporocystes se soient individualisés les sporoblastes et des fragments anucléés de cytoplasme. Selon nos observations il semblerait que l'extraporoplasme soit formé à partir de ces éléments anucléés englobant progressivement les sporoblastes ou par pénétration de ces derniers dans les fragments cytoplasmiques. Un tel processus est également observé chez M.armoricana (CAHOUR et al., 1980).. Toutefois on ne peut écarter que le phénomène puisse se rapprocher de celui décrit par ORMIERES et al. (1973) chez Urosporidium jiroveci ORMIERES, SPRAGUE et BARTOLI, 1973. Chez cette espèce le cytoplasme des jeunes sporoblastes subit une constriction délimitant un "sporoplasme primordium" et une "enveloppe primordium". Cette dernière en englobant le "sporoplasme primordium" devient l'exospore. Cependant l'absence de sporoblastes binucléés chez H.armoricanum, alors que ceux d'U.jiroveci ont deux noyaux dont celui de "l'enveloppe primordium" dégénère, et l'absence d'observation d'image de constriction du cytoplasme des sporoblastes, nous incite à reconnaître que chez le parasite de l'huître plate le phénomène d'acquisition de l'extraporoplasme diffère de celui observé chez U.jiroveci.

Enfin un dernier aspect du cycle d'H.armoricanum concerne les haploporosomes. On note en effet que ceux-ci sont présents dans les petits plasmodes puis ne sont plus identifiés dans les stades suivants du développement du parasite et réapparaissent dans les spores mûres. Ainsi se pose la triple question

de leur origine dans les petits plasmodes, de leur devenir dans les stades suivants et de leur ontogénie dans les spores. Pour ce qui concerne les haplosporosomes des petits plasmodes ni leur origine ni leur devenir ne peuvent être précisés. En effet aucun corps multivésiculaire, semblable à ceux observés en particulier chez M.nelsoni ou chez Urosporidium crescens DE TURK, 1940 (ou même chez M.refringens ou M.sydneyi qui présentent également des haplosporosomes) et admis être à l'origine de ces organites, n'a été mis en évidence dans les petits plasmodes d'H.armoricanum. D'autre part il n'a jamais été confirmé que les plasmodes proviennent du cytoplasme interne des spores, libéré par elles comme le propose FARLEY (1967) et qu'alors les haplosporosomes des plasmodes pourraient être des haplosporosomes résiduels des spores. Enfin aucune modification de structure de ces organites n'a été vue permettant d'établir comme le suggèrent NEWMAN et al. (1976), que les haplosporosomes ont une fonction dans le processus de sporulation du parasite. De même nous n'avons jamais observé d'haplosporosome entre le plasmode et les cellules de l'hôte ou à l'intérieur même de celles-ci permettant d'établir que les organites sont libérés du plasmode comme cela a été vu chez M.nelsoni.

Certains éléments constituant le mécanisme de formation des haplosporosomes de la spore ont quant à eux été observés. Il s'agit aussi bien des granules sécréteurs de la sphérule tels qu'ils sont présents chez M.nelsoni et M.costalis, que des inclusions formatrices des haplosporosomes ou "membrane-bound inclusion" décrits chez Minchinia louisiana, SPRAGUE, 1963. A cela on peut ajouter la mise en évidence des corps sécréteurs issus de la sphérule corroborant le rôle sécréteur de celle-ci signalé par ROSENFELD et al. (1969) et confirmé par ORMIERES (1980).

Le processus de formation des haplosporosomes dans les spores d'H.armoricanum présente alors de grandes similitudes avec celui observé notamment chez Minchinia sp. parasite du crabe Panopeus herbstii (PERKINS, 1975 b). Chez H.armoricanum il débute chez la spore jeune et pourrait alors se dérouler selon le mode représenté schématiquement PL. XXV, fig. 80. Dans ce processus peuvent intervenir les vésicules arrondies observées dans le sporoplasme de la spore.

V - EFFETS HISTOPATHOGENES DU PARASITE.

L'action histopathogène d'Haplosporidium armoricanum a été étudiée sur coupes histologiques et précisée sur coupes semi-fines.

Dans les organes atteints par l'infection, les effets histopathologiques différent selon les stades du cycle de développement du parasite. Il est remarquable en effet de noter que parmi les trois cas de parasitisme observés, deux sujets ne présentaient que des stades plasmodiaux de l'Haplosporidie, le troisième présentant quant à lui au côté de très rares plasmodes essentiellement les stades plus évolués du parasite c'est à dire ceux décrits depuis les sporontes précoces jusqu'aux sporocystes avec spores mûres.

Les effets pathogènes liés aux stades plasmodiaux du parasite sont visibles dans le manteau, la masse des diverticules digestifs et les branchies des huîtres atteintes par la parasitose. Dans les palpes labiaux aucun effet notable n'est observé.

Dans le manteau l'action d'Haplosporidium armoricanum s'exerce essentiellement dans la partie distale de l'organe. Dans cette zone (PL. XXVI, fig. 81), les plasmodes sont le plus généralement situés à proximité immédiate de l'épithélium limitant l'organe. Ils sont alors localisés contre ou entre les muscles longitudinaux sous-jacents à l'épithélium. Les épithéliums restent intacts et les effets pathogènes se traduisent par une destruction des cellules du tissu conjonctif où ne subsistent que les muscles transversaux. Dans la région d'insertion du manteau sur la masse des diverticules digestifs (PL. XXVI, fig. 81) et dans la partie moyenne comprise entre les zones distale et proximale (PL. XXVI, fig. 82) le parasite provoque une dégradation du conjonctif, caractérisée par l'absence de cellules conjonctives en de nombreux endroits du tissu, formant dans celui-ci des lacunes. Ces lacunes s'observent dans les zones du conjonctif exemptes de parasite mais aussi directement autour des formes plasmodiales, isolant celles-ci des cellules conjonctives avoisinantes. Dans l'épithélium bordant le manteau aucun effet pathogène n'est visible.

Dans les branchies, les formes plasmodiales du parasite gagnent aussi bien le conjonctif que l'épithélium des filaments et des autres parties de l'organe. Le conjonctif est alors fortement dégradé ; ainsi sur les coupes ne sont plus visibles les cellules qui le compose et seuls quelques rares hémocytes sont présents. Dans l'épithélium des filaments branchiaux, les plasmodes sont fréquemment nidés entre les cellules, provoquant l'écartement de celles-ci et leur tassement les unes contre les autres.

Enfin dans la glande digestive, les effets histopathologiques liés aux stades plasmodiaux, semblent être soumis au degré de pathogénécité du parasite. Ainsi à l'évolution de l'action pathogène d'H.armoricanum est associée une dégradation progressive du conjonctif.

Le premier stade de la dégradation de la glande digestive par les formes plasmodiales est caractérisé par un tissu conjonctif où subsistent les cellules de Leydig et entre elles les fibrocytes et des hémocytes (PL. XXVI, fig. 83). Toutefois le conjonctif ne reste pas intact dans sa totalité. En effet on peut y observer par endroits une destruction des cellules de réserve entraînant la formation de grandes lacunes. Cette destruction du conjonctif s'opère essentiellement à proximité des diverticules digestifs (PL. XXVI, fig. 83) et autour de l'intestin (PL. XXVI, fig. 84) et de l'estomac (PL. XXVI, fig. 85). Dans les espaces aménagés les plasmodes sont nombreux. A ce degré de l'action pathogène du parasite on peut observer également quelques plasmodes dans les sinus sanguins qu'ils obstruent partiellement sans former de véritables embolies. Enfin au niveau des épithéliums que ce soit ceux de l'estomac où des diverticules digestifs les plasmodes sont très fréquemment localisés entre la membrane basale et la couche musculaire adjacente. Les plasmodes peuvent alors repousser la basale à l'intérieur de l'épithélium, et pénétrer ce dernier. Nidés entre les cellules épithéliales les plasmodes sont en contact direct avec elles.

Au second stade de la dégradation de la masse digestive par les plasmodes, les effets histopathogènes sont plus importants et on peut observer des signes de réactions de l'hôte. L'aspect le plus évident de l'action d'H.armoricanum est la destruction presque totale du conjonctif interstitiel consécutive à la disparition des cellules de Leydig dans toute la glande. Seule subsiste la trame formée par les fibrocytes. Simultanément on note un accroissement du nombre des hémocytes entre les diverticules digestifs et à la périphérie de l'estomac autour duquel, mêlés à de nombreux fibrocytes ils peuvent former une "barrière" (PL. XXVII, fig. 86). A ce stade nous avons pu également mettre en évidence le développement de collagène correspondant à une réaction de l'hôte infestée. Dans la trame conjonctive le collagène forme un feutrage qui se densifie autour des plasmodes (PL. XXVII, fig. 87). La même observation peut être faite au niveau de la basale des épithéliums, où le collagène forme un dépôt autour des plasmodes (PL. XXVII, fig. 88). Comme au stade précédent de l'infestation, les plasmodes apparaissent ici aussi fréquemment nidés entre les cellules épithéliales. Mais de plus quelques formes sont visibles dans la lumière des diverticules.

Les effets histopathologiques liés aux stades évolués du parasite n'ont été observés que dans les branchies et la masse digestive. L'absence d'observation de sporontes et de sporocystes dans les palpes et le manteau ne signifie pas que ces formes parasitaires ne les atteignent pas, mais est due au fait que le plan de coupe de l'huître infestée par ces stades du parasite, ne passait pas par ces organes.

Dans la glande digestive, l'invasion du conjonctif est telle que ne subsistent dans ce tissu que des hémocytes, particulièrement des granulocytes et de rares fibrocytes (PL. XXVII, fig. 89). Comme c'est le cas, lors de l'infestation de l'organe par les plasmodes, les formes parasitaires peuvent obstruer partiellement les sinus sanguins (PL. XXVIII, fig. 91) et pénétrer l'épithélium des diverticules (PL. XXVIII, fig. 90) et de l'estomac. La présence du parasite entraîne alors localement la destruction de l'épithélium et l'augmentation à la base de celui-ci des cellules de réserve.

Dans les branchies les sporocystes envahissent complètement le conjonctif des jonctions interfilamentaires (PL. XXVIII, fig. 92), y provoquant la disparition de la plupart des cellules. De nombreux sporocystes sont également présents dans les filaments branchiaux (PL. XXVIII, fig. 93) localisés entre les baguettes chitineuses ou introduits dans l'épithélium frontal. Simultanément on remarque dans l'épithélium des filaments, l'absence des glandes sécrétrices de mucus habituellement nombreuses.

Outre ces aspects histopathologiques, il convient de rappeler que macroscopiquement les huîtres infestées par H.armoricanum ne présentaient qu'une décoloration de la masse digestive et des branchies. Une telle altération de la couleur générale des huîtres parasitées par des Haplosporidies a pu être également observée chez certains sujets parasités par M.armoricana ceux-ci présentant une glande digestive brunâtre.

Les huîtres parasitées par H.armoricanum ne montraient aucune autre lésion externe, en particulier d'indentations des branchies comme cela est signalé chez les huîtres parasitées par la nouvelle Haplosporidie mise en évidence par VIVARES et al. (1982).

L'absence de localisation préférentielle des formes plasmodiales et de celles plus évoluées du cycle de développement dans les différents tissus de l'hôte ne permet pas de préciser les modalités d'infestation d'O.edulis par le parasite et en conséquence d'établir si le processus suivi par la maladie provoquée par H.armoricanum se rapproche notamment de celui décrit par FARLEY (1968) lors de la parasitose de C.virginica par M.nelsoni. Dans ce cas les plasmodes après infestation des épithéliums branchiaux et des palpes prolifèrent

dans le conjonctif adjacent et les sinus sanguins des branchies avant d'envahir le conjonctif interstitiel de la glande digestive et tous les tissus. La sporulation ayant lieu dans les diverticules.

Il convient de préciser également qu'au cours de nos observations aucun cas de phagocytose du parasite n'a été mis en évidence et non plus de forme intracellulaire.

Enfin les necroses observées présentent de nombreuses similitudes avec celles décrites chez les huîtres parasitées par d'autres Haplosporidies dont M.nelsoni et M.costalis. Cette remarque confirme le rôle pathogène potentiel important que constitue H.armoricanum.

Toutefois les cas d'infestation d'O.edulis par H.armoricanum sont trop rares pour établir si ces troubles sont suffisants pour provoquer la mort des sujets parasités ou s'ils ne constituent qu'un élément affaiblissant l'hôte.

VI - IMPLICATIONS TAXONOMIQUES.

Dès notre première description (PICHOT et al., 1979 b) de l'Haplosporidie parasite d'O.edulis du Bassin d'Arcachon, nous la rattachions au genre Haplosporidium. Ce rattachement était lié d'une part à la classification de LEVINE et al. (1980) qui exclue du genre Urosporidium C. et M., 1905 les parasites dont la spore présente un opercule et d'autre part à l'élément de diagnose des Haplosporidium et des Minchinia proposé par ORMIERES (1980) qui sépare les deux genres selon la "présence (chez Haplosporidium) ou l'absence (chez Minchinia) de filaments sporaux issus de l'enveloppe".

Cette proposition de ORMIERES nous conduit toutefois à faire quelques remarques. En effet si cette diagnose est confirmée par les travaux de BALL (1980) sur Minchinia chitonis (LANKESTER, 1885) LABBE 1896 espèce type du genre qui ne présente pas de tels filaments, le signalement de filaments émis par la paroi de la spore de M.cadomensis (MARCHAND et SPRAGUE, 1979) semble aller à son encontre. Cependant on peut observer que la photographie -fig. 19- fournie pour présenter les filaments chez M.cadomensis montre une grande similitude sur le plan de l'ornementation de la paroi avec celle -fig. 23- fournie par PERKINS (1975 b) pour illustrer les filaments de Minchinia sp.. Or chez cette dernière espèce, comme d'ailleurs chez M.nelsoni (PERKINS, 1968) et chez M.costalis (PERKINS, 1968), il a été mis en évidence que ces ornements correspondent au dépôt suivi de la fusion contre la paroi sporale de formations filamenteuses ou en rubans formées dans l'extrasporeplasme.

Il semble donc à la suite de cette remarque, tout à fait possible, que les filaments de M.cadomensis soient également formés dans l'extrasporeplasme et non issus de la paroi.

Si toutefois les filaments, chez les Minchinia pouvaient être indifféremment formés dans l'enveloppe extrasporale ou issus de la paroi, ce qui expliquerait l'interprétation différente donnée selon les auteurs, de l'observation d'images semblables, on peut également noter que chez les espèces citées ceux-ci constituent un type d'ornementation tout à fait différent de celui fourni par les spores d'Haplosporidium armoricanum. En effet chez les Minchinia les filaments de par leur grand nombre et leur enroulement autour de la spore forment un feutrage contre la paroi et une sorte de chevelure dans le cytoplasme extrasporal. Ceci est particulièrement visible chez Minchinia sp. et chez M.costalis. Chez les Haplosporidium au contraire, telle l'espèce Haplosporidium parisi ORMIERES, 1980 les filaments sont toujours en nombre limité, nettement détachés de la paroi et très distinctement issus d'elle. La paroi ne présente alors aucune ornementation. Ces précisions apportées, on peut donc reconnaître comme valable, pour ce qui concerne les filaments, le diagnose proposée par ORMIERES.

A cette diagnose proposée par ORMIERES s'oppose pour le choix du genre de l'Haplosporidie étudiée celle de SPRAGUE (1978) qui place dans le genre Haplosporidium les seules Haplosporidies dont les spores ne possèdent pas de prolongement de l'extrasporeplasme en forme de queue. Toutefois une critique peut être formulée à l'encontre de cette proposition. En effet elle repose sur un élément qui n'apparaît que de façon fugace au cours de la maturation des spores. Ainsi nous avons pu mettre en évidence chez H.armoricanum que les extensions de l'extrasporeplasme n'apparaissent qu'à un stade avancé de la maturité des spores, les spores jeunes ne présentant pas de tels prolongements cytoplasmiques. D'autre part il a été établi que l'extrasporeplasme des spores des Haplosporidies, disparaît chez la spore mûre. Ce fait s'observe également chez H.armoricanum.

En conséquence, devant la difficulté de retenir comme élément de diagnose les prolongements cytoplasmiques, dont l'existence dépend du stade de maturité des spores, nous retiendrons, pour la détermination du nom générique d'Haplosporidium armoricanum, la diagnose d'ORMIERES basée sur la présence ou l'absence de filaments sporaux, persistant lorsque l'extrasporeplasme a disparu.

Simultanément, au cours de notre première présentation d'H.armoricanum, certaines similitudes étaient observées entre la spore de cette espèce et celle de M.armoricana mise en évidence chez le même hôte (VAN BANNING, 1977, 1979 ;

CAHOUR et al., 1980). Ces similitudes concernaient aussi bien la forme ovoïde, que les dimensions (2,5 à 3,5 μm sur 3 à 4 μm pour H.armoricanum et 2,6 à 4,5 μm sur 4 à 5,5 μm pour M.armoricana) et la présence de prolongements cytoplasmiques ou queues.

Certains aspects du cycle d'H.armoricanum que nous présentons confirment ce rapprochement avec M.armoricana dont le développement est présenté par CAHOUR et al.. Chez cette dernière espèce les premiers stades du cycle sont également caractérisés par deux types de plasmodes, dont la morphologie et la plupart des organites cytoplasmiques sont comparables à ceux des plasmodes d'H.armoricanum. De même la morphologie des sporontes, ainsi que le processus d'enveloppement des sporoblastes par des éléments cytoplasmiques menant à la formation des préspores peuvent être observés chez M.armoricana comme chez H.armoricanum.

L'ensemble de ces observations, auxquelles on peut ajouter la communauté de l'hôte et l'absence d'effet hautement pathogène des deux parasites corroborent le rapprochement des deux Haplosporidies. Ceci d'autant plus que comme nous le signalions "certaines images des spores fournies par VAN BANNING (1979) suggéreraient l'existence de filaments sporaux" chez M.armoricana comme chez H.armoricanum.

H.armoricanum ne présentant aucun caractère commun avec les autres Haplosporidies du même genre, décrites dans d'autres groupes d'hôtes telles Haplosporidium ascidiarum DUBOSCO-HARANT, 1923 (ORMIERES et de PUYTORAC, 1968) dont en particulier les spores sont plus grandes (4 à 7 μm) ou encore H.parisi (ORMIERES, 1980), nous proposons de créer pour l'Haplosporidie mise en évidence au cours de l'été 1980 chez des huîtres plates natives de la Baie d'Arcachon, l'espèce nouvelle Haplosporidium armoricanum n. sp.

Une autre Haplosporidie mise en évidence récemment dans des lots d'O.edulis du Morbihan par VIVARES et al. (1982), présente de nombreuses similitudes avec H.armoricanum. En effet comme c'est le cas chez H.armoricanum, ce nouveau parasite présente deux types de plasmodes (de 20 μm pour ceux à plusieurs diplocaryons et de 4 à 5 μm pour les formes à un seul diplocaryon). Chez les deux agents les grands plasmodes ont également une paroi à nombreuses villosités, et leur cytoplasme contient des mitochondries de même diamètre (1 μm), des granules de réserve de même taille (0,5 μm) et des diplocaryons de 2 à 2,3 μm de large et de 5 μm environ de long. Enfin les petits plasmodes présentent chez les deux espèces une membrane externe peu plissée limitant un cytoplasme opaque renfermant un diplocaryon de 1,5 μm de diamètre environ et des haplosporosomes al-

longés de dimensions sensiblement égales.

Seule la présence dans les plasmodes de l'Haplosporidie des huîtres du Morbihan, de particules d'allure virale, constitue un élément distinctif entre les deux parasites.

A ces connotations, on doit adjoindre l'absence d'observation de forme sporale chez l'Haplosporidie mise en évidence par VIVARES et al.. Cet élément essentiel, ne permet pas en conséquence d'établir que les deux parasites appartiennent à la même espèce. Mais il ne permet pas non plus d'affirmer que, la nouvelle Haplosporidie est distincte de H.armoricanum et de M.armoricana.

CONCLUSION.

La présente étude réalisée sur Haplosporidium armoricanum parasite du groupe des Haplosporidies, mise en évidence chez l'huître plate O.edulis du Bassin d'Arcachon, a permis de préciser de nombreux aspects de son cycle de développement en particulier en microscopie électronique et ses effets histopathogènes vis à vis de l'hôte. Toutefois comme c'est le cas pour de nombreuses Haplosporidies identifiées chez les mollusques bivalves marins ou autres animaux, un certain nombre de points concernant le déroulement de son cycle demeurent indéterminés ou obscurs. Il apparaît ainsi, que pour ce groupe de parasite, comme pour beaucoup d'autres d'ailleurs s'impose la nécessité d'obtenir expérimentalement la sporulation de l'agent responsable de maladie ou de mortalité.

D'autre part comme on a pu le voir, l'identification d'une nouvelle Haplosporodie parasite d'huître conduit à reposer la question maintes fois débattue de la structure taxonomique de ce groupe.

Il n'en reste pas moins que sur le plan de la parasitologie des mollusques bivalves marins, nous nous trouvons devant un cas tout à fait intéressant, dans la mesure où cette Haplosporidie, bien que constituant un pathogène potentiel important et provoquant des lésions tissulaires graves chez l'hôte, ne s'est pas révélée pour le moment dangereuse pour les populations atteintes par la parasitose.

CHAPITRE V

PATHOGENESE DES PARASITOSES A MARTEILIA REFRINGENS
ET A HAPLOSPORIDIUM ARMORICANUM DE
L'HUITRE PLATE OSTREA EDULIS

INTRODUCTION.

Les infestations parasitaires dues aux Protozoaires du genre Marteilia et du groupe des Haplosporidies, déterminent chez les huîtres des maladies de caractère différent. Certaines parasitoses présentent un caractère épizootique. Tel est le cas des épidémies causées par Minchinia costalis et M.nelsoni chez l'huître américaine Crassostrea virginica, et des mortalités massives d'Ostrea edulis provoquées par M.refringens. A ces épizooties on peut adjoindre celle de l'huître plate européenne due à Bonamia ostreae parasite présentant des affinités avec les Marteilia et les Haplosporidies, et celle provoquée par Marteilia sydneyi qui bien qu'à un degré moindre, toucha l'huître australienne Crassostrea commercialis.

D'autres maladies présentent un caractère épisodique. Parmi celles-ci figurent les parasitoses d'Ostrea edulis par les Haplosporidies M.armoricana, H.armoricanum et celle décrite par VIVARES et al (1982). Si ces trois parasites ne représentent pas une seule et même espèce comme certaines de nos observations le suggèrent, ils ont en commun la particularité de n'avoir été décelés que chez de rares individus et de n'avoir été associés à aucune mortalité. A ces cas on peut ajouter une autre Haplosporidie découverte chez des huîtres plates également de l'étang de Thau et dont le développement est resté très limité (Mlle BACHERE, communication personnelle). D'autres infections épisodiques ont été signalées, associées à M.refringens ou à des espèces du même genre, chez des huîtres et chez d'autres mollusques bivalves marins. Ainsi M.refringens a été mis en évidence chez Crassostrea gigas (CAHOUR, 1979), Mytilus edulis et Cardium edule (COMPS et al., 1975) et Marteilia sydneyi a été trouvé chez Crassostrea echinata (PERKINS et WOLF, 1976). On peut noter également les affections par M.lengehi de l'huître C.cucullata du golfe Persique (COMPS, 1976) et par M.maurini de Mytilus galloprovincialis de la lagune de Venise (COMPS et al., 1981).

Ces observations mettent en évidence l'aspect très particulier des parasitoses d'Ostrea edulis. Chez cette espèce en effet se produisent des cas d'infections à caractère épisodique par des Haplosporidies et notamment H.armoricanum dont

des espèces voisines M.costalis et M.nelsoni provoquent des mortalités massives chez C.virginica et simultanément et inversement une maladie à caractère épizootique par M.refringens, parasite qui ne présente chez d'autres mollusques marins que des cas d'infections erratiques.

L'explication du double caractère des parasitoses à M.refringens et à H.armoricanum de l'huître plate européenne peut-être recherchée dans la pathogénèse de ces infections. Ceci nous conduit à distinguer, parmi les principaux éléments pouvant concourir au développement des parasitoses étudiées, ceux liés aux parasites, ceux dépendant de l'hôte et ceux relatifs au milieu. L'étude de la pathogénèse des Protozooses à Marteilia refringens et à Haplosporidium armoricanum d'Ostrea edulis nécessite que soit traité le lien entre ces infections et les diverses parasitoses à Haplosporidies et à Marteilia des mollusques bivalves marins.

I - ELEMENTS LIES AUX PARASITES.

Nos recherches sur M.refringens et H.armoricanum ont permis de préciser la localisation et les effets pathogènes des deux parasites.

Si M.refringens n'est localisé qu'au tractus digestif de l'hôte, la distribution d'H.armoricanum est apparue plus large, le parasite atteignant tout le conjonctif interstitiel de la glande digestive et également le manteau, les palpes et les branchies. Pour ce qui concerne la localisation des parasites, il convient toutefois de signaler, que M.refringens peut aussi être observé dans les branchies (COMPS, 1970 a) et qu'il est probable qu'H.armoricanum gagne à un certain degré d'infestation, les épithéliums digestifs comme le font M.nelsoni et M.costalis.

Notre étude des effets pathogènes de M.refringens sous leurs aspects histologiques a mis en évidence que le parasite provoque d'importantes lésions des épithéliums et qu'ainsi le rôle pathogène de M.refringens pourrait s'exercer par suppression des fonctions digestives de l'hôte. A ces effets on peut ajouter, une possible altération des branchies, marquée par des indentations formées sur la bordure ventrale de ces organes (COMPS, 1970 a). Associée à la localisation d'H.armoricanum nous n'avons pu observer que la destruction du conjonctif par les formes évoluées du parasite. Toutefois bien que la rareté des cas de parasitoses étudiés ne nous permettent pas de préciser davantage les effets histopathogènes d'H.armoricanum, les rapports que l'on peut établir entre ce parasite et les autres Haplosporidies de l'huître plate européenne ou de C.virginica, suggèrent que d'autres altérations des tissus puissent être occasionnées par ce parasite. On peut ainsi admettre qu'H.armoricanum provoque comme l'Haplosporidie décrite par VIVARES et al. (1982) des indentations des branchies. Simultanément H.armoricanum pouvant gagner les diverticules digestifs, le parasite pourrait entraîner la destruction de leur épithélium

comme le fait notamment M.nelsoni chez C.virginica (FARLEY, 1968). Bien que nous ne puissions établir si les lésions provoquées par M.refringens et M.armoricanum sont suffisantes pour provoquer la mort des sujets atteints, les similitudes observées entre les deux parasites en ce qui concerne leurs effets histologiques, suggèrent qu'au niveau individuel ces agents se révèlent être sur le plan histopathogène sensiblement de même virulence. Ils représenteraient ainsi pour l'hôte sur ce plan le même potentiel pathogène.

Les effets pathogènes des deux parasites pourraient également être comparés au regard des phénomènes morbides associés à leur présence dans les tissus de l'hôte. Dans notre étude de M.refringens nous avons mis en évidence des cas d'hyperplasies hémocytaires atypiques, dont les caractères ont permis d'établir qu'elles étaient de nature néoplasique. Bien qu'un tel processus n'ait jamais été observé conjointement à la présence d'Haplosporidies chez O.edulis, une telle prolifération atypique a également été signalée simultanément à la présence de M.nelsoni chez C.virginica (FRIERMAN, 1976). Ces observations pourraient nous inciter à admettre que M.refringens et H.armoricanum aient une action sur l'hôte permettant le développement d'une telle néoplasie. Toutefois dans tous les cas d'hémocytoses atypiques observés chez les bivalves marins (à l'exception de celui décrit chez Mya arenaria ou l'action d'un virus a été mise en évidence) l'étiologie du phénomène n'a jamais pu être précisée, et en particulier le rôle du parasite n'a jamais pu être établi. Il convient alors de ne pas retenir le phénomène néoplasique comme élément permettant de distinguer ou de rapprocher la virulence d'H.armoricanum de celle de M.refringens.

Au cours de nos recherches sur M.refringens, nous avons d'autre part, mis en évidence que le parasite interfère avec le métabolisme protéique d'O.edulis. Malgré l'absence d'étude du même type chez des huîtres parasitées par H.armoricanum, on peut admettre que ce parasite également, provoque des altérations biochimiques de l'humeur de l'hôte. De telles altérations ont été observées au cours des infections de C.virginica par M.nelsoni. Toutefois, chez C.virginica FENG et CANZONIER (1970) puis DOUGLASS et HASKIN (1976) n'observent aucune modification de la protéinémie entre les huîtres saines et les huîtres parasitées, alors que nous avons pu observer chez O.edulis, une diminution importante de la protéinémie de l'hémolymphe des huîtres parasitées. Cette différence des effets pathogènes sous leurs aspects biochimiques pourraient être recherchée dans la virulence des parasites. Cependant, si l'abaissement de la protéinémie de l'hémolymphe de l'huître plate consécutif à l'infection par M.refringens pourrait indiquer que le parasite puisse agir

par limitation ou détournement du métabolisme protéique, la réponse humorale de l'huître américaine à l'infection par M.nelsoni est quant à elle considérée comme un mécanisme de défense de l'hôte (DOUGLASS et HASKIN, 1976).

Cette dernière observation nous conduit à rechercher dans la pathogénèse des infections à Marteilia refringens et à Haplosporidium armoricanum les facteurs dépendant de l'hôte.

II - ELEMENTS LIES A L'HOTE.

Le non développement des parasitoses à Haplosporidies chez O.edulis, et en particulier de l'infection d'H.armoricanum pourrait être du à la résistance de l'huître plate vis à vis de ces parasites. Les capacités d'O.edulis de répondre aux Haplosporidioses par un mécanisme de défense ont fréquemment été mises en évidence. Ainsi au cours de notre étude des effets histopathologiques d'H.armoricanum nous avons pu observer le développement important de collagène autour des plasmodes, et simultanément une leucocytose de type réactionnel dans le conjonctif interstitiel envahi par le parasite. Une telle hémocytose est également signalée, associée à Minchinia armoricana et à l'Haplosporidie décrite par VIVARES et al. (1982). D'autre part il n'est pas exclu que puisse se produire chez O.edulis des cas de phagocytoses de certaines formes du cycle des Haplosporidies. La phagocytose de plasmodes de M.nelsoni a été observée chez C.virginica par FARLEY (1968).

Dans les cas d'infections d'O.edulis par H.armoricanum on a pu noter que parmi les trois sujets parasités, 2 ne présentaient que des stades plasmodiaux du parasite, le troisième ne présentant que des stades plus évolués c'est à dire ceux décrits depuis les sporontes précoces jusqu'aux sporocystes. Au cours des parasitoses d'huîtres plates de Bretagne par des Haplosporidies la même observation a pu être faite. Ainsi VIVARES et al. (1982) n'ont mis en évidence que des formes plasmodiales et sur les 3 cas signalés par VAN BANNING (1977), 2 sujets ne présentaient que des sporocystes, le troisième étant infesté uniquement par des plasmodes. Si aucune précision n'est donnée pour ce qui concerne la distribution temporelle ou la distribution géographique des différents cas signalés par VAN BANNING et VIVARES et al. les sujets parasités par H.armoricanum provenaient quant à eux d'un même lot, donc prélevés en même temps et en un même lieu. L'infestation différentielle observée pourrait correspondre à un blocage du cycle de développement des Haplosporidies chez O.edulis et être un autre signe de la résistance de l'huître plate vis à vis des Haplosporidies. On ne peut écarter toutefois que le blocage du développement du cycle des Haplosporidies chez O.edulis puisse avoir une autre cause, et notamment soit lié à l'action de particules virales, de telles particules ayant été identifiées dans les plasmodes de l'Haplosporidie signalée par VIVARES et al. (1982).

Dès les premiers cas de parasitose d'O.edulis par M.refringens signalés, il a été observé (HERRBACH, 1971) que le parasite n'affectait que l'huître plate dans des secteurs où cependant étaient conjointement cultivées les espèces C.angulata et C.gigas. Cette situation persiste aujourd'hui en Bretagne où l'infection à M.refringens reste limitée à O.edulis malgré la présence simultanée de C.gigas. La même observation est valable pour ce qui concerne Marteilia sydneyi, parasite qui n'affectait que C.commercialis et non C.echinata dans les zones où ces deux espèces étaient élevées ensemble (WOLF, 1972). Ces faits mettent en évidence l'inféodation des Marteilia à une espèce particulière d'hôte. L'existence d'une spécificité parasitaire dépendant des relations phylogéniques de l'hôte pourrait alors expliquer que le développement des Haplosporidies ne puisse avoir lieu que chez C.virginica, et qu'ainsi O.edulis ne serait qu'un hôte accidentel pour les parasites de ce groupe.

III - ELEMENTS LIES AU MILIEU.

Le caractère des maladies à M.refringens et à Haplosporidies de l'huître plate et des parasitoses à Haplosporidies d'O.edulis et de C.virginica pourrait enfin dépendre d'une ségrégation écologique. L'influence que pourraient avoir certains facteurs physiques du milieu sur le développement de ces parasitoses a fréquemment été avancée. Ainsi la salinité est supposée être un facteur important de la distribution et de l'activité de M.nelsoni et de M.costalis chez C.virginica (ANDREWS et CASTAGNA, 1979) ; M.costalis requière des eaux à haute salinité (25 à 30 ‰) ; M.nelsoni est restreint à des eaux de salinité comprise entre 15 et 25 ‰. Au cours de notre étude expérimentale du développement de M.refringens dans l'étang de Thau, nous avons mis en évidence des modifications du comportement du parasite dans ce biotope, et indiqué l'influence que pourraient avoir les facteurs hydrologiques du milieu (température et salinité) dans ces modifications. En Bretagne l'absence de développement de M.refringens dans les baies ouvertes aux eaux océaniques (GRIZEL, communication personnelle) corrobore le rôle que semblent jouer les facteurs physico-chimiques du milieu où sont élevées les huîtres, sur le développement des parasitoses. Il reste toutefois difficile à déterminer actuellement si le milieu a une action directe sur le parasite en inhibant ou réduisant son développement ou son potentiel pathogène, ou si son action s'exerce par une modification des réactions de l'hôte.

CONCLUSION.

Notre étude de la pathogenèse des infections à Marteilia refringens et à Haplosporidium armoricanum d'Ostrea edulis a permis d'aborder certains aspects des

relations entre les parasites étudiés et leur hôte commun l'huître plate. Elle a également permis d'établir des similitudes et des différences sur le plan pathologique entre les parasites. Toutefois les données sur les parasitoses d'O.edulis sur lesquelles ont porté nos recherches restent très incomplètes pour expliquer le caractère différent des maladies qu'elles provoquent. Ainsi en particulier l'étiologie de l'épizootie liée à M.refringens n'est pas clairement établie. D'autre part, les raisons du caractère erratique des Protozooses à Haplosporidies restent indéterminées. Pour ce qui concerne les parasitoses d'O.edulis étudiées, comme d'ailleurs pour toutes les maladies des mollusques bivalves marins, il conviendrait alors d'orienter bon nombre de travaux sur l'étude des interactions entre l'hôte le parasite et le milieu. Ces travaux pourraient permettre une meilleure compréhension de la pathologie de ces animaux et ainsi de limiter si ce n'est d'empêcher le développement des maladies.

RESUME ET CONCLUSION GENERALE

Nos recherches ont été réalisées au laboratoire de pathologie des mollusques marins de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches maritimes.

Traitant les parasitoses à Marteilia refringens et à Haplosporidium armoricatum de l'huître plate européenne Ostrea edulis, notre étude a permis de préciser certains aspects de la pathologie de ce mollusque qui fait l'objet d'un élevage intensif et représente un important intérêt économique en France.

Ainsi l'éventail des agents infestant ce mollusque a été élargi avec la mise en évidence d'H.armoricanum première Haplosporidie du genre observée chez les huîtres, dont la connaissance a été approfondie à la suite de notre étude ultrastructurale du cycle de développement. Toutefois notre étude comparative d'H.armoricanum avec les autres parasites du même groupe décrits chez O.edulis et chez d'autres hôtes nous a conduit à rapprocher voire à identifier comme une même espèce les Haplosporidies de l'huître plate et à débattre des éléments de diagnose de ce groupe de Protozoaires, groupe dont on peut souligner ici que sa structure taxonomique nécessiterait une remise en ordre.

L'étude des effets pathogènes de M.refringens et de H.armoricanum a montré que ces parasites pouvaient provoquer à certains stades de la maladie d'importantes lésions des tissus de l'hôte et que la présence de M.refringens entraînait une altération des constituants protéiques de l'hémolymphe de l'huître. S'il ne peut être établi si les lésions produites par H.armoricanum sont suffisantes pour provoquer la mort de l'huître, l'action pathogène de M.refringens, en s'exerçant par limitation ou suppression des fonctions digestives et en interférant avec le métabolisme protéique pourrait bien conduire à la mort de l'hôte. Simultanément nous avons pu observer que l'huître pouvait réagir aux infections. Ainsi des signes de défense d'O.edulis vis à vis de la parasitose à H.armoricanum ont été mis en évidence.

La mise en culture expérimentale dans l'étang de Thau d'huîtres parasitées par M.refringens a montré que dans ce biotope le développement du parasi-

te pouvait être modifié par comparaison avec celui observé dans les eaux atlantiques. Il a été ainsi constaté principalement, que le cycle de M.refringens pouvait évoluer plus précocement à Thau qu'en Bretagne et qu'après un premier cycle complet dans la lagune Languedocienne, un second cycle pouvait ne pas avoir lieu ou être limité. L'étude ultrastructurale des stades de M.refringens, a mis en évidence que parallèlement aux modifications du cycle, certaines formes du parasite, et notamment les spores pouvaient être transformées. On pourrait donc admettre que dans les eaux méditerranéennes certains facteurs accentuent un processus de maturation ou de dégénérescence du parasite. Si les modifications observées pourraient être directement liées aux conditions hydrobiologiques du milieu, elles pourraient aussi être dues aux réactions particulières de l'hôte dans ce milieu.

Les cas de proliférations hémocytaires atypiques observés conjointement à la présence de M.refringens pourraient s'ajouter aux effets pathogènes de l'agent de la maladie de la glande digestive d'O.edulis. L'étude ultrastructurale des hémocytes a en effet mis en évidence que le processus était de nature néoplasique. Toutefois l'observation chez l'huître plate et chez d'autres mollusques bivalves marins de tels hémocytoses atypiques hors de la présence de parasite nous a incité à ne pas écarter la possibilité que d'autres causes puissent être à l'origine du phénomène.

L'étude d'un Microsporidie observée chez O.edulis a révélé que ce Protozoaire représentait un hyperparasite de M.refringens. L'étude ultrastructurale de la sporogénèse et des effets pathogènes de la Microsporidie nous a conduit à identifier celle ci comme Nosema ormieresi et a montré que M.refringens agent hautement pathogène pour l'huître pouvait être très sensible à une infection parasitaire.

Enfin l'étude de la pathogénèse des infections à H.armoricanum et à M.refringens d'O.edulis nous a permis de comparer l'action pathogène des deux parasites en liaison avec les interactions existant entre l'hôte, le parasite et le milieu. Toutefois les données sur ces interactions restent trop limitées pour déterminer avec précision l'étiologie des parasitoses de l'huître plate.

Il conviendrait alors dans le domaine de la pathologie des mollusques marins de mettre tout particulièrement l'accent sur la pathogénie des infections, en vue de limiter et d'empêcher leur développement.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDERMAN (D.J.), 1979. - Epizootiology of Marteilia refringens in Europe. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 67-69.
- ALDERMAN (D.J.) et JONES (E.), 1971. - Shell disease of oysters. - Fish. Invest., Sér. II, 26 (8) : 19 p.
- ALDERMAN (D.J.), VAN BANNING (P.) et PEREZ-COLOMER (A.), 1977. - Two european oyster (Ostrea edulis) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. - Aquaculture, 10 : 335-340.
- ANDREWS (J.D.), 1966. - Oyster mortality studies in Virginia. V- Epizootiology of MSX, a protistan pathogen of oysters. - Ecology, 47 (1) : 19-31.
- ANDREWS (J.D.), 1976. - Epizootiology of oyster pathogens Minchinia nelsoni and M.costalis. - In : "Proceedings of the first international colloquium on invertebrate pathology", Queens University, Kingston, Canada : 169-171.
- ANDREWS (J.D.), 1979. - Oyster diseases in Chesapeake Bay. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 45-53.
- ANDREWS (J.D.), WOOD (J.L.) et HOESE (H.D.), 1962. - Oyster mortality studies in Virginia. III- Epizootiology of a disease caused by Haplosporidium costale WOOD and ANDREWS. - J. Insect. Path., 4 : 327-343.
- ANDREWS (J.D.) et WOOD (J.L.), 1967. - Oyster mortality studies in Virginia VI- History and distribution of Minchinia nelsoni, a pathogen of oysters, in Virginia - Chesapeake Sci., 8 (1) : 1-13.
- ANDREWS (J.D.) et CASTAGNA (M.), 1978. - Epizootiology of Minchinia costalis in susceptible oysters in Seaside Bays of Virginia's Eastern Shore, 1959-1976, - J. Invert. Path., 32 : 124-138.
- BALL (S.J.), 1980. - Fine structure of the spores of Minchinia chitonis (LANKES-TER, 1885) LABBE, 1896 (Sporozoa : Haplosporida), a parasite of the chiton, Lepidochitona cinereus. - Parasitology, 81 : 169-176.
- BALOUET (G.), 1980. - Etudes sur la pathologie des huîtres. - Contrats CNEXO-UBO 78/1857, 79/2066 et 80/2283.
- BALOUET (G.) et PODER (M.), 1978. - Hyperplasie hémocytaire chez Ostrea edulis L. - Haliotis, 9 (1) : 99-102.
- BONAMI (J.R.), GRIZEL (H.), VAGO (C.) et DUTHOIT (J.L.), 1971. - Recherches sur une maladie epizootique de l'huître plate, Ostrea edulis LINNE. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35 (4) : 415-418.

- BOWERS (E.A.) et JAMES (B.L.), 1967. - Studies on the morphology, ecology and life cycle of Meigymnophallus minutus (COBBOLD 1859) comb. nov. (Trematoda, Gymnophallidae). - Parasitology, 57 : 281-300.
- BREHELIN (M.), BONAMI (J.R.), COUSSERANS (F.) et VIVARES (C.P.), 1982. - Existence de formes plasmodiales vraies chez Bonamia ostreae parasite de l'huître plate Ostrea edulis. C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. III, 295 : 45-48.
- BROWN (R.S.), WOLKE (R.E.), SAILA (S.B.) et BROWN (C.W.), 1977. - Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (Mya arenaria). - Ann. N.Y. Acad. Sci., 298 : 522-534.
- CAHOUR (A.), 1979. - Marteilia refringens and Crassostrea gigas. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 19-20.
- CAHOUR (A.), PODER (M.) et BALOUET (G.), 1980. - Présence de Minchinia armoricana (Haplosporea, Haplosporida) chez Ostrea edulis d'origine française. - C.R. Soc. Biol., 174 (3) : 359-368.
- CANNING (E.U.) et NICHOLAS (P.), 1974. - Light and electron microscope observations on Unikaryon legeri (Microsporida, Nosematidae), a parasite of the Metacercaria of Meigymnophallus minutus in Cardium edule. - J. Invent. Pathol., 23 : 92-100.
- COMPS (M.), 1970 A. - Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 34 (3) : 317-326.
- COMPS (M.), 1970 B. - Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (Ostrea edulis L.) dans le bassin de Marennes. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 4. ronéo 7 p.
- COMPS (M.), 1972. - Sur un copépode parasite de l'huître portugaise (Crassostrea angulata LMK) dans le bassin de Marennes-Oléron. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M.; K : 35. ronéo 5 p.
- COMPS (M.), 1976. - Marteilia lengehi n.sp., parasite de l'huître Crassostrea cucullata BORN. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40 (2) : 347-349.
- COMPS (M.), 1983. - Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. - Thèse Doctorat d'Etat. Univ. Sci. Techn. Languedoc - Montpellier : 128 p.
- COMPS (M.), GRIZEL (M.) et TIGE (G.), 1972. - Sur un sporozoaire parasite de Crassostrea rhizophorae (GUILDING). - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 275 : 1693-1695.
- COMPS (M.), RAZET (D.) et QUIROS-RAMOS (H.), 1973. - Protiste parasite de l'huître du Pacifique, Crassostrea gigas (THUNBERG). - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 277 : 2797-2799.

- COMPS (M.), GRIZEL (H.), TIGE (G.) et DUTHOIT (J.L.), 1975. - Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins Mytilus edulis L. et Cardium edule L. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 281 : 179-181.
- COMPS (M.), PICHOT (Y.) et DELTREIL (J.P.), 1979. - Mise en évidence d'une microsporidie parasite de Marteilia refringens, agent de la maladie de la glande digestive de Ostrea edulis L. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 (4) : 409-412.
- COMPS (M.), TIGE (G.) et GRIZEL (H.), 1980. - Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 290 : 383-384.
- COMPS (M.), PICHOT (Y.) et PAPAGIANNI (P.), 1981. - Recherches sur Marteilia maurini n. sp. parasite de la moule Mytilus galloprovincialis LMK. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 45 (3) : 211-214.
- COOPER (K.R.), BROWN (R.S.) et CHANG (P.W.), 1982. - The course and mortality of a hematopoietic neoplasme in the soft-shell clam, Mya arenaria. - J. Invert. Path., 39 : 149-157.
- COUCH (J.A.), 1967. - Concurrent haplosporidian infections of the oyster, Crassostrea virginica (GMELIN). - J. parasit., 53 (2) : 248-253.
- COUCH (J.A.), FARLEY (C.A.) et ROSENFELD (A.), 1966. - Sporulation of Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae) in Crassostrea virginica (GMELIN). - Science, 153 : 1529-1531.
- COUSSERANS (F.), 1975. - Recherches sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. Thèse 3ème cycle. Univ. Sci. Techn. Languedoc - Montpellier : 189 p.
- DAVID (H.C.), LOOSANOFF (V.L.), WESTON (W.H.) et MARTIN (C.), 1954. - A fungus disease in clam and oyster larvae. - Science, 120 : 36-38.
- DESPORTES (I.), 1981. - Etude ultrastructurale de la sporulation de Paramyxa paradoxa CHATTON (Paramyxida) parasite de l'Annelide polychète Poecilochaetus serpens. - Protistol., 17 (3) : 365-386.
- DESPORTES (I.) et GINSBURGER-VOGEL (T.), 1977. - Affinités du genre Marteilia, parasite d'huîtres (maladie des Abers) et du Crustacé Orchestia gammarellus (PALLAS), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 285 : 1111-1114.
- DESPORTES (I.) et LOM (J.), 1981. - Affinités de Paramyxa paradoxa CHATTON 1911, parasite de Poecilochaetus serpens (Annélide Polychète) avec les Marteiliidae SPRAGUE, parasites d'huîtres et du Crustacé Orchestia gammarellus. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. III, 292 : 627-632.

- DOLLFUS (R.P.), 1912. - Contribution à l'étude des trématodes marins des côtes du Boulonnais. Une meta-cercaire margaritigène parasite de Donax vittatus DA COSTA. - Mém. Soc. Zool. France, 25 : 84-114.
- DOLLUS (R.P.), 1946. - Parasites (animaux et végétaux) des Helminthes. - Encyclopédie Biologique, Paul Lechevalier édit. Paris : 482 p.
- DOUGLASS (W.R.) et HASKIN (H.H.), 1976. - Oyster - MSX interactions : alterations in hemolymph enzyme activities in Crassostrea virginica during the course of Minchinia nelsoni disease development. - J. Invert. Path., 27 : 317-323.
- FARLEY (C.A.), 1967. - A proposed life cycle of Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster Crassostrea virginica. - J. Protozool., 14 (4) : 616-625.
- FARLEY (C.A.), 1968. - Minchinia nelsoni (Haplosporida) disease syndrome in the American oyster Crassostrea virginica. - J. Protozool., 15 (3) : 585-599.
- FARLEY (C.A.), 1969 A. - Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, Crassostrea virginica and Crassostrea gigas. - Nath. Cancer Inst. Monogr., 31 : 541-555.
- FARLEY (C.A.), 1969 B. - Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (Mytilus edulis). - J. Natl. Cancer Inst., 43 (2) : 509-513.
- FARLEY (C.A.), 1975. - Epizootic and enzootic aspects of Minchinia nelsoni (Haplosporida) disease in Maryland Oysters. - J. Protozool., 22 (3) : 418-427.
- FARLEY (C.A.) et SPARKS (A.K.), 1970. - Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells and connective tissue cells in mollusks. - Comparative leukemia research. Bibl. Haematol., 36 : 610-617.
- FENG (S.Y.) et CANZONIER (W.J.), 1970. - Humoral responses in the American oyster (Crassostrea virginica) infected with Bucephalus sp. and Minchinia nelsoni. - In : "Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes" (S.F. Snieszko édit.) : Amer. Fish. Soc., Spec. Publ., n° 5, Washington, D.C. : 497-510.
- FENG (S.Y.), KHAIRALLAH (E.A.) et CANSONIER (W.J.), 1970. - Hemolymph-free amino acids and related nitrogenous compounds of Crassostrea virginica infected with Bucephalus sp. and Minchinia nelsoni. - Comp. Biochem. Physiol., 34 : 547-556.
- FIELD (I.A.), 1924. - Biology and economic value of the sea mussel Mytilus edulis. - Bull. U.S. Bureau Fish, 38 : 127-259.

- FORD (S.E.) et HASKIN (H.H.), 1982. - History and epizootiology of Haplosporidium nelsoni (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957-1980. - J. Invert. Path., 40 : 118-141.
- FRANC (A.), 1960. - Classe des bivalves. In : GRASSE (P.P.), 1960. - Traité de Zoologie. Masson et Cie édit., Paris, 5 (2) : 1054-2219.
- FRANC (A.), 1975. - Hyperplasie hémocytaire et lésions chez l'huître plate (Ostrea edulis L.). - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 280 : 495-498.
- FRANC (A.), 1980. - Sur quelques aspects inédits du cycle de Marteilia refringens GRIZEL et coll. 1974, parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. - Cah. Biol. mar., 21 : 99-106.
- FRIERMAN (E.M.), 1976. - Occurrence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters (Crassostrea virginica). - Mar. Fish. Rev., 38 (10) : 34-36.
- GABE (M.), 1968. - Techniques histologiques. - Masson et Cie édit., Paris : 1113 p.
- GIARD (D.), 1897. - Sur un distome (Brachycoelium sp.) parasite des pélécy-podes. Compt. Rend. Soc. Biol., 49 : 956-957.
- GINSBURGER-VOGEL (T.) et DESPORTES (I.), 1979 A. - Structure and biology of Marteilia sp. in the Amphipod, Orchestia gammarellus. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 3-7.
- GINSBURGER-VOGEL (T.) et DESPORTES (I.), 1979 B. - Etude ultrastructurale de la sporulation de Paramarteilia orchestiae gen. n., sp. n., parasite de l'Amphipode Orchestia gammarellus (PALLAS). - J. Protozool., 26 (3) : 390-403.
- GINSBURGER-VOGEL (T.), DESPORTES (I.) et ZERBIB (C.), 1976. - Présence chez l'Amphipode Orchestia gammarellus (PALLAS), d'un protiste parasite ; ses affinités avec Marteilia refringens, agent de l'épizootie de l'huître plate. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 283 : 939-942.
- GRIZEL (H.), 1979. - Marteilia refringens and oyster disease - Recent observations - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 38-39.
- GRIZEL (H.) et TIGE (G.), 1973. - La maladie de la glande digestive d'Ostrea edulis LINNE. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 13. ronéo 7 p.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), COUSSERANS (F.), BONAMI (J.R.) et VAGO (C.), 1974 A. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 279 : 783-784.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (J.R.), COUSSERANS (F.), DUTHOIT (J.L.) et LE PENNEC (M.A.), 1974 B. - Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de Ostrea edulis LINNE. - Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 240 : 7-30.

- GRIZEL (H.), TIGE (G.) et RABOUIN (M.A.), 1976. - Données sur la situation de la maladie de l'huître plate, Ostrea edulis LINNE. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 18. ronéo 7 p.
- HASKIN (H.H.), STAUBER (A.) et MACKIN (J.G.), 1966. - Minchinia nelsoni n. sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae) : causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. - Science, 153 : 1414-1416.
- HERRBACH (B.), 1971. - Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, Ostrea edulis LINNE. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35 (1) : 79-87.
- HOWELL (M.), 1967. - The trematode, Bucephalus longicornutus (MANTER 1954) in the New Zealand mud oyster, Ostrea lutaria. - Trans. Roy. Soc. New Zealand Zool., 8 : 221-237.
- JONES (J.B.), 1981. - A new Microsporidium from the oyster Ostrea lutaria in New Zealand. - J. Invert. path., 38 : 67-70.
- LAIRD (M.), 1961. - Microecological factors in oyster epizootics. - Can. J. Zool., 39 : 449-485.
- LANGERON (M.), 1949. - Précis de microscopie. - Masson et Cie édit., Paris : 1426 p.
- LEGER (L.) et HOLLANDE (A.C.), 1917. - Sur un nouveau protiste à faciés de Chytridiopsis, parasite des ovules de l'huître. - C.R. Soc. Biol., 80 : 61-64.
- LEVINE (N.D.), 1978. - Perkinsus gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum. Apicomplexa. J. Parasitol., 64 : 549.
- LEVINE (N.D.), CORLISS (J.O.), COX (F.E.G.), DEROUX (G.), GRAIN (J.), HONIGBERG (B.M.), LEEDAL (G.F.), LOEBLICH (A.R.III), LOM (J.), LYNN (D.), MERINFELD (E.G.), PAGE (F.C.), POLJANSKY (G.), SPRAGUE (V.), VAVRA (J.) et WALLACE (F.G.), 1980. - A newly revised classification of the Protozoa. - J. Protozool., 27 : 37-58.
- LOUBES (C.), 1979. - Ultrastructure, sexualité, dimorphisme sporogonique des Microsporidies (Protozoaires). Incidences taxonomiques et biologiques. Thèse Doctorat d'Etat. Univ. Sci. Techn. Languedoc - Montpellier : 86 p.
- LOWE (D.M.) et MOORE (M.N.), 1978. - Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in Mytilus edulis (Bivalvia, Mollusca). - J. Natl. Cancer Inst., 60 (6) : 1455-1459.
- MACKIN (J.G.), 1960. - Status of researches on oyster disease in North America. - Proc. Gulf Carib. Fish. Inst., 13 th Annu. Secc. : 98-113.

- MACKIN (J.G.), 1962. - Oyster disease caused by Dermocystidium marinum and other microorganisms in Louisiana. - Publ. Inst. Mar. Sci., 7 : 132-229.
- MACKIN (J.G.), OWEN (H.M.) et COLLIER (A.), 1950. - Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, Dermocystidium marinum n. sp. in Crassostrea virginica (GMELIN). - Science, 111 : 328-329.
- MACKIN (J.G.), KORRINGA (P.) et HOPKINS (S.H.), 1952. - Hexamitiasis of Ostrea edulis L. and Crassostrea virginica (GMELIN). - Bull. Mar. Sci. Gulf Carib., 1 : 266-277.
- MACKIN (J.G.) et BOSWELL (J.L.), 1956. - The life cycle and relationships of Dermocystidium marinum. - Proc. Nat. Shellfish. Ass., 46 : 112-115.
- MACKIN (J.G.) et RAY (S.M.), 1966. - The taxonomic relationships of Dermocystidium marinum, MACKIN, OWEN and COLLIER. - J. Invert. Pathol. 8 : 544-545.
- MANSOUR (K.), 1946. - Food and digestive processes of the lamellibranchs. Nature, 157 : 482 p.
- MARCHAND (J.) et SPRAGUE (V.), 1979. - Ultrastructure de Minchinia cadomensis sp. n. (Haplosporida) parasite du Décapode Rhithropanopeus harrisi tridentus MAITLAND dans le canal de caen à la mer (Calvados, France). - Protozool., 26 (2) : 179-185.
- MARTEIL (L.), 1976. - La conchyliculture Française - 2ème partie. Biologie de l'huître et de la moule. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40 (2) : 149-346.
- MARTOJA (R.) et MARTOJA-PIERSON (M.), 1967. - Initiation aux techniques de l'histologie animale. - Masson et Cie édit., Paris : 345 p.
- MATE (H.C. DE), PEREZ BANFI (Y.), KORC (I.) et SOUZA (N.A.), 1976. - Cellulose acetate electrophoresis of soluble lens proteins of different species of mammals ; the use of discontinuous buffer systems. - Comp. Biochem. Physiol., 55 (B) : 45-48.
- MENGEBIER (W.L.) et WOOD (L.), 1969. - The effects of Minchinia nelsoni infection on enzyme levels in Crassostrea virginica - II. Serum phosphohexose isomerase. - Comp. Biochem. Physiol., 29 : 265-270.
- MIX (M.C.), HAWKES (J.W.) et SPARKS (A.K.), 1979. - Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, Mytilus edulis, from Yaquina Bay, Oregon. - J. Invert. Path., 34 : 41-56.
- NEWMAN (M.W.), JOHNSON III (C.A.) et PAULEY (G.B.), 1976. - A Minchinia-like haplosporidan parasitizing blue crabs, Callinectes sapidus. - J. Invert. Path., 27 : 311-315.

- OGLE (J.) et FLURRY (K.), 1980. - Occurrence and seasonality of Perkinsus marinus (Protozoa : Apicomplexa) in Mississippi oysters. - Gulf. Research Reports, 6 (4) : 423-425.
- OLIVER (G.), PICHOT (Y.) et PICHOT (P.), 1980. - Contribution à l'étude des Serrans, Serranus CUVIER, 1817 (Pisces, Serranidae) de la réserve naturelle marine de Cerbère-Banyuls (Pyrenées-Orientales, France). - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 44 (3) : 213-219.
- OPRANDY (J.J.), CHANG (P.W.), PRONOVOST (A.D.), COOPER (K.R.), BROWN (R.S.) et YATES (V.J.), 1981. - Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, Mya arenaria. - J. Invert. Path., 38 : 45-51.
- ORMIERES (R.), 1980. - Haplosporidium parisi n. sp., Haplosporidie parasite de Serpula vermicularis L. - Etude ultrastructurale de la spore. - Protistol., 16 (3) : 467-474.
- ORMIERES (R.) et PUYTORAC (P. DE), 1968. - Ultrastructure des spores de l'Haplosporidie Haplosporidium ascidiarum endoparasite du Tunicier Sydnium elegans GIARD. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 266 : 1134-1136.
- ORMIERES (R.), SPRAGUE (V.) et BARTOLI (P.), 1973. - Light and electron microscope study of a new species Urosporidium (Haplosporida), hyperparasite of trematode sporocysts in the clam Abra ovata. - J. Invert. Path., 21 : 71-86.
- OWEN (H.M.), WALTERS (L.L.) et BREGAN (L.A.), 1952. - Etiological studies on oyster mortality. I. Nematopsis ostrearum PRYTHORCH 1940 (Sporozoa : Perosporidae). - J. Mar. Res., 10 : 82-90.
- PERKINS (F.O.), 1968. - Fine structure of the oyster pathogen Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae). - J. Invert. Path., 10 : 287-307.
- PERKINS (F.O.), 1969. - Electron microscope studies sporulation in the oyster pathogen, Minchinia costalis (Sporozoa : Haplosporida). - J. Parasit., 55 : 897-920.
- PERKINS (F.O.), 1971. - Sporulation in the trematode hyperparasite Urosporidium crescens DE TURK, 1940 (Haplosporida : Haplosporidiidae). - An electron microscope study. - J. Parasitol., 57 : 9-23.
- PERKINS (F.O.), 1975 A. - Fine structure of the haplosporidan Kernstab, a persistent, intranuclear mitotic apparatus. - J. Cell. Sci., 18 : 327-346
- PERKINS (F.O.), 1975 B. - Fine structure of Minchinia sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab Panopeus herbstii. - Mar. Fish. Rev., 37 : 46-60.

- PERKINS (F.O.), 1976 A. - Ultrastructure of sporulation of the European flat oyster pathogen Marteilia refringens. Taxonomic implications. - Journ. Protoz., 23 (1) : 64-74.
- PERKINS (F.O.), 1976 B. - Zoospores of the oyster pathogen, Dermocystidium marinum. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. - J. Parasitol., 62 : 959-974.
- PERKINS (F.O.), 1979. - Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera Minchinia, Urosporidium, Haplosporidium and Marteilia. Taxonomic implications. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 25-37.
- PERKINS (F.O.) et MENZEL (R.W.), 1967. - Ultrastructure of sporulation in the oyster pathogen Dermocystidium marinum. - J. Invert. Pathol., 9 : 205-229.
- PERKINS (F.O.) et WOLF (P.H.), 1976. - Fine structure of Marteilia sydneyi sp. n. - Haplosporidan pathogen of Australian oysters. - J. Parasit., 62 (4) : 528-538.
- PICHOT (P.) et POLLARD (D.A.), 1970. - Etude électrophorétique des protéines du cristallin de Sparidés et Centracanthidés méditerranéens. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 34 (1) : 81-88.
- PICHOT (Y.), COMPS (M.), TIGE (G.), GRIZEL (H.) et RABOUIN (M.A.), 1979 A. - Recherches sur Bonamia ostreae gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 (1) : 131-140.
- PICHOT (Y.), COMPS (M.) et DELTREIL (J.P.), 1979 B. - Recherches sur Haplosporidium sp. (Haplosporida - Haplosporidiidae), parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 (4) : 405-408.
- PODER (M.), 1980. - Les réactions hémocytaires inflammatoires et tumorales chez Ostrea edulis (L.). (Essai de classification des hémocytes des mollusques bivalves). - Thèse 3ème cycle. Univ. Bretagne Occidentale - Brest : 95 p.
- RANSON (G.), 1948. - Prodissoconques et classification des Ostréidés vivants. - Bull. Mus. Hist. Nat. Belg., 24 (42) : 1-12.
- ROSENFELD (A.), 1971. - Oyster disease in north America and some methods for their control. - In "Artificial propagation of commercially valuable shellfish". KENR et MAURER édit. College of marine studies. University of Delaware : 67-78.
- ROSENFELD (A.), BUCHANAN (L.) et CHAPMAN (G.B.), 1969. - Comparison of the fine structure of spores of three species of Minchinia (Haplosporida, Haplosporidiidae). - J. Parasit., 55 : 921-941.

- SHAW (B.L.) et BATTLE (H.I.), 1957. - The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster Crassostrea virginica (GMELIN). - Canadian J. Zool., 35 (3) : 325-347.
- SINDERMANN (C.J.) et ROSENFELD (A.), 1967. - Principal diseases of commercially important marine bivalve mollusca and crustacea. - Fish. Bull., 66 : 335-385.
- SPRAGUE (V.), 1949. - Species of Nematopsis in Ostrea virginica. - J. Parasitol., 35 Suppl., 42 (abstr.).
- SPRAGUE (V.), 1963 A. - Revision of genus Haplosporidium and restoration of genus Minchinia (Haplosporidia, Haplosporidiidae). - J. Protozool., 10 (3) : 263-266.
- SPRAGUE (V.), 1963 B. - Minchinia louisiana n. sp. (Haplosporidia, Haplosporidiidae), a parasite of Panopeus herbstii. - J. Protozool., 10 : 267-274.
- SPRAGUE (V.), 1964. - Nosema dollfusi n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a hyperparasite of Bucephalus cuculus in Crassostrea virginica. - J. Protozool., 11 (3), 381-385.
- SPRAGUE (V.), 1970. - Some protozoan parasites and hyperparasites in marine Bivalve molluscs. - In : "Symposium on diseases of Fishes and Shellfishes" (S.F. Snieszko édit.) : Amer. Fish. Soc., Spec. Publ., n° 5, Washington, D.C. : 511-526.
- SPRAGUE (V.), 1971. - Diseases of oysters. - Ann. Rev. Microbiol., 25 : 211-230.
- SPRAGUE (V.), 1978. - Comments on trends in research on parasitic diseases of shellfish and fish. - Mar. Fish. Rev., 40 (10) : 26-30.
- SPRAGUE (V.), 1979. - Classification of the Haplosporidia. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 40-44.
- SPRAGUE (V.) et ORR Jr. (P.E.), 1955. - Nematopsis ostrearum and N.prytherchi Eugregarinina : Porosporidae) with special reference to the host-parasite relations. - J. Parasitol., 41 : 89-104.
- SPRAGUE (V.), ORMIERES (R.) et MANIER (J.F.), 1972. - Creation of a new genus and a new family in the Microsporida. - J. Invert. Path., 20 (2) : 228-231.
- STEIN (J.E.), DENISON (J.G.) et MACKIN (J.G.), 1961. - Hexamita sp. and an infectious disease in the commercial oyster Ostrea lurida. - Proc. Nat. Shellfish. Ass., 50 : 67-81.
- TIGE (G.) et MOREL (M.), 1974. - Extension de la maladie de la glande digestive de l'huître plate en Bretagne. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 37. ronéo 3 p.

- TIGE (G.), COMPS (M.) et GRIZEL (H.), 1977. - Présence d'une coccidie parasite du rein chez Ostrea edulis L. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 41 (3) : 223-225.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.), LANGLADE (A.) et RABOUIN (M.A.), 1979. - Compléments d'observations sur le cycle du parasite, Marteilia refringens (GRIZEL et coll. 1974). - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 23. ronéo 9 p.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.) et COMPS (M.), 1980. - Données sur le nouveau parasite de l'huître plate, situation épidémiologique. - Cons. Int. Explor. Mer, C.M., K : 39. ronéo 9 p.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.), MARTIN (A.G.), LANGLADE (A.) et RABOUIN (M.A.), 1981. - Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite Bonamia ostreae en Bretagne. - Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 315 : 13-20.
- TIGE (G.), GRIZEL (H.), RABOUIN (M.A.), COCHONNEC (N.), AUDIC (G.) et LANGLADE (A.), 1982. - Maladie hémocytaire de l'huître plate causée par Bonamia ostreae : Evolution de la situation épizootiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. - Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 328 : 3-13.
- VAGO (C.) et AMARGIER (A.), 1963. - Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusions polyédriques de virus d'insectes - Ann. Epiphyties, 14 (3) : 269-274.
- VAN BANNING (P.), 1977. - Minchinia armoricana sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the European flat oyster, Ostrea edulis. - J. Invert. Path., 30 : 199-206.
- VAN BANNING (P.), 1979. - Haplosporidian diseases of imported oysters, Ostrea edulis, in Dutch estuaries. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 8-18.
- VAVRA (J.), JOYON (L.) et PUYTORAC (P. DE), 1966. - Observations sur l'ultrastructure du filament polaire des Microsporidies. - Protistol., 2 : 109-112.
- VIVARES (C.P.), BREHELIN (M.), COUSSERANS (F.) et BONAMI (J.R.), 1982. - Mise en évidence d'une nouvelle Haplosporidie parasite de l'huître plate Ostrea edulis L. - C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. III, 295 : 127-130.
- WOLF (P.H.), 1972. - Occurrence of a Haplosporidan in Sydney rock oyster (Crassostrea commercialis) from Moreton Bay, Queensland, Australia. - J. Invert. path., 19 (3) : 416-417.
- WOLF (P.H.), 1979. - Life cycle and ecology of Marteilia refringens in the Australian Oyster, Crassostrea commercialis. - Mar. Fish. Rev., 41 (1-2) : 70-72.

- WOOD (J.L.) et ANDREWS (J.D.), 1962. - Haplosporidium costale (Sporozoa) associated with a disease of Virginia oysters. - Science, N.Y., 136 : 710-711.
- YEVICH (P.P.) et BARSZCZ (C.A.), 1976. - Gonadal and hematopoietic neoplasms in Mya arenaria. - Mar. Fish. Rev., 38 (10) : 42-43.
- YONGE (C.M.), 1926 A. - The digestive diverticula in the Lamellibranchs. - Trans. Roy. Soc. Edin., 54 : 703 p.
- YONGE (C.M.), 1926 B. - Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in Ostrea edulis. - J. Mar. Biol. Ass. U.K., 14 (1) : 295-386.

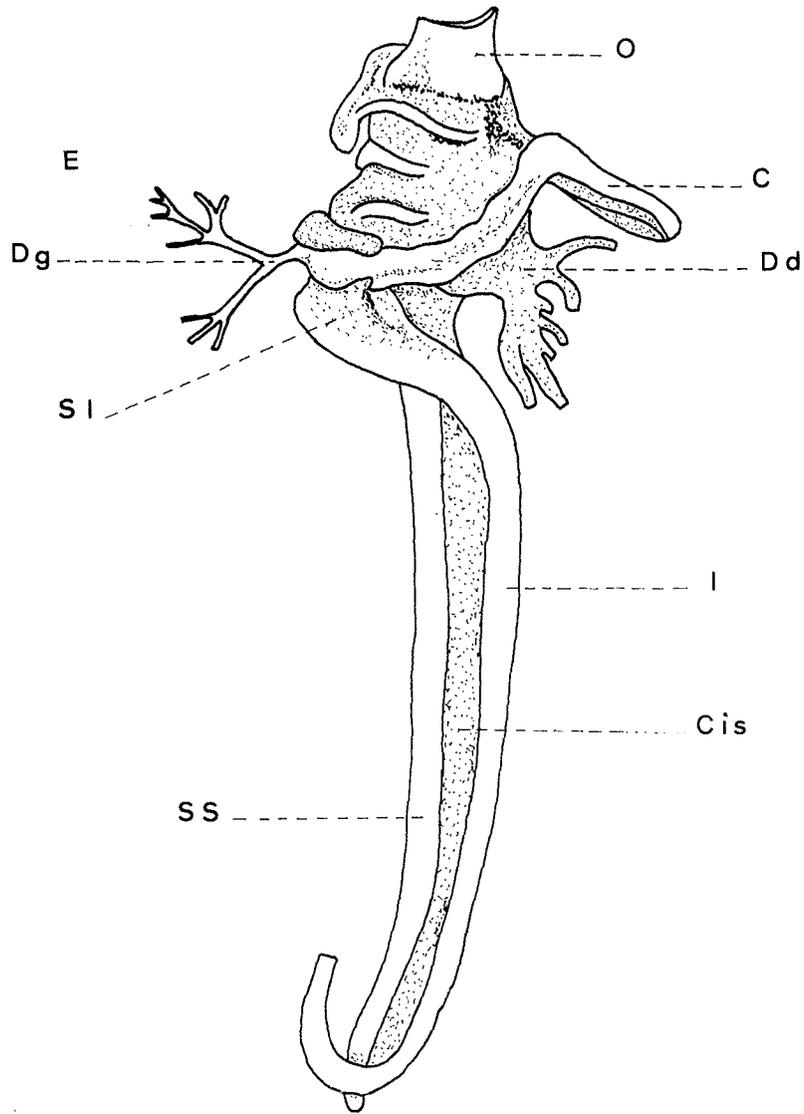
PLANCHE I

Anatomie de l'appareil digestif de l'huître plate Ostrea edulis.

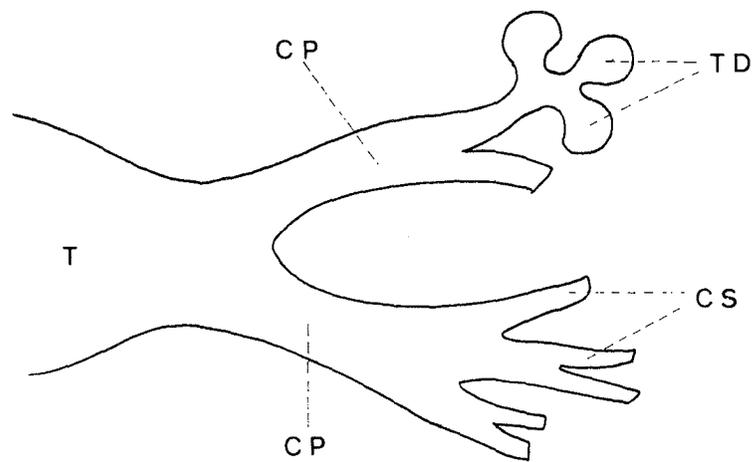
Fig. 1 - Représentation schématique de l'appareil digestif de l'huître (d'après YONGE 1926). L'oesophage (O) n'est présenté que dans sa partie postérieure et l'intestin (I) dans sa portion antérieure.

C : coecum - Cis : communication entre l'intestin et le sac du stylet -
Dd : diverticule droit - Dg : diverticule gauche - E : estomac - SI :
sortie de l'intestin de l'estomac - SS : sac du stylet cristallin.

Fig. 2 - Schéma d'un diverticule digestif. Les tubules digestifs (TD) sont reliés par des conduits secondaires (CS) aux canaux principaux (CP). Ceux-ci s'unissent en un tronc commun (T) qui débouche dans l'estomac.



1



2

PLANCHE II

Particularités ultrastructurales de Marteilia refringens dans l'étang de Thau.

Fig. 3 - Cellules secondaires (C 2) du parasite, dans le cytoplasme desquelles sont incluses de nombreuses mitochondries (m).

C 1 : cellule primaire - N : noyau des cellules secondaires.
microscopie électronique. X 14 950.

Fig. 4 - Stade évolué du parasite avec spores (S) dans la cellule secondaire (C 2). La cellule secondaire est limitée par une paroi (P) à très nombreux replis, et renferme dans son cytoplasme à côté des granules réfringents (GR) des inclusions sphéroïdes (IS). Dans le cytoplasme (C) de la spore sont visibles une sphérule dense (Sp) et des particules denses (►).

C 1 : cellule primaire.
microscopie électronique. X 10 750.

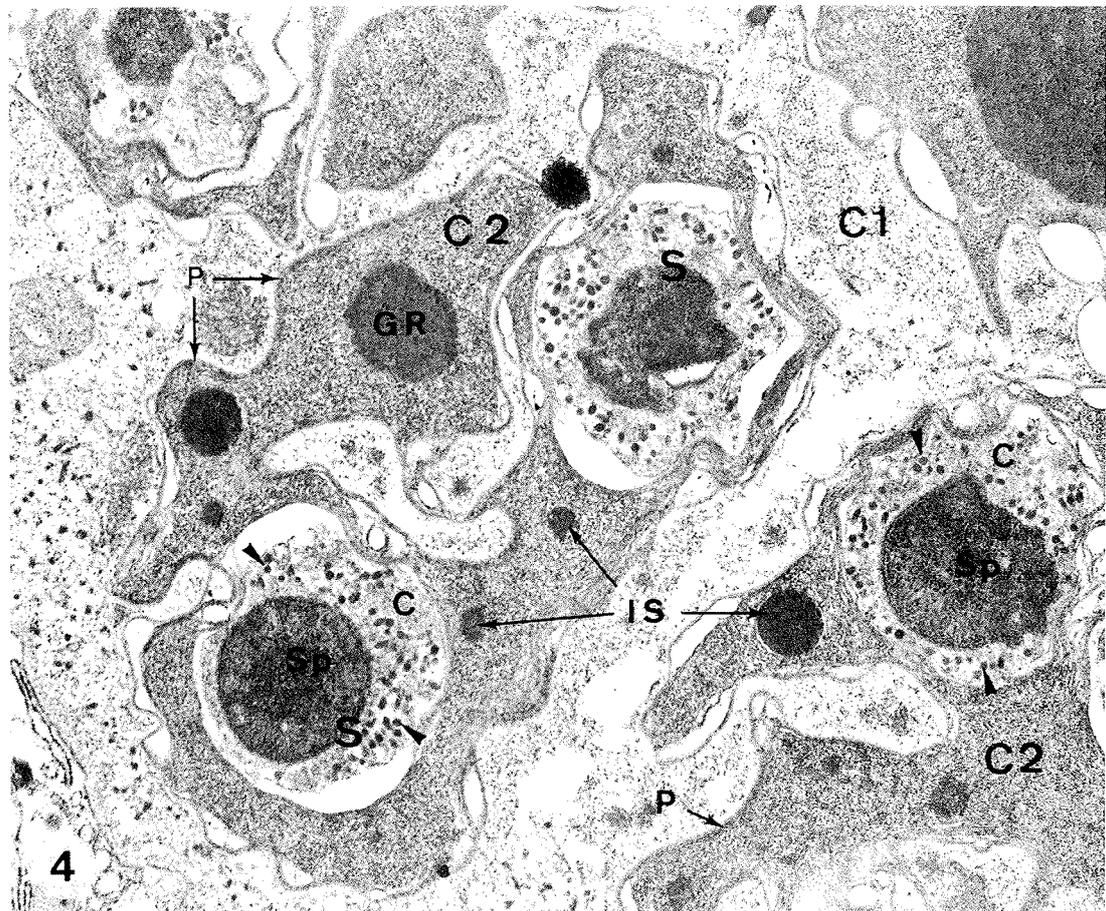
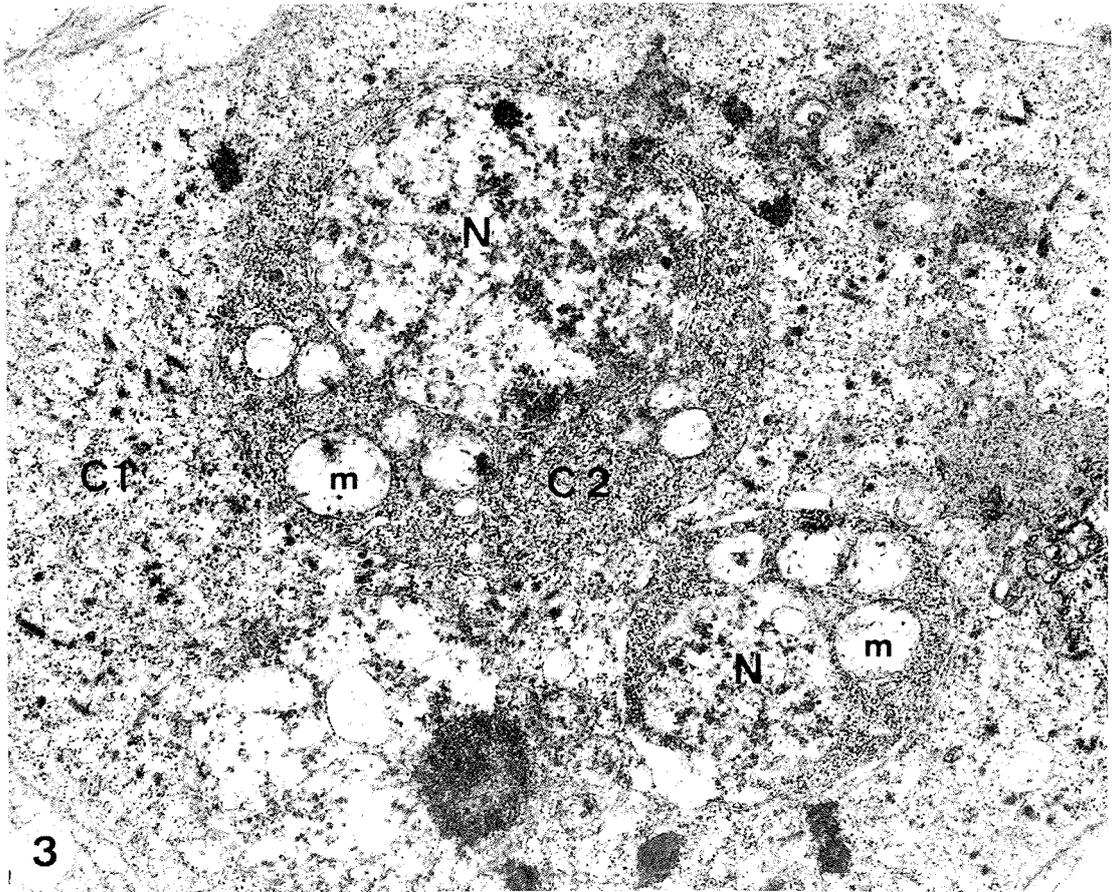


PLANCHE III

Effets pathogènes de Marteilia refringens.

Aspects histologiques.

Fig. 5 - Epithélium stomacal. Entre les cellules épithéliales le parasite (P) est entouré de grosses lacunes (L).
microscopie photonique. X 600.

Fig. 6 - Epithélium stomacal. Invasion d'hémocytes granuleux (Hg) isolés ou groupés au voisinage du parasite (P).
coupe semi-fine. X 750.

Fig. 7 - Tubule digestif. Les formes jeunes du parasite (P) ne provoquent aucune lésion de l'épithélium digestif.
Cé : cellule riche en grains de sécrétion - CS : cellules sombres.
coupe semi-fine. X 1 100.

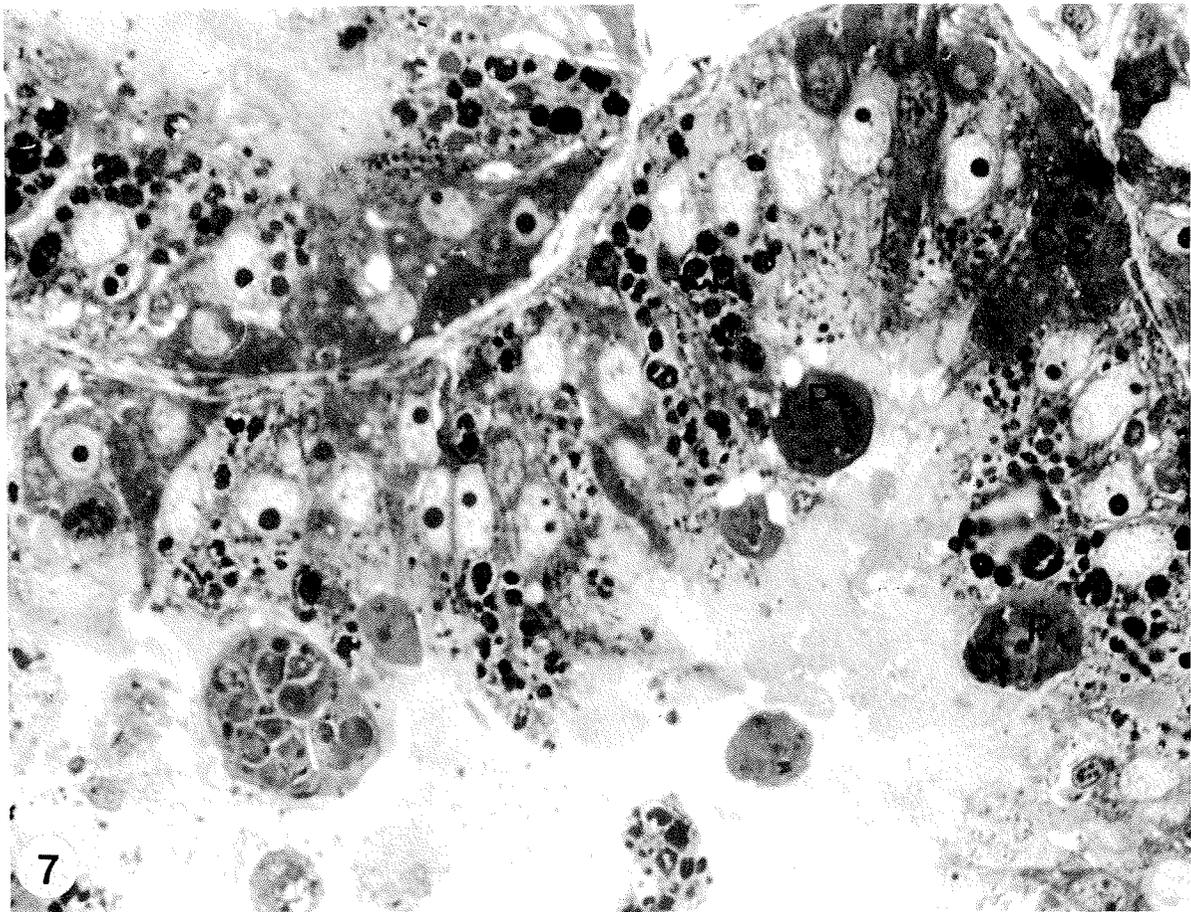
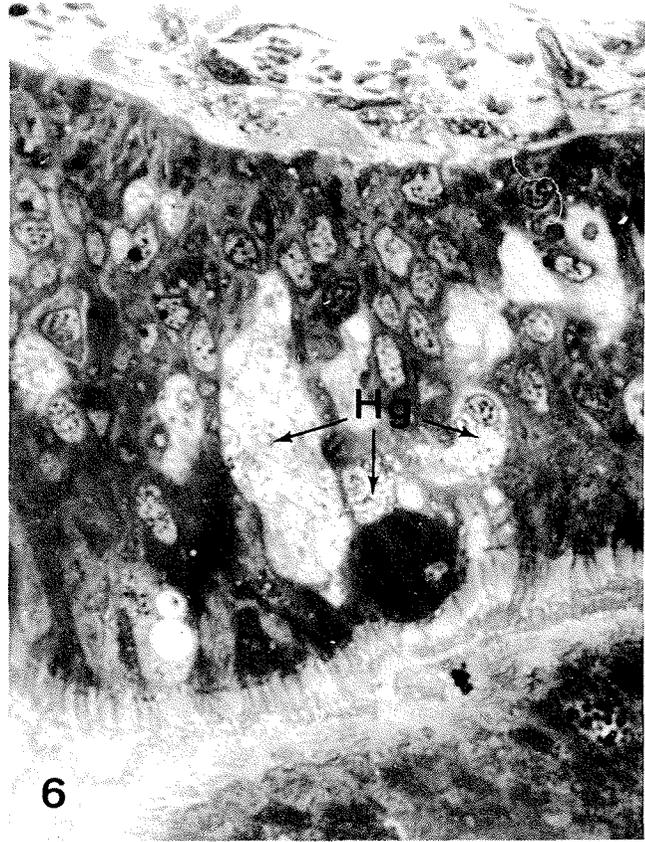
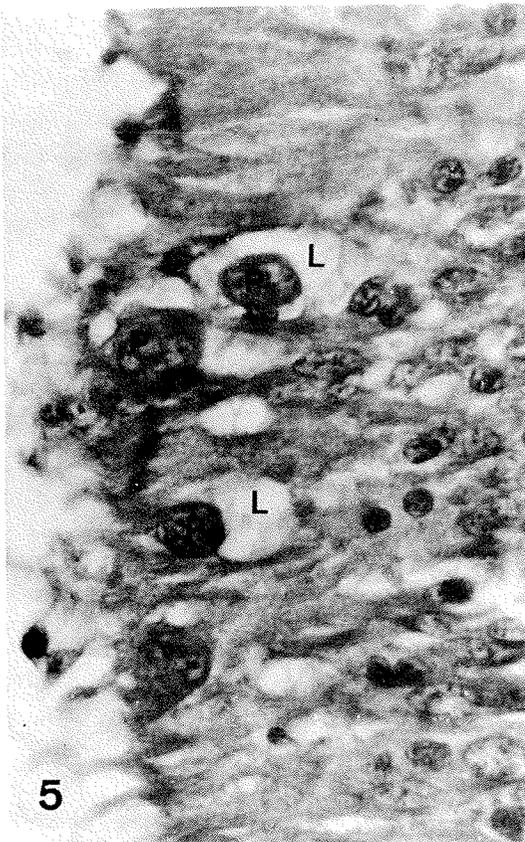


PLANCHE IV

Effets pathogènes de Marteilia refringens.
Aspects histologiques.

Fig. 8 - Tubule digestif. A un stade avancé de la sporulation, le parasite (P) pénètre entre les cellules épithéliales qui subissent des déformations dans leur partie distale.
coupe semi-fine. X 1 200.

Fig. 9 - Phase d'évacuation des diverticules par le parasite (P) avec libération des sporontes (S). La lumière des diverticules est envahie de débris épithéliaux.
Cd : débris de cellule digestive à grains de sécrétion - CS : cellules sombres.
coupe semi-fine. X 1 200.

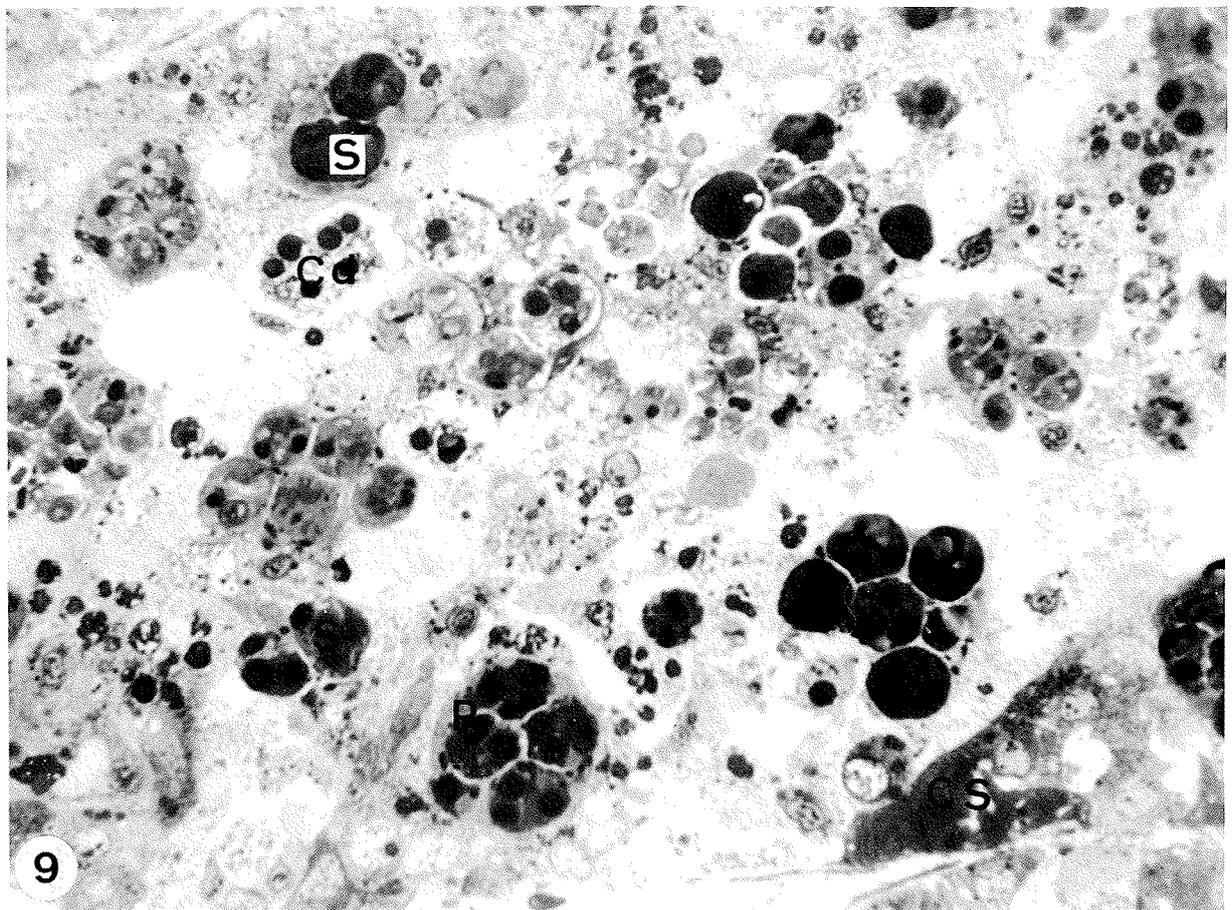
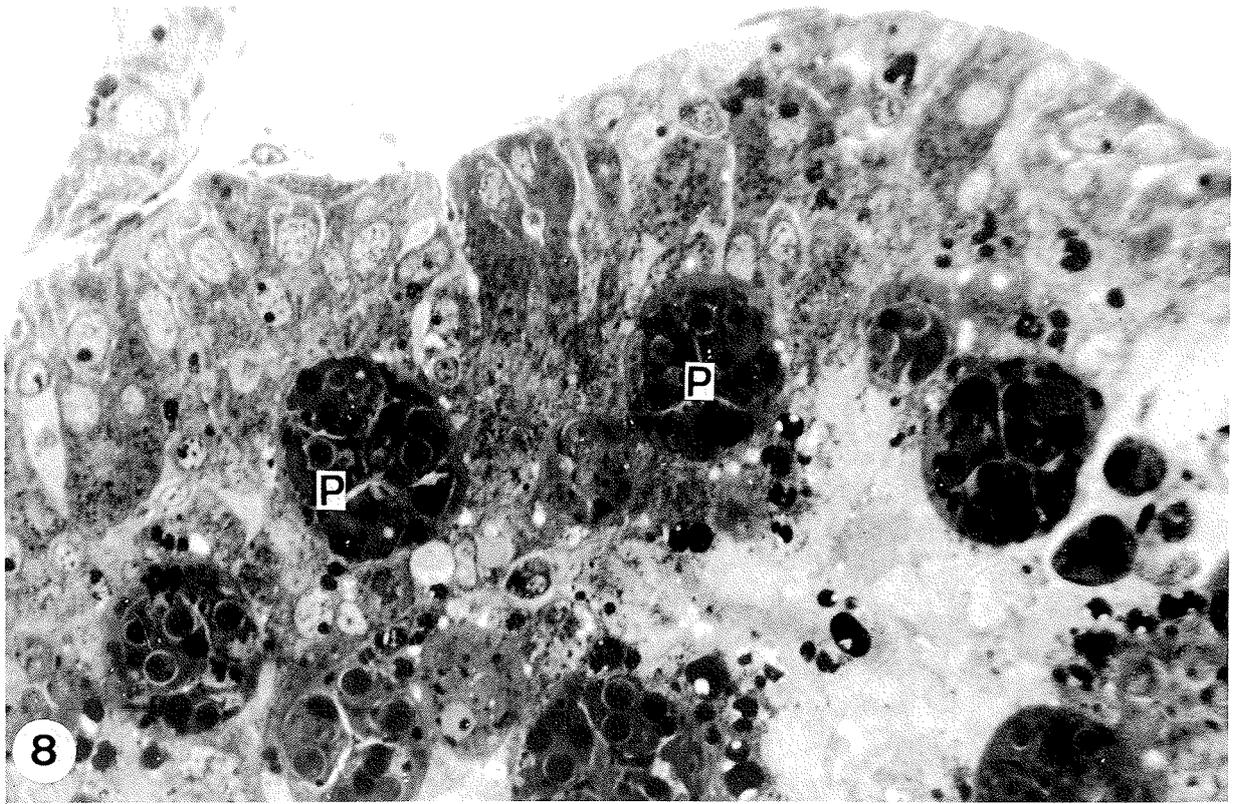


PLANCHE V

Effets pathogènes de Marteilia refringens.
Aspects histologiques.

Fig. 10 - Coupe montrant les diverticules digestifs d'une glande d'huître saine, permettant d'apprécier les effets histopathologiques de M.refringens, en la comparant avec les figures 11 et 12.
microscopie photonique. X 120.

Fig. 11 et 12 - Coupes montrant les effets pathogènes de M.refringens sur les diverticules digestifs, caractérisés notamment par la destruction des épithéliums jusqu'à leur rupture () et l'élargissement des conduits () envahis de débris cellulaires.
microscopie photonique. Fig. 11 : X 100 ; Fig. 12 : X 150.

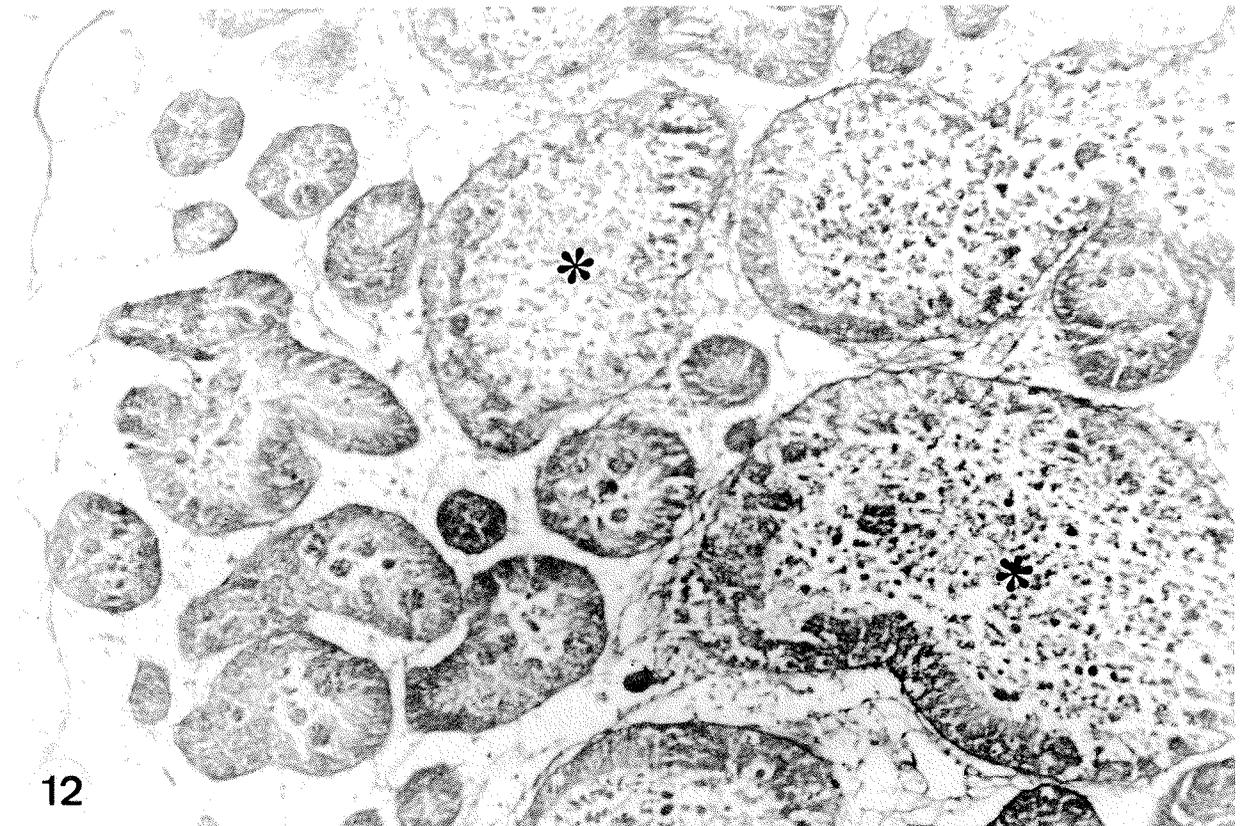
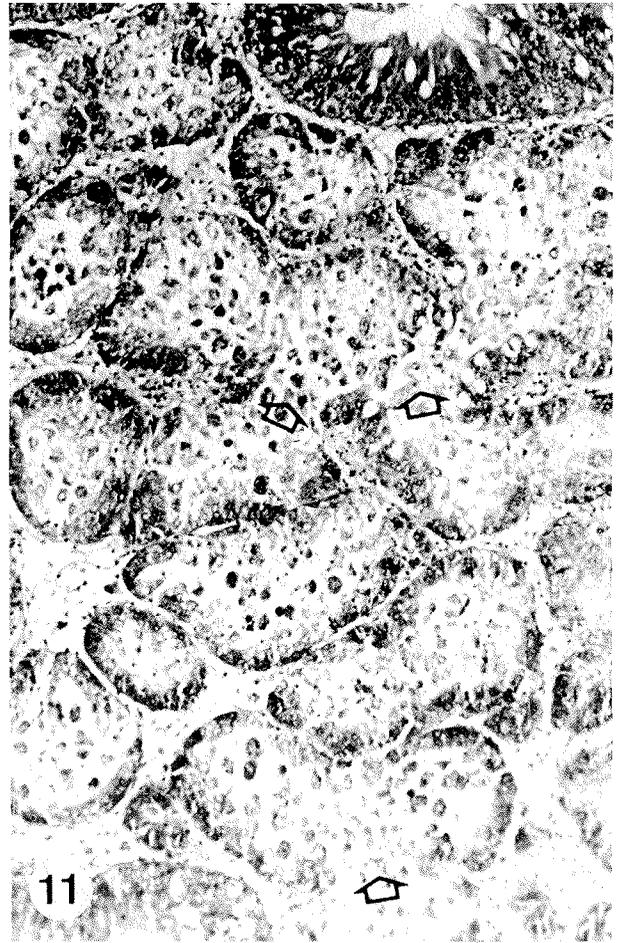
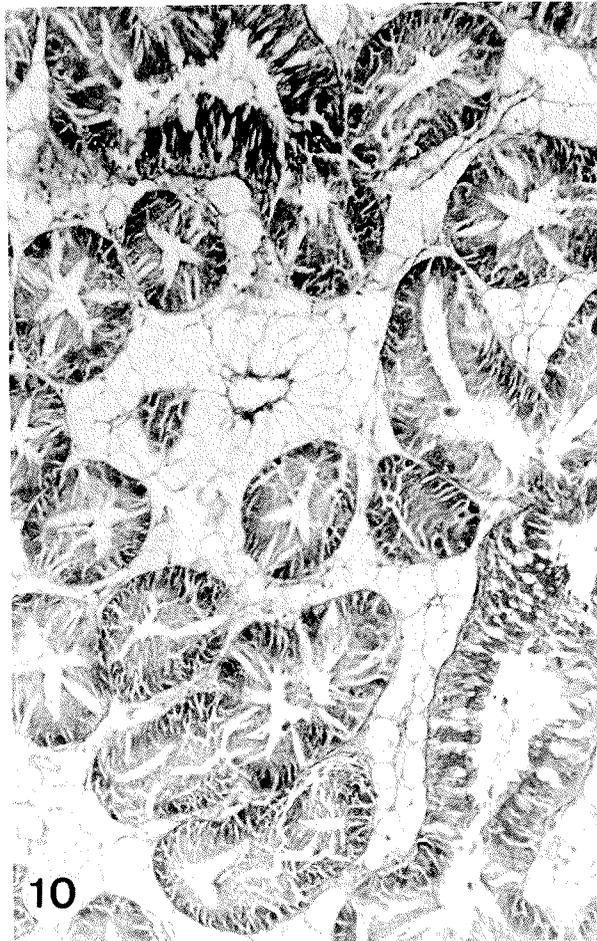


PLANCHE VI

Effets pathogènes de Marteilia refringens.
Aspects biochimiques.

Fig. 13 - Photographie des bandes d'acétate de cellulose obtenues après électrophorèse de l'hémolymphe d'huîtres saines et d'huîtres parasitées.
D : dépôt - chiffres : numéros d'identification des fractions.

Fig. 14 - Electrophorégrammes des protéines de l'hémolymphe d'huîtres saines et parasitées.
D : dépôt - n : numéros d'identification des fractions - % : pourcentages relatifs des fractions.

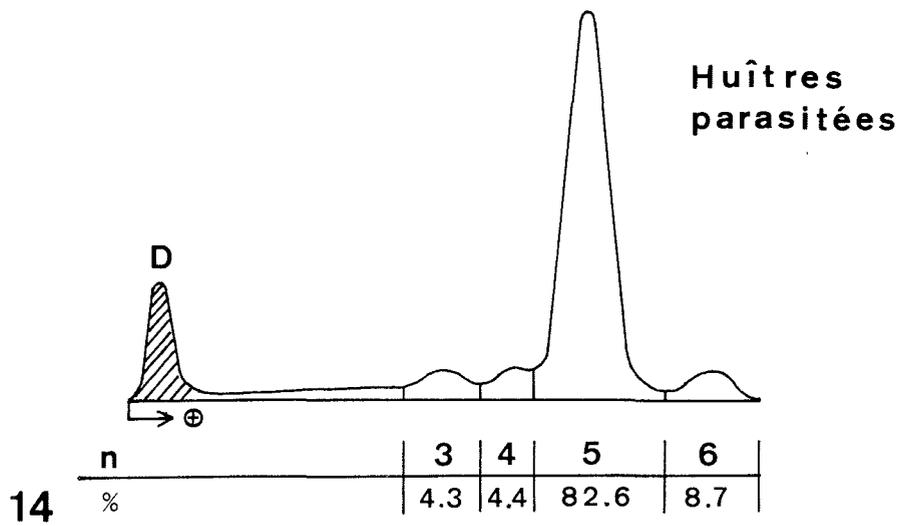
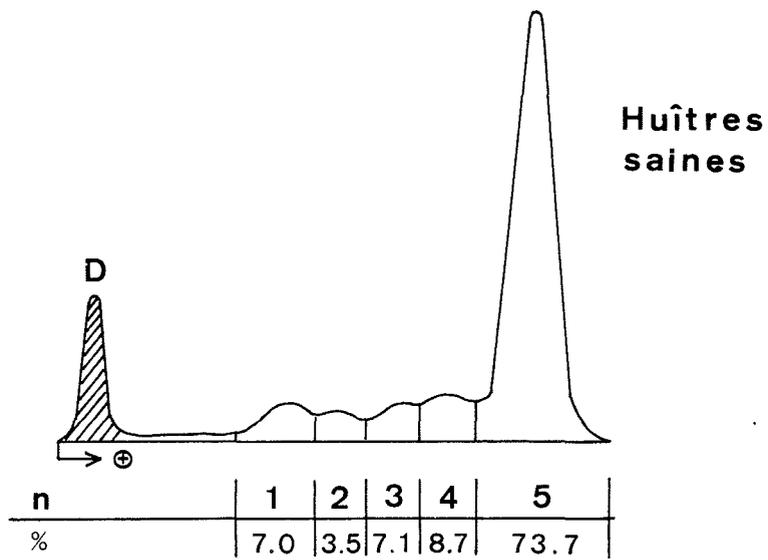
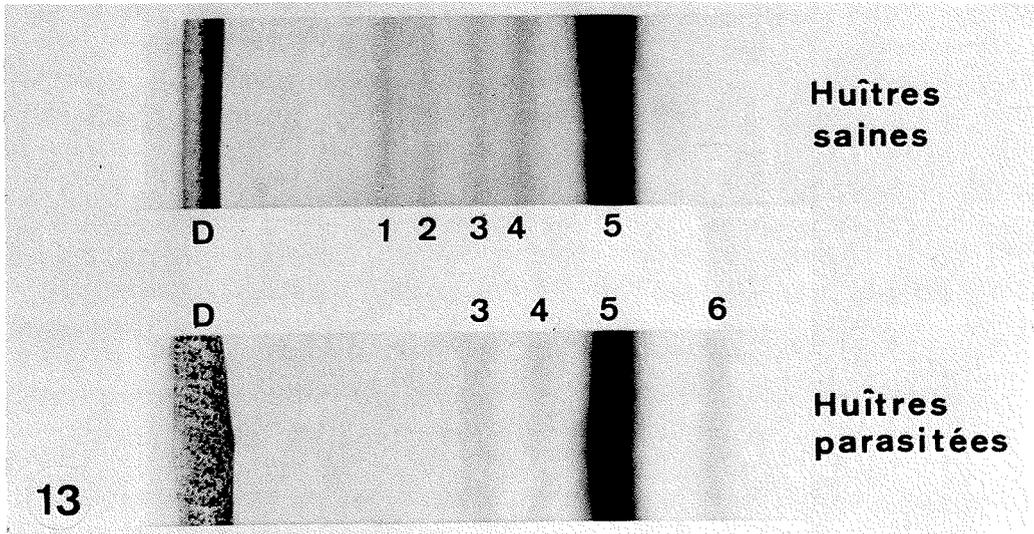


PLANCHE VII

Hyperplasie hémocytaire atypique associée à Marteilia refringens.
Microscopie photonique.

- Fig. 15 - Coupe montrant la prolifération d'hémocytes atypiques (→) dans le tissu conjonctif (Tc) de la glande digestive de l'huître. Les diverticules (Dd) sont envahis par le parasite (P).
microscopie photonique. X 1 000.
- Fig. 16 - Accumulation d'hémocytes dans les sinus sanguins (►) provoquant des embolies vasculaires.
microscopie photonique. X 1 000.
- Fig. 17 - Coupe montrant l'existence de formes polynucléées d'hémocytes atypiques (►).
coupe semi-fine. X 2 000.
- Fig. 18 - Figure de mitose caractérisée par la présence d'une plage très basophile à l'intérieur d'un hémocyte atypique (►).
coupe semi-fine. X 2 000.
- Fig. 19 - Cas de phagocytose d'un hémocyte atypique par un autre hémocyte (◡).
coupe semi-fine. X 2 000.

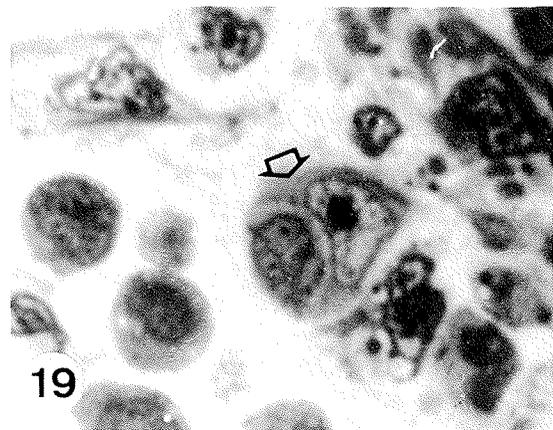
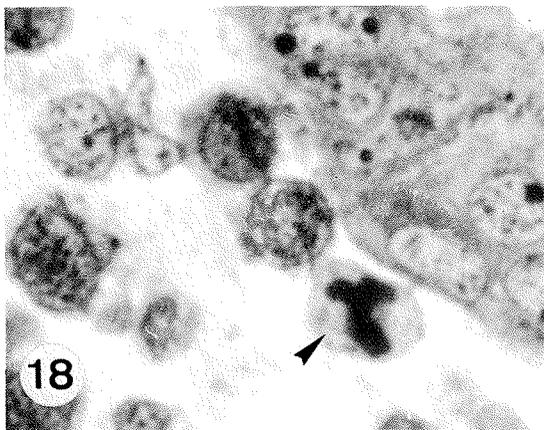
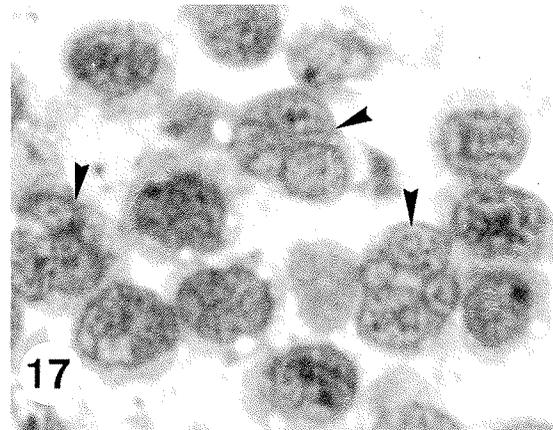
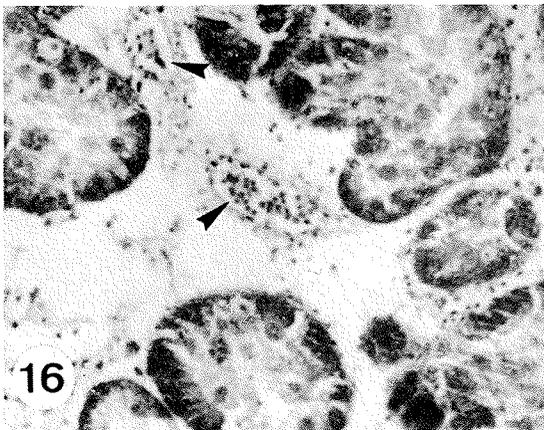
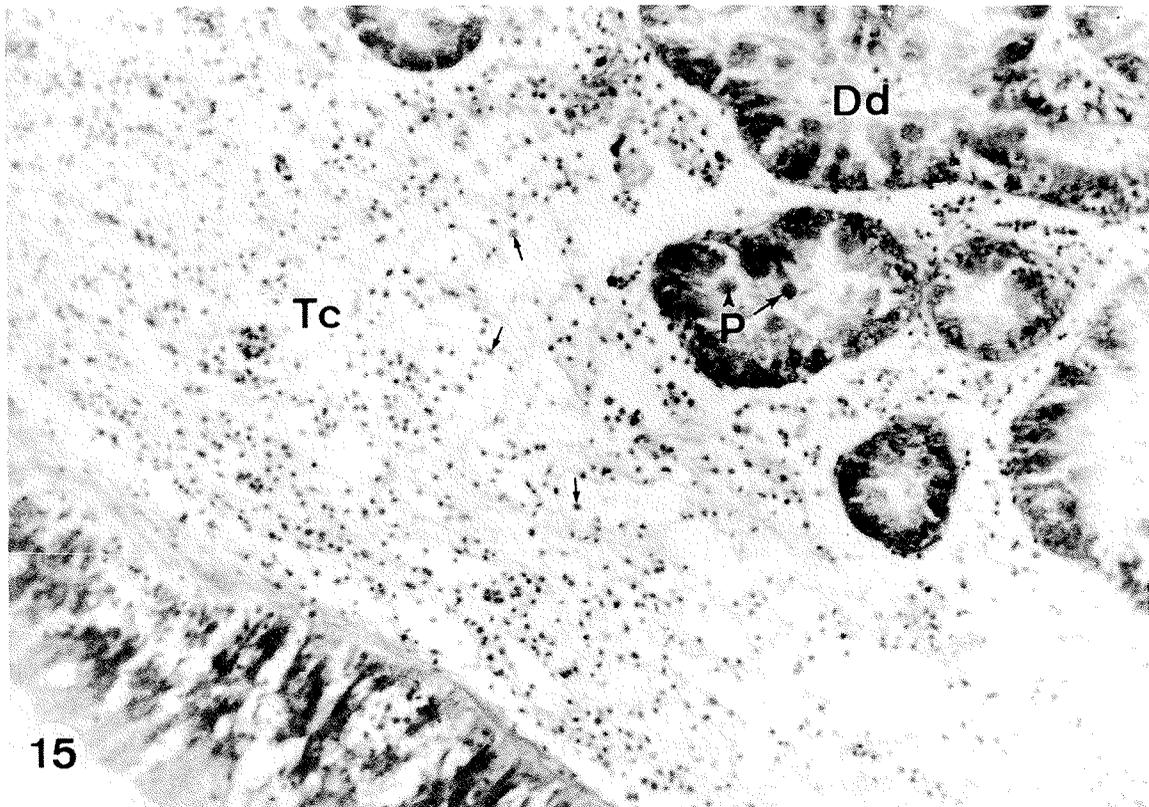


PLANCHE VIII

Hyperplasie hémocytaire atypique associée à Marteilia refringens.
Ultrastructure des hémocytes atypiques.

Fig. 20 - Vue générale d'hémocytes atypiques. Le cytoplasme de ces cellules présente des extensions digitées (ed) et de nombreux micropseudopodes (►). Dans le cytoplasme les mitochondries (m) sont allongées ; le noyau (N) a un profil irrégulier.
n : nucléole.
microscopie électronique. X 10 000.

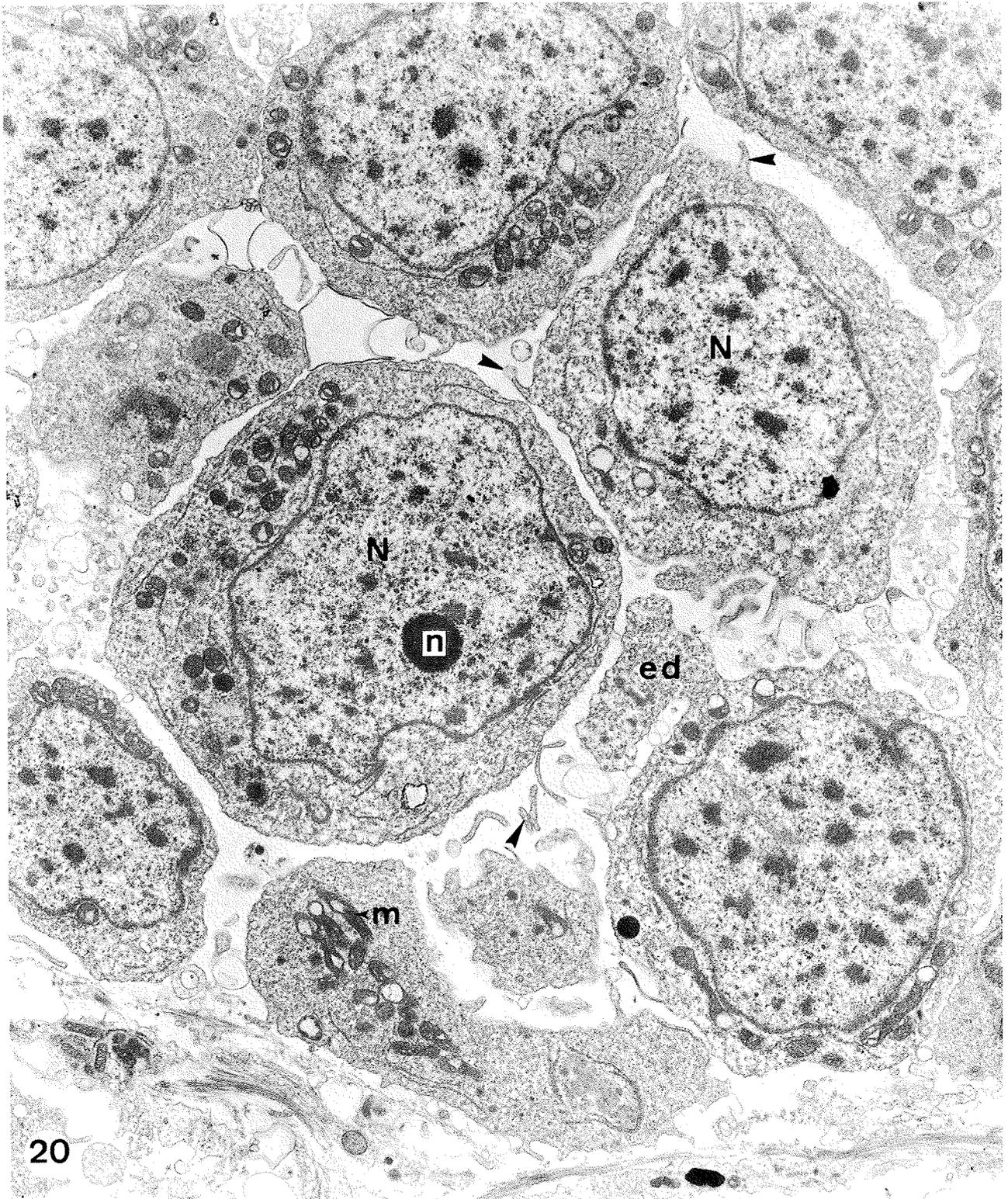


PLANCHE IX

Hyperplasie hémocytaire atypique associée à Marteilia refringens.
Ultrastructure des hémocytes atypiques.

Fig. 21 - Regroupement de mitochondries (m) agglomérées dans un "ciment" (ci) de matériel dense, à l'intérieur d'une cellule atypique.

N : noyau.

microscopie électronique. X 28 000.

Fig. 22 - Particularités ultrastructurales de la zone de contact de deux noyaux juxtaposés, observés dans certaines cellules atypiques. Entre les membranes nucléaires (mn) vis à vis on peut voir généralement du matériel dense (*). Toutefois en certains points ce matériel est absent identifiant des lacunes (l), ou est partagé par une membrane à deux feuillets séparés par un espace clair (►).

microscopie électronique. X 44 000.

Fig. 23 - Coupe montrant les extensions en forme de lobes (L) d'un noyau (N) d'un hémocyte atypique. Dans le cytoplasme de la cellule sont visibles de nombreuses vésicules (v) de taille très variable et des mitochondries (m) dont les membranes des citernes sont distendues.

re : reticulum endoplasmique.

microscopie électronique. X 26 000.

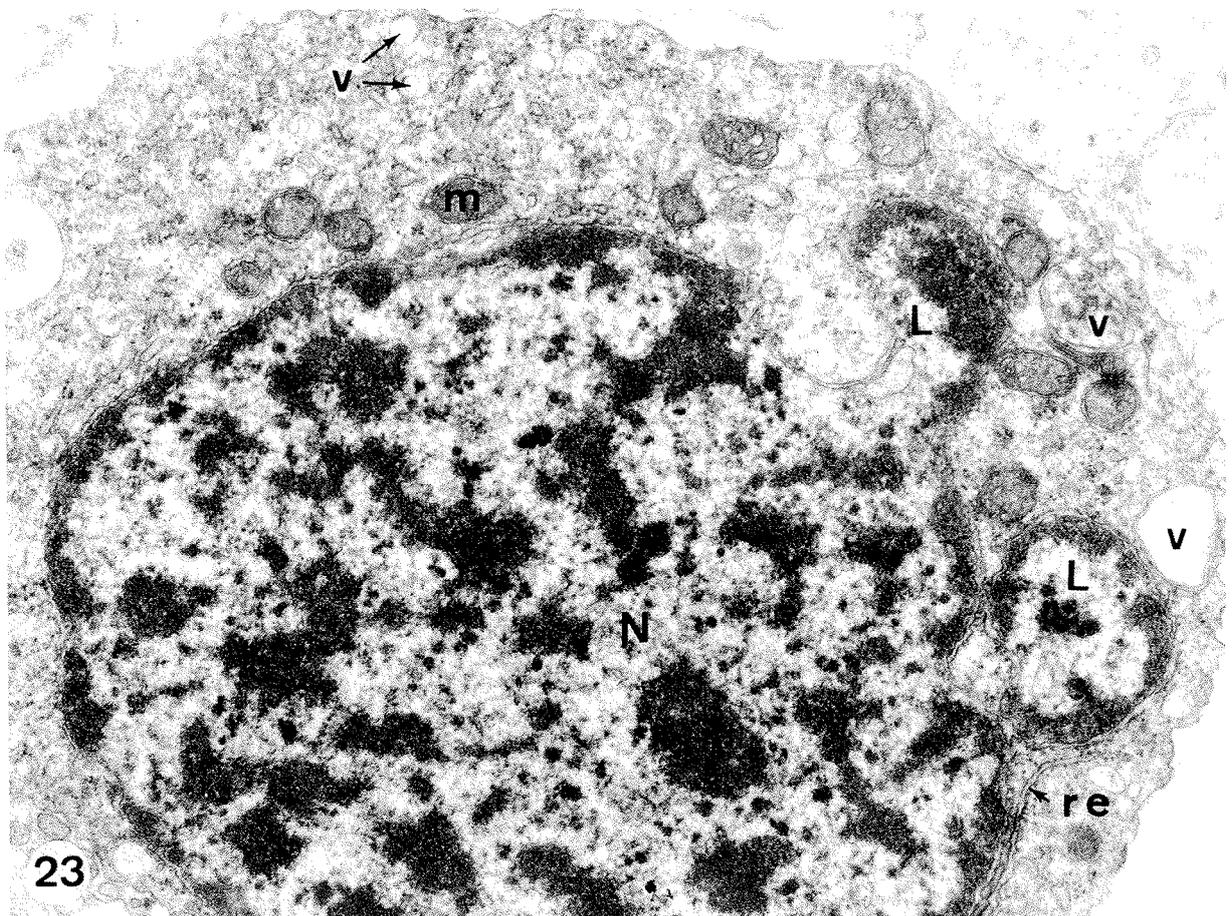
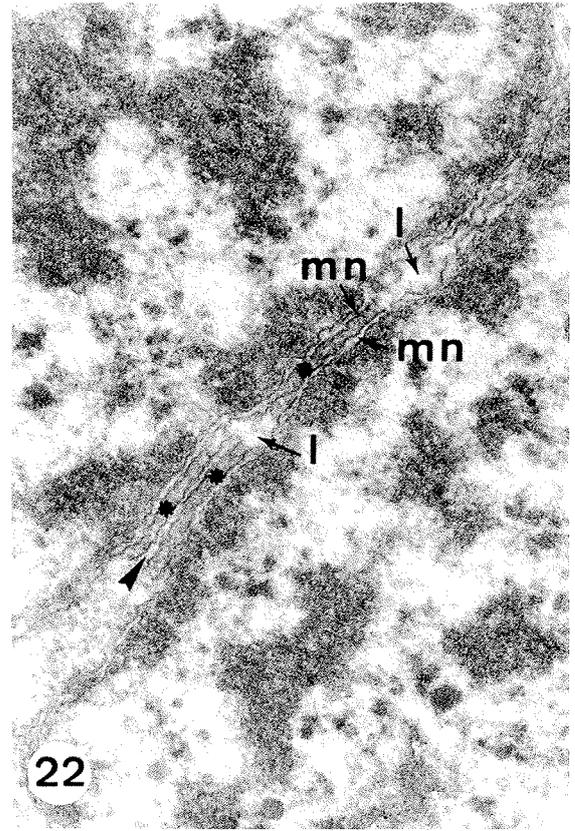
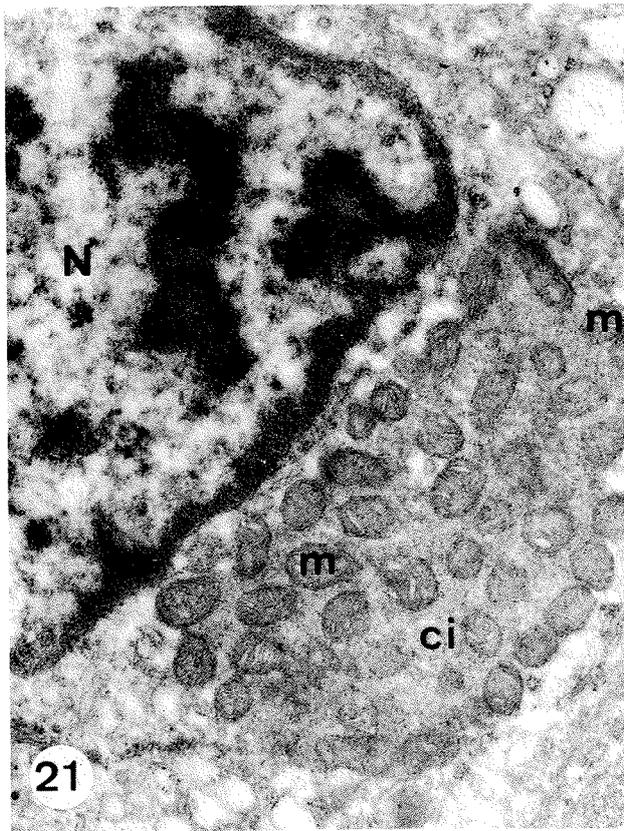


PLANCHE X

Hyperplasie hémocytaire atypique associée à Marteilia refringens.
Ultrastructure des hémocytes atypiques.

Fig. 24 et 25 - Les extensions en forme de lobes du noyau (N) peuvent être fortement aggrandies - Fig. 24 - et apparaître selon le plan de section de la cellule comme un autre noyau - Fig. 25 -, donnant à l'hémocyte un aspect binucléé.
microscopie électronique. Fig. 24 : X 11 400 ; Fig. 25 : 10 200.

Fig. 26 - Hémocyte polynucléé.

N : noyau.

microscopie électronique. X 10 000.

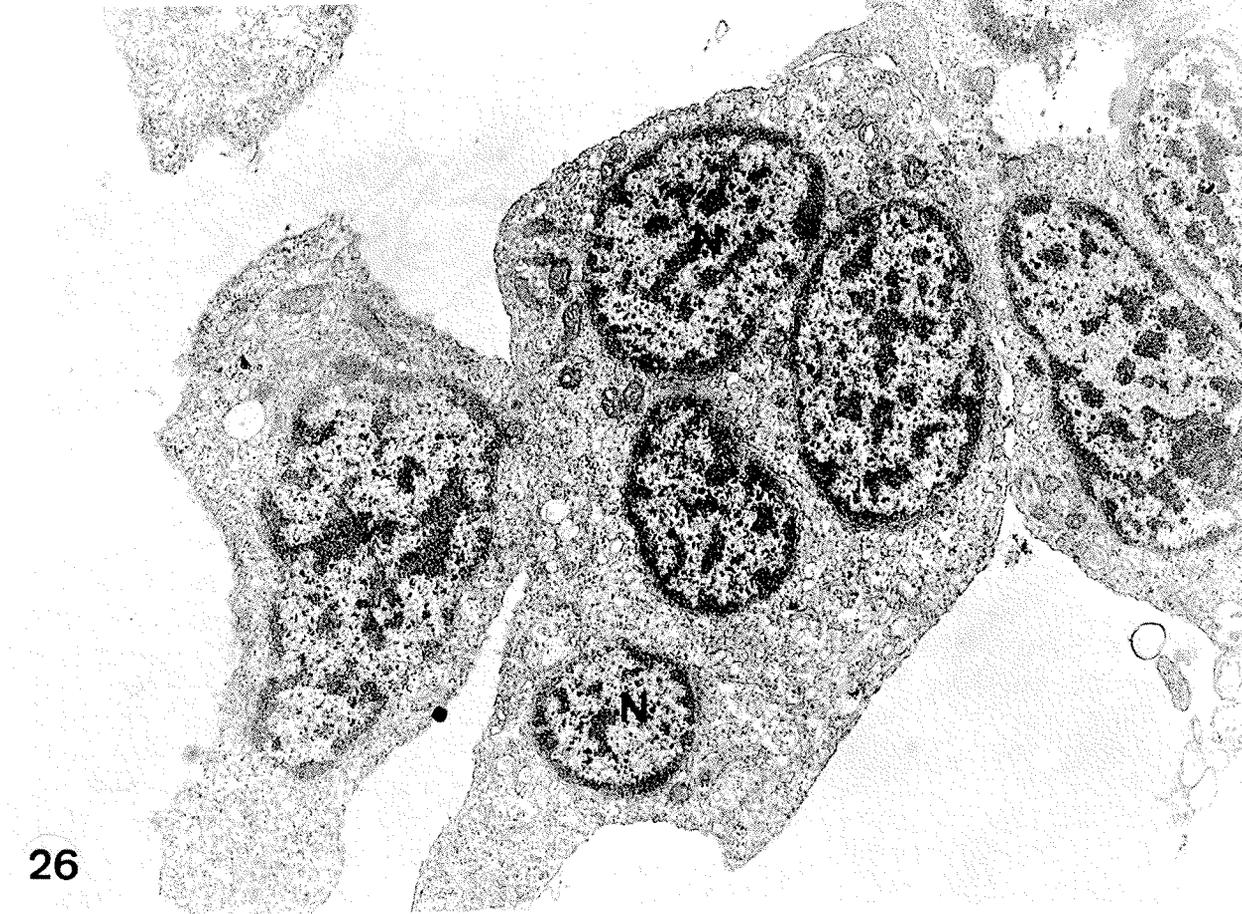
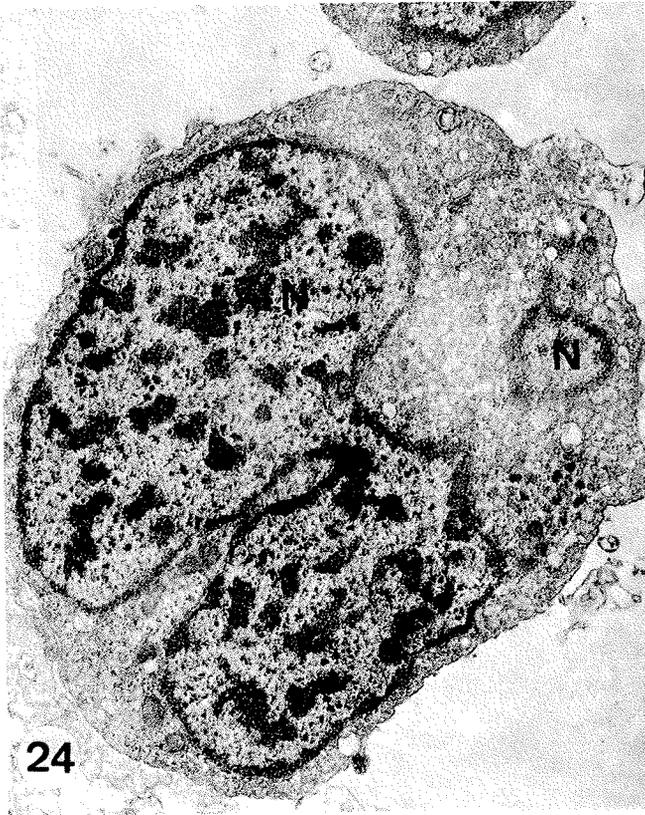


PLANCHE XI

Hyperparasitisme de Marteilia refringens par Nosema ormieresi.
Microscopie photonique.

- Fig. 27 - Section d'un diverticule digestif montrant la présence au côté de formes normales de M.refringens (Mr), des formes anormales du parasite infestées par des spores de N.ormieresi.
fp : forme parasitée de M.refringens.
coupe semi-fine. X 2 000.
- Fig. 28 - Forme jeune de M.refringens parasitée par des spores (sp) de N.ormieresi.
coupe semi-fine. X 2 500.
- Fig. 29 - Forme évoluée de M.refringens dont le cytoplasme de la cellule primaire (C 1) renferme des spores (sp) et des stades de la sporogénèse (cs) de N.ormieresi.
S : sporange de M.refringens.
coupe semi-fine. X 2 750.
- Fig. 30 - Forme de M.refringens envahie essentiellement par des stades sporogoniques de la Microsporidie.
cs : cellule sporogonique.
coupe semi-fine. X 3 000.

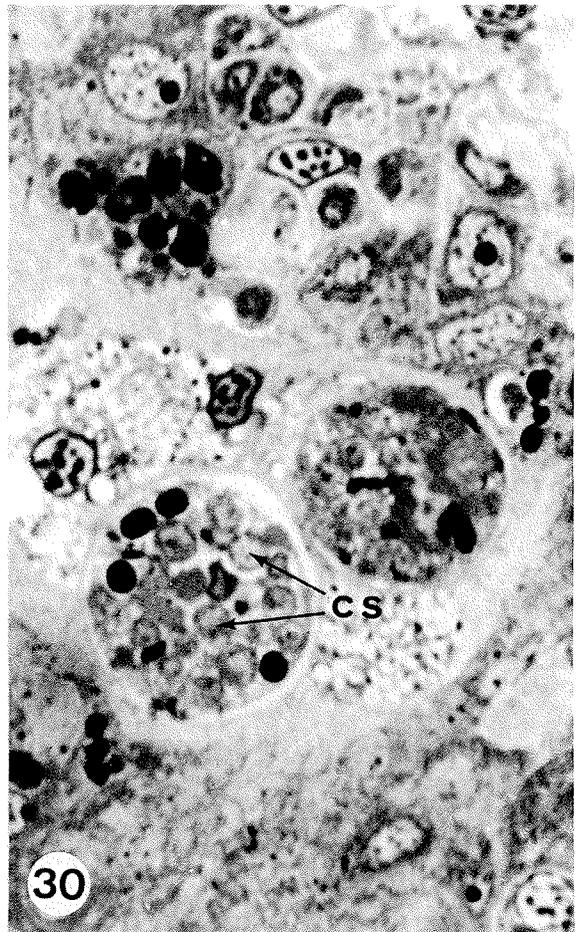
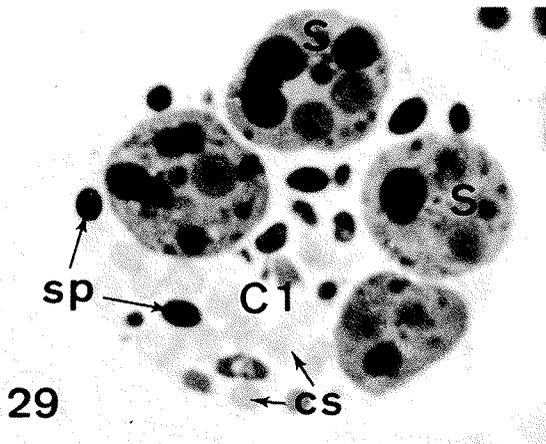
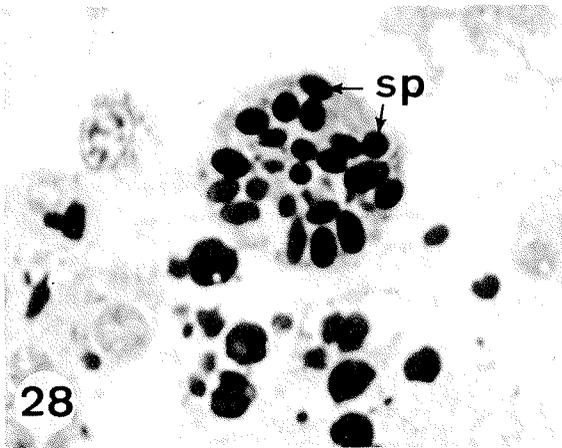
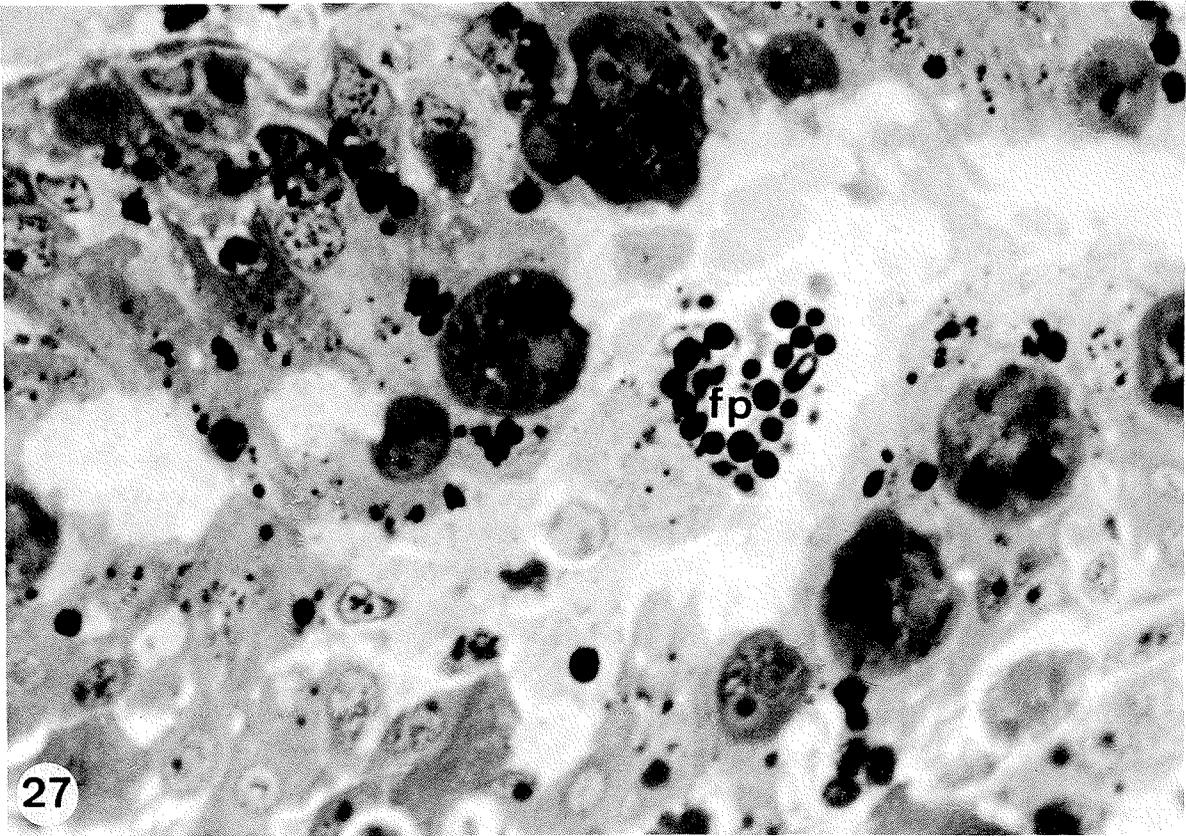


PLANCHE XII

Hyperparasitisme de Marteilia refringens par Nosema ormieresi.
Microscopie électronique.

Fig. 31 - Forme jeune de M.refringens parasitée par différents stades du développement de N.ormieresi. Les spores (sp) et les cellules sporogoniques (cs) de la Microsporidie sont localisées dans la cellule primaire (C 1) de M.refringens, dans le cytoplasme de laquelle on reconnaît une cellule secondaire (C 2), des inclusions paracrystallines (ip) et des particules denses structurées (pds).
microscopie électronique. X 10 000.

Fig. 32 - Partie d'une cellule primaire de M.refringens parasitée, montrant que le cytoplasme de celle-ci reste intact, malgré la présence de spores (sp).
ip : inclusion paracrystalline - pds : particule dense structurée.
microscopie électronique. X 47 000.

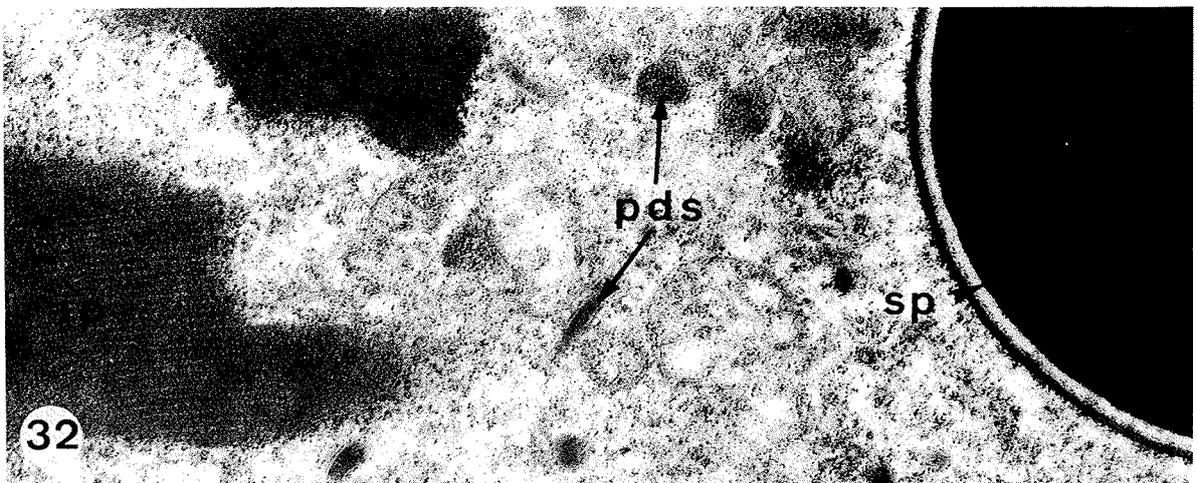
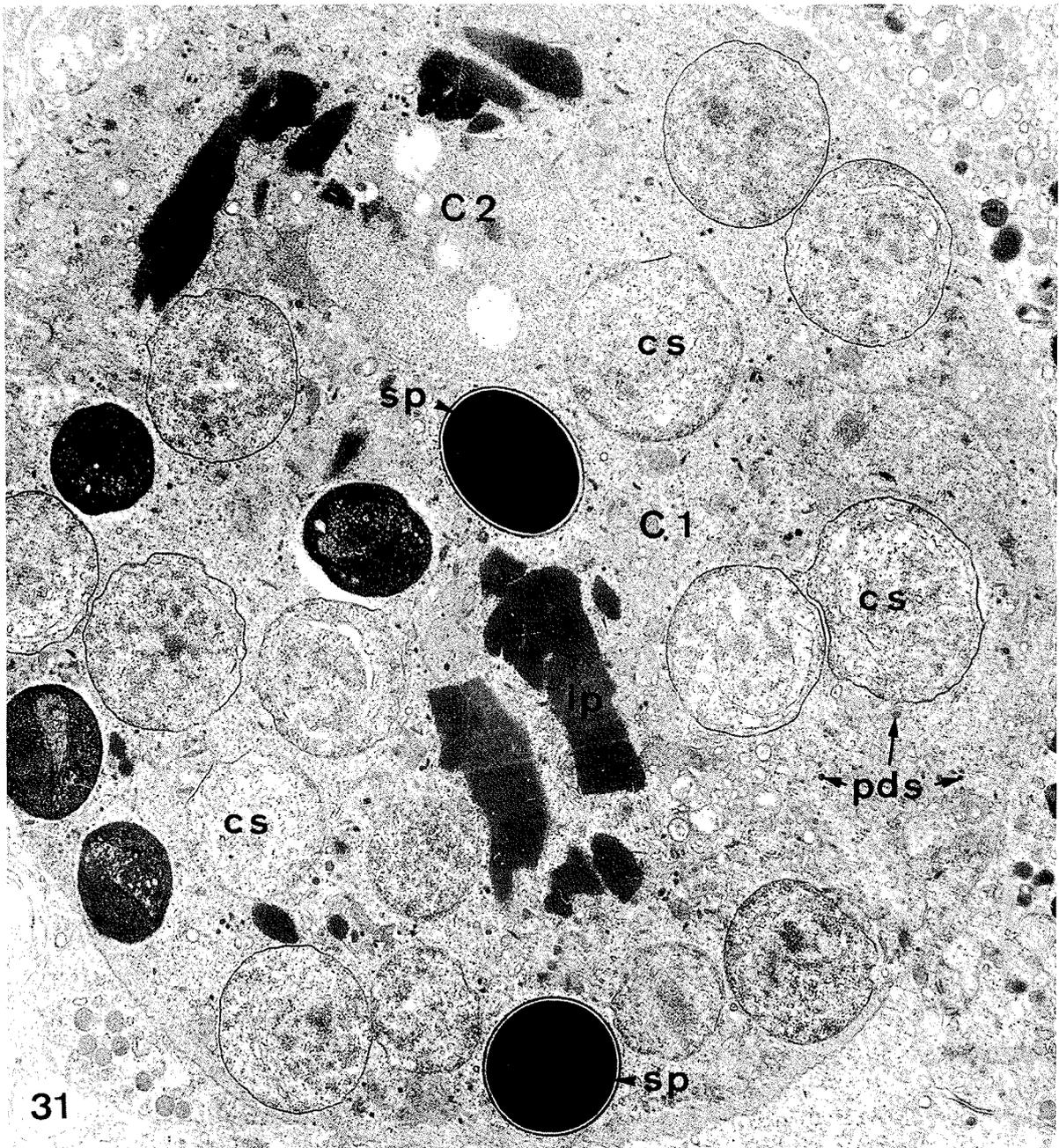


PLANCHE XIII

Hyperparasitisme de Marteilia refringens par Nosema ormieresi.

Ultrastructure des stades du cycles de développement
de la Microsporidie.

Fig. 33 - Coupe montrant les cellules mérogoniques (cm) à diplocaryon (d) de
N.ormieresi.
microscopie électronique. X 16 000.

Fig. 34 - Cellules sporogoniques (cs) à diplocaryon (d) du cycle de développe-
ment de N.ormieresi.
microscopie électronique. X 11 700.

Fig. 35 - Sporonte dans le cytoplasme duquel, sont visibles des formations
réticulées (r) et des vacuoles (v).
N : noyau.
microscopie électronique. X 45 600.

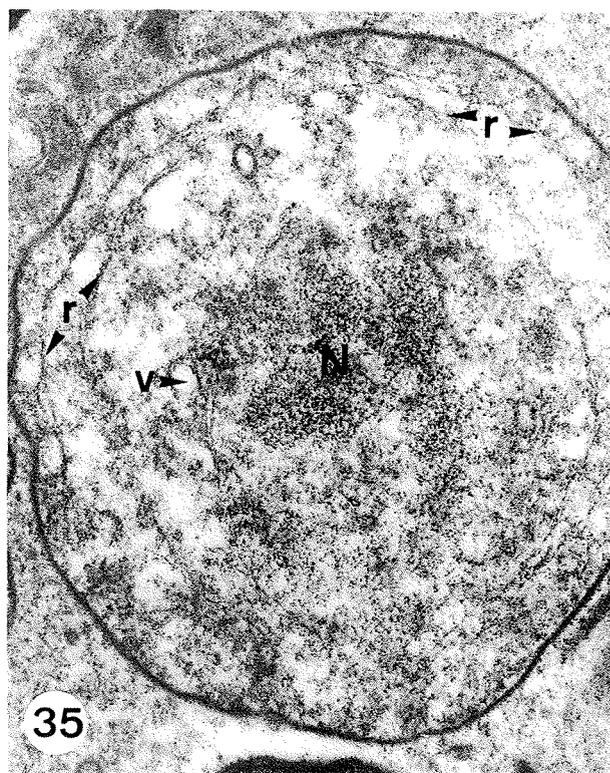
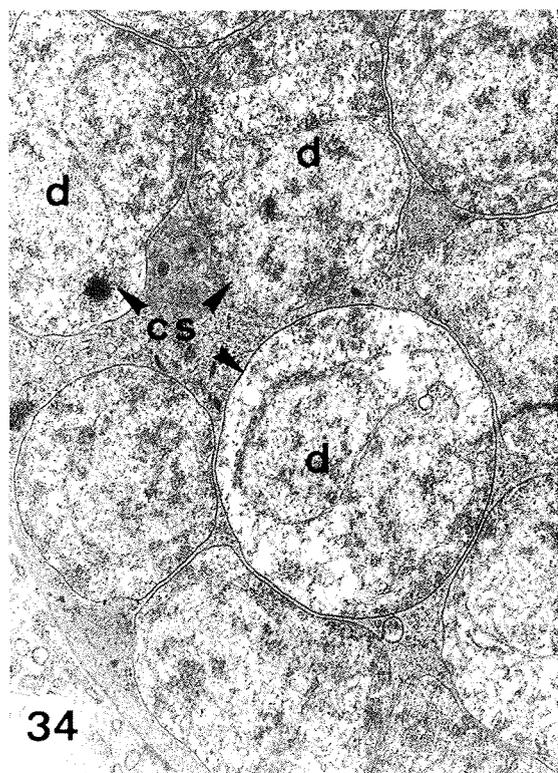
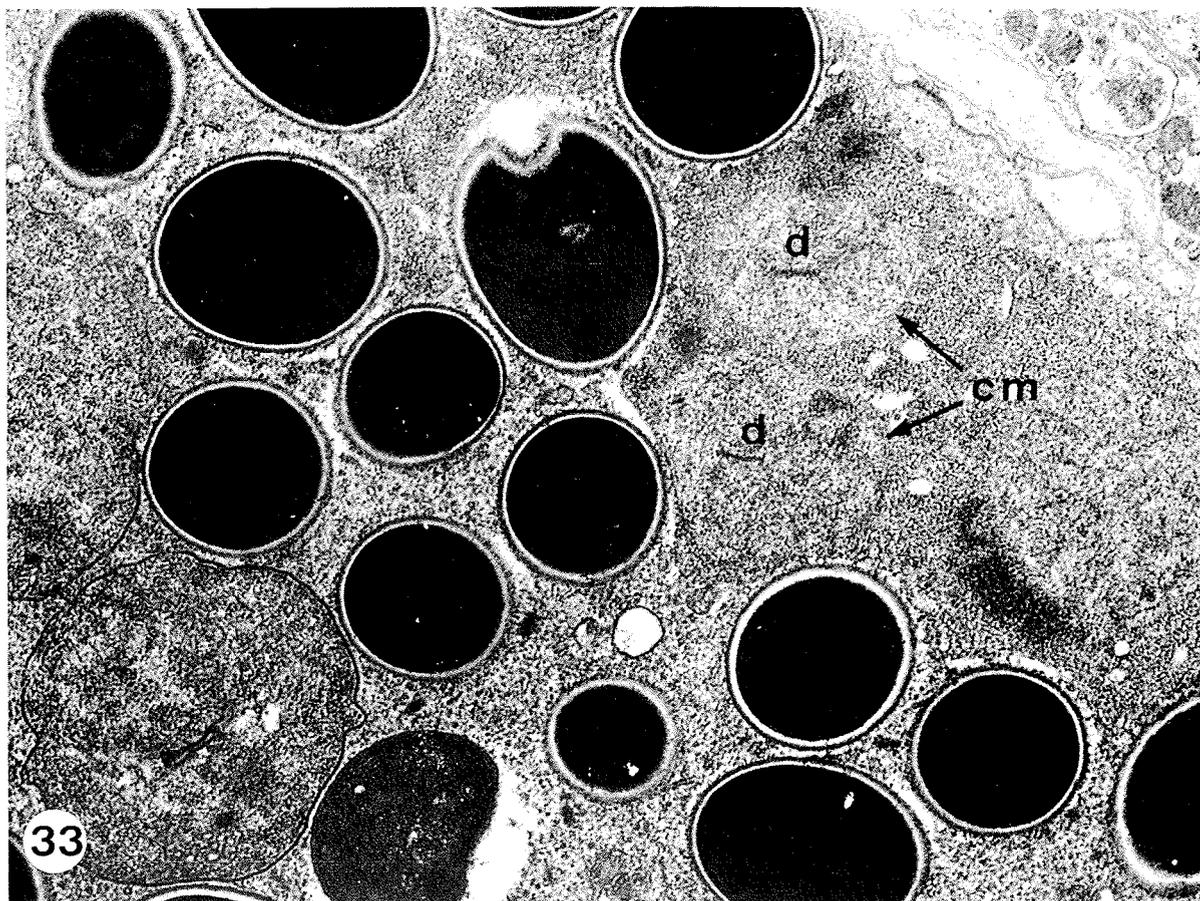


PLANCHE XIV

Hyperparasitisme de Marteilia refringens par Nosema ormieresi.
Ultrastructure de la spore de N.ormieresi.

Fig. 36 - Spore de N.ormieresi.

Ex : exospore - En : endospore - f : filament polaire - N : noyau -
P : polaroplaste.
microscopie électronique. X 67 600.

Fig. 37 - Coupe d'une spore de N.ormieresi montrant le sac polaire (spo) en
forme d'ancre ; du sac émerge le filament polaire (f).
microscopie électronique. X 22 500.

Fig. 38 - Coupe montrant la structure lamellaire (sl) du polaroplaste de la spore
de la Microsporidie.
f : filament polaire.
microscopie électronique. X 45 800.

Fig. 39 - Détail du filament polaire.

a : axe central - b : couche claire - c : enveloppe dense.
microscopie électronique. X 95 000.

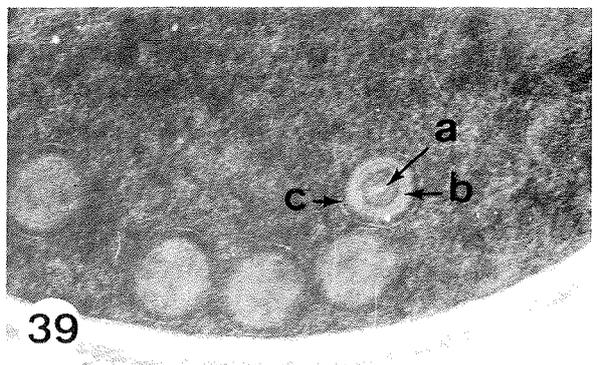
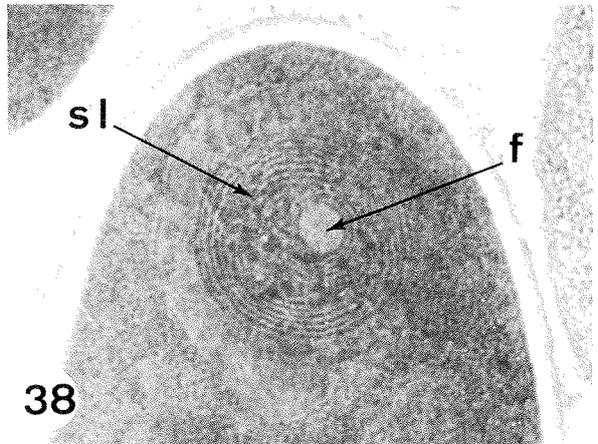
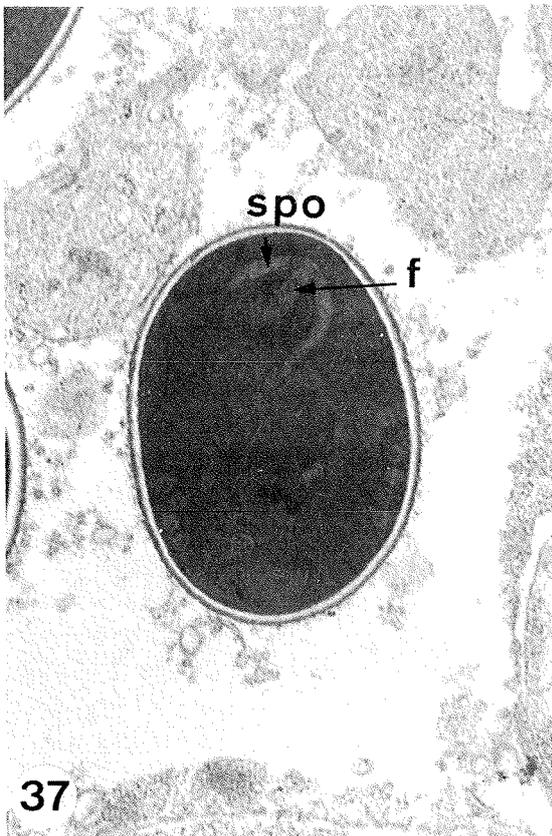
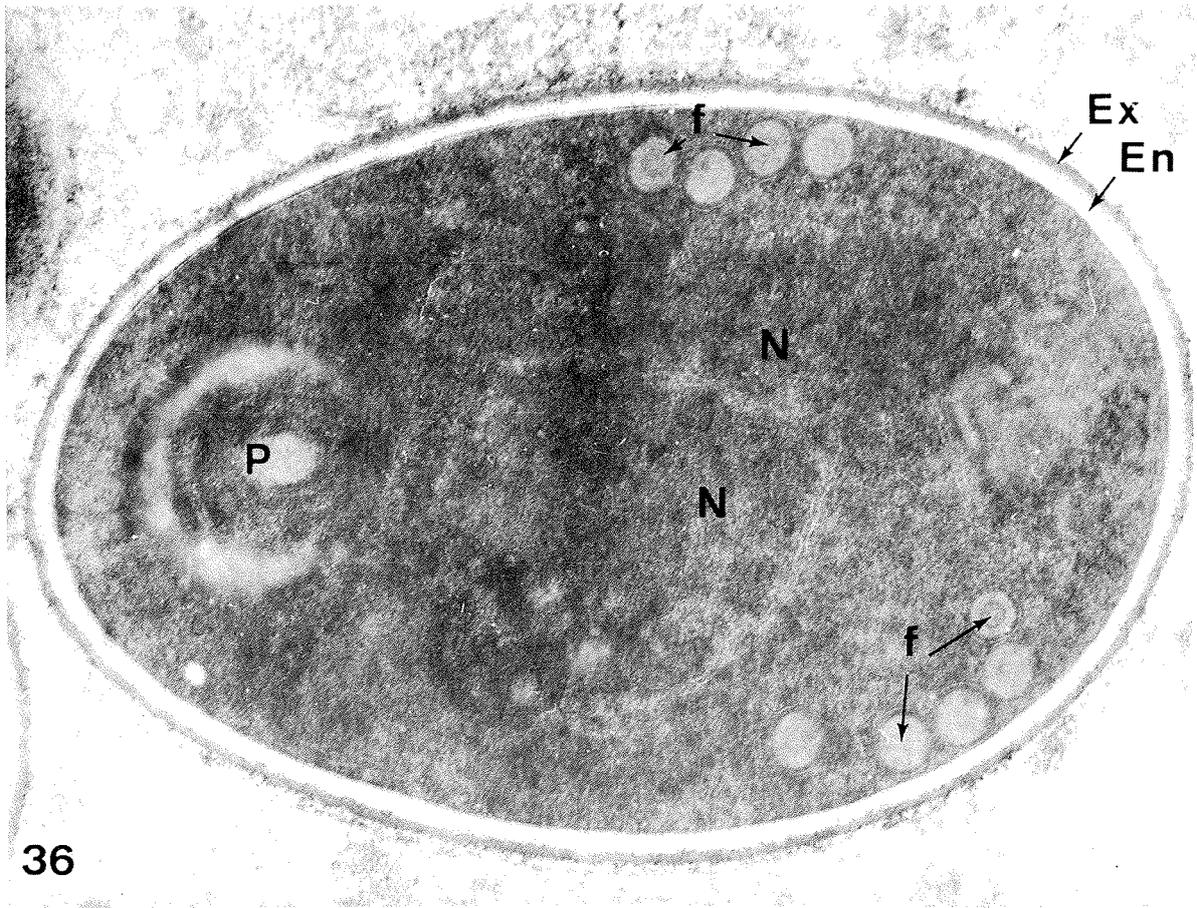


PLANCHE XV

Hyperparasitisme de Marteilia refringens par Nosema ormieresi.
Effets pathogènes de N.ormieresi vis à vis de M.refringens.

- Fig. 40 - Forme jeune de M.refringens envahie par les cellules sporogoniques (cs) de N.ormieresi. Les cellules secondaires (C 2) de l'hôte sont alors réduites et difficilement indentifiables.
C 1 : cellule primaire - ip : inclusions paracrystallines - pds : particules denses structurées.
microscopie électronique. X 9 000.
- Fig. 41 - Stade évolué du développement de M.refringens infesté par les cellules sporogoniques (cs) de N.ormieresi. Dans le cytoplasme de la cellule primaire (C 1) de l'hôte on observe de nombreuses vacuoles (v). Dans le sporange (S) le cytoplasme est condensé (*) autour des cellules tertiaires (C 3).
p : paroi du sporange.
microscopie électronique. X 7 100.
- Fig. 42 - Stade évolué de M.refringens infesté de spores (sp) de la Microsporidie. Le cytoplasme de la cellule primaire de l'hôte est fragmenté et condensé en masses cytoplasmiques (mc).
ip : inclusion paracrystalline - S : sporange.
microscopie électronique. X 9 000.
- Fig. 43 - Forme de fin de cycle de M.refringens parasitée par des spores de N.ormieresi. Le cytoplasme des sporanges (S), où sont apparues à côté des cellules tertiaires (C 3) des masses protéiniques amorphes (MA), est réduit en travées anastomosées (►).
sp : spore de la Microsporidie.
microscopie électronique. X 7 300.

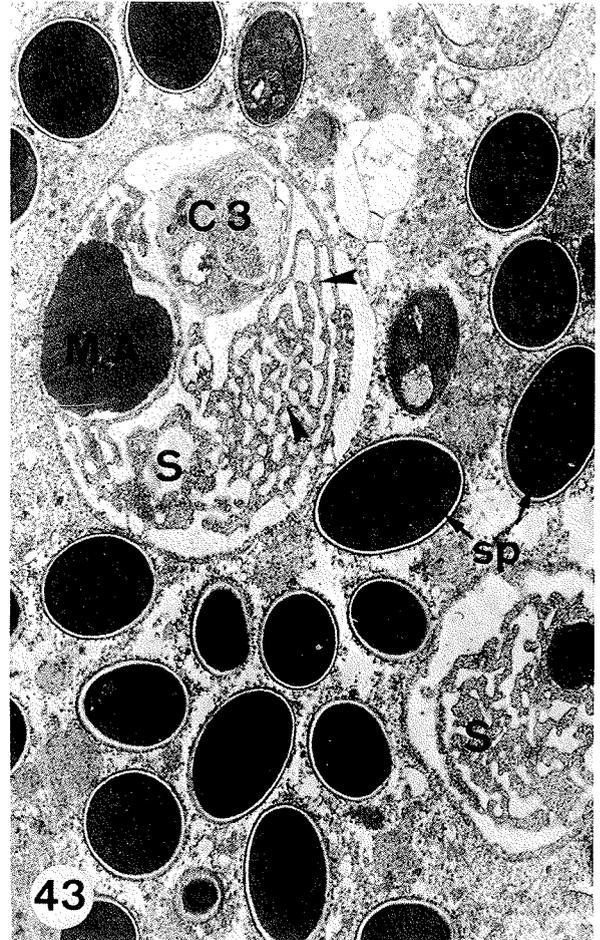
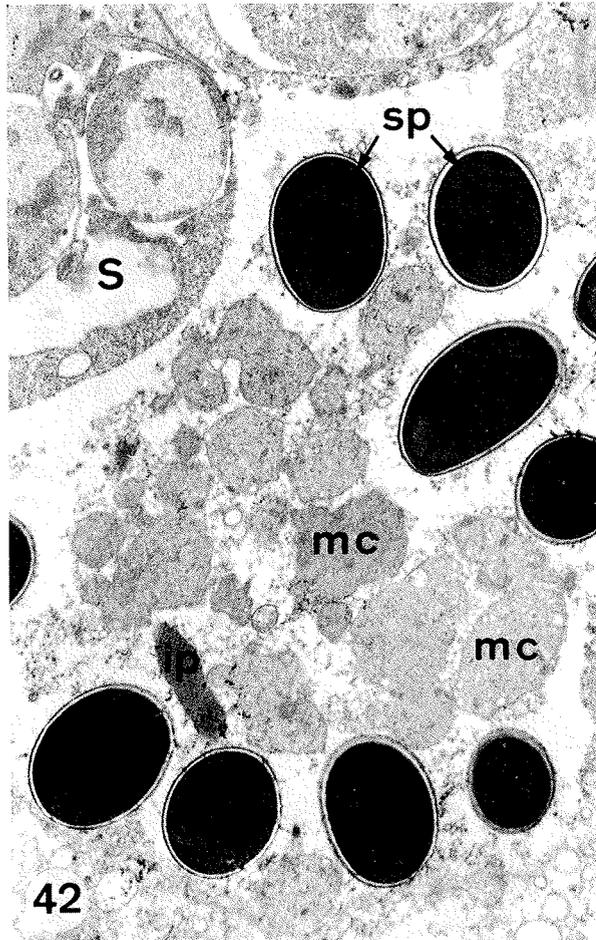
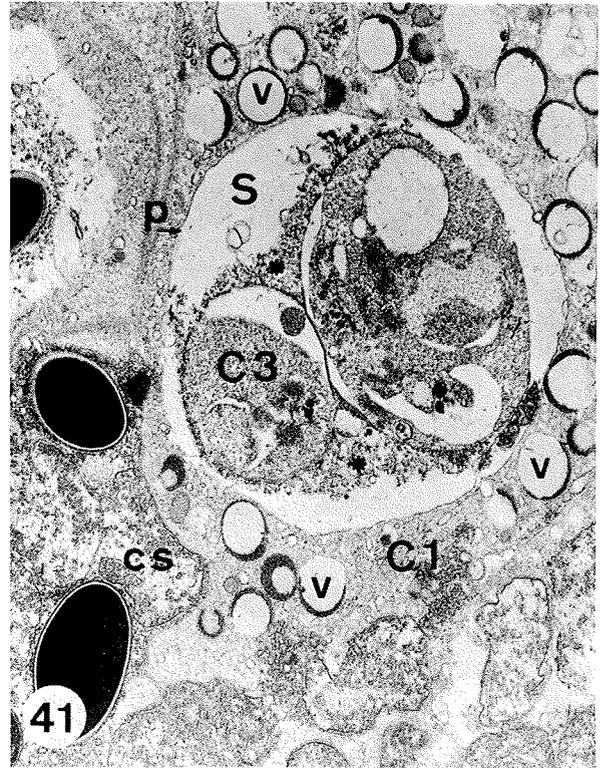
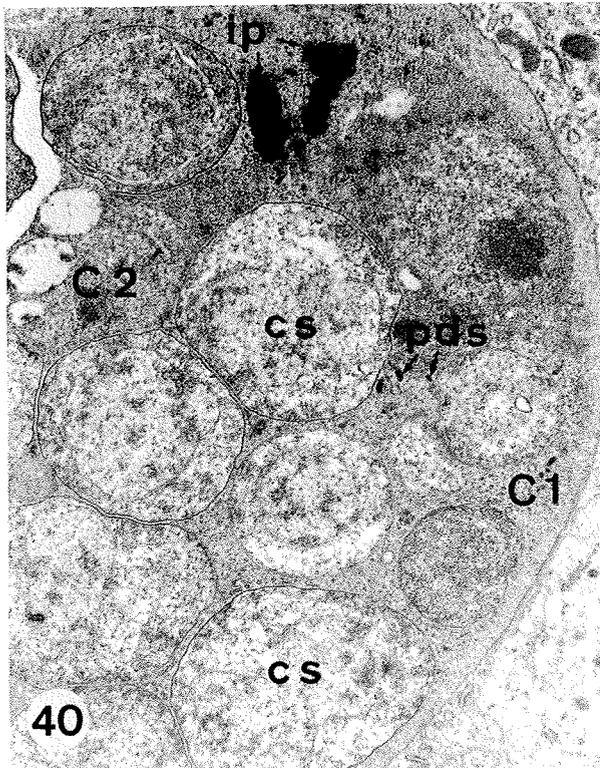


PLANCHE XVI

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Microscopie photonique.

- Fig. 44 - Spore "in vivo" avec ses deux filaments (f).
étalement. X 2 000.
- Fig. 45 - Petit plasmode (Pp) et grands plasmodes (Gp) localisés dans une zone
lacuneuse du conjonctif de la masse digestive.
coupe semi-fine. X 2 000.
- Fig. 46 - Forme jeune de sporonte ou sporonte précoce présentant de nombreux
noyaux (N) et de nombreuses granulations denses (g).
coupe semi-fine. X 2 700.
- Fig. 47 - Élément en "syncytium" caractérisé par le fractionnement du cyto-
plasma et la condensation de celui-ci autour des noyaux.
coupe semi-fine. X 2 600.
- Fig. 48 - Sporoblastes uninucléés (S) et à cytoplasme unique à l'intérieur
d'un sporonte.
coupe semi-fine. X 2 200.
- Fig. 49 - Spôrocyste contenant les premières formes de spores ou prés pores.
Celles-ci possèdent à côté de leur noyau (N) une formation légè-
rement basophile ou sphérule (Se) et des zones claires d'aspect vacuo-
laire.
coupe semi-fine. X 2 000.
- Fig. 50 - Sporocystes avec spores à différents stades de maturité.
Sp j : spore "jeune" - Sp m : spore "mûre".
coupe semi-fine. X 1 400.

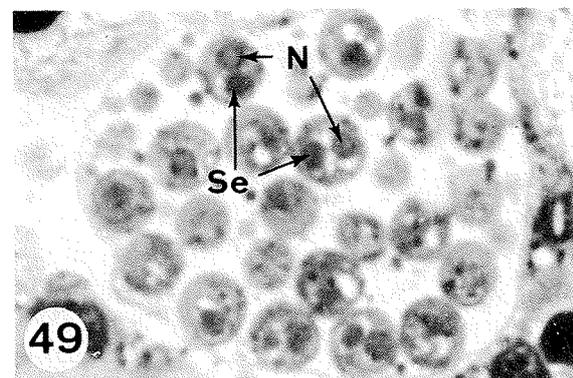
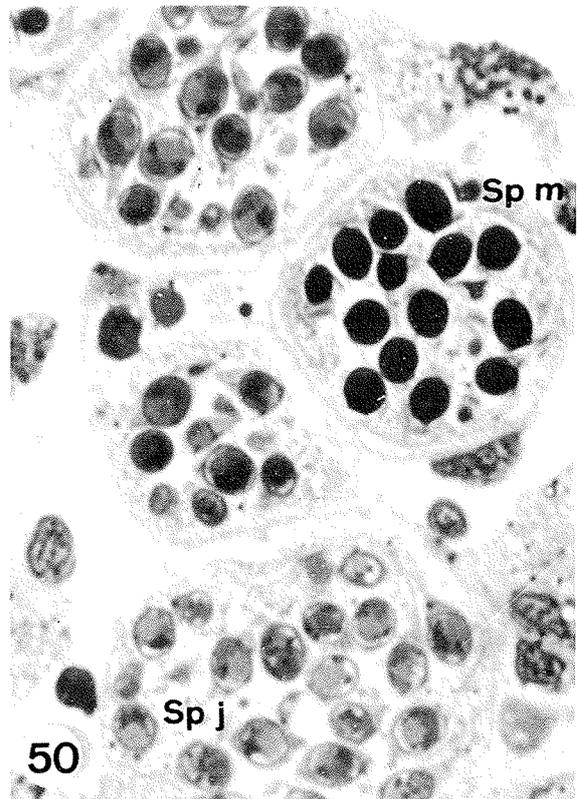
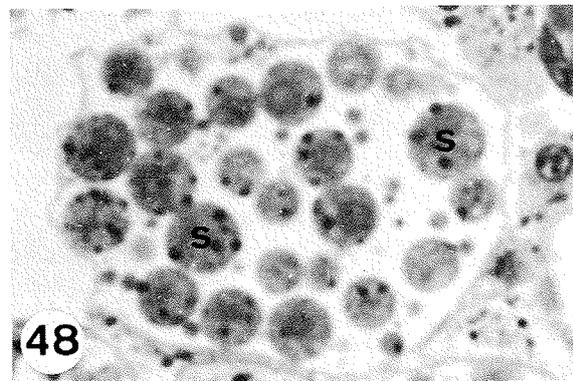
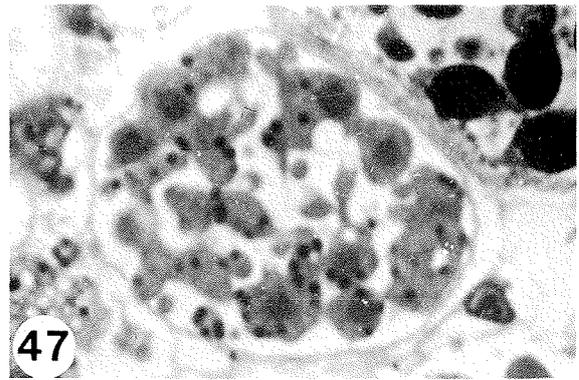
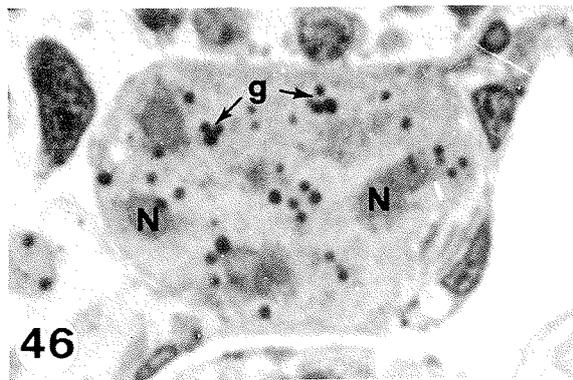
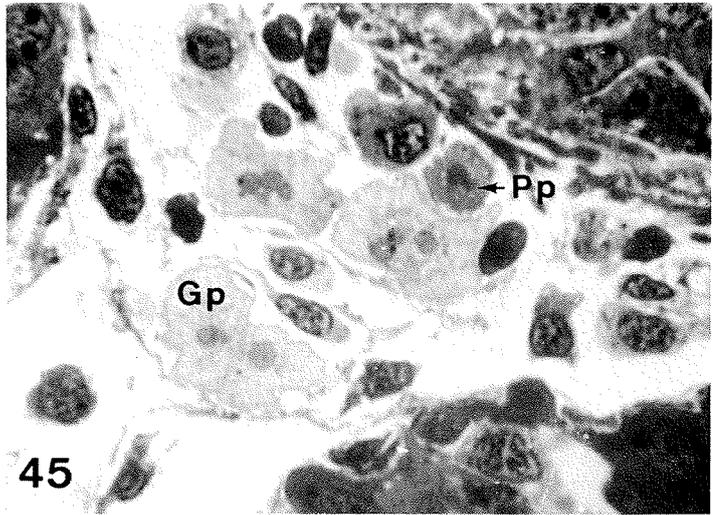
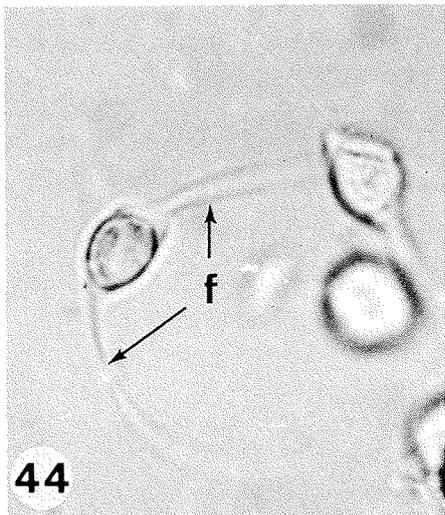


PLANCHE XVII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.
Ultrastructure des stades du cycle de développement.

Fig. 51 - Petit plasmode fusiforme dont le cytoplasme riche en ribosomes contient deux noyaux (N), des haplosporosomes (h), des mitochondries (m) et où est visible une gouttelette lipidique (L).

n : nucléole.

microscopie électronique. X 30 000.

Fig. 52 - Détail d'un petit plasmode montrant la constitution à deux feuillets de sa membrane externe (►) et la structure bipartite des haplosporosomes (h).

microscopie électronique. X 47 500.

Fig. 53 - Coupe montrant le rapport de taille des deux types de plasmodes, grand (Gp) et petit (Pp) et les éléments d'un grand plasmode.

L : gouttelette lipidique - m : mitochondrie - me : membrane externe - N : noyau - rm : réseau membranaire interne.

microscopie électronique. X 7 000.

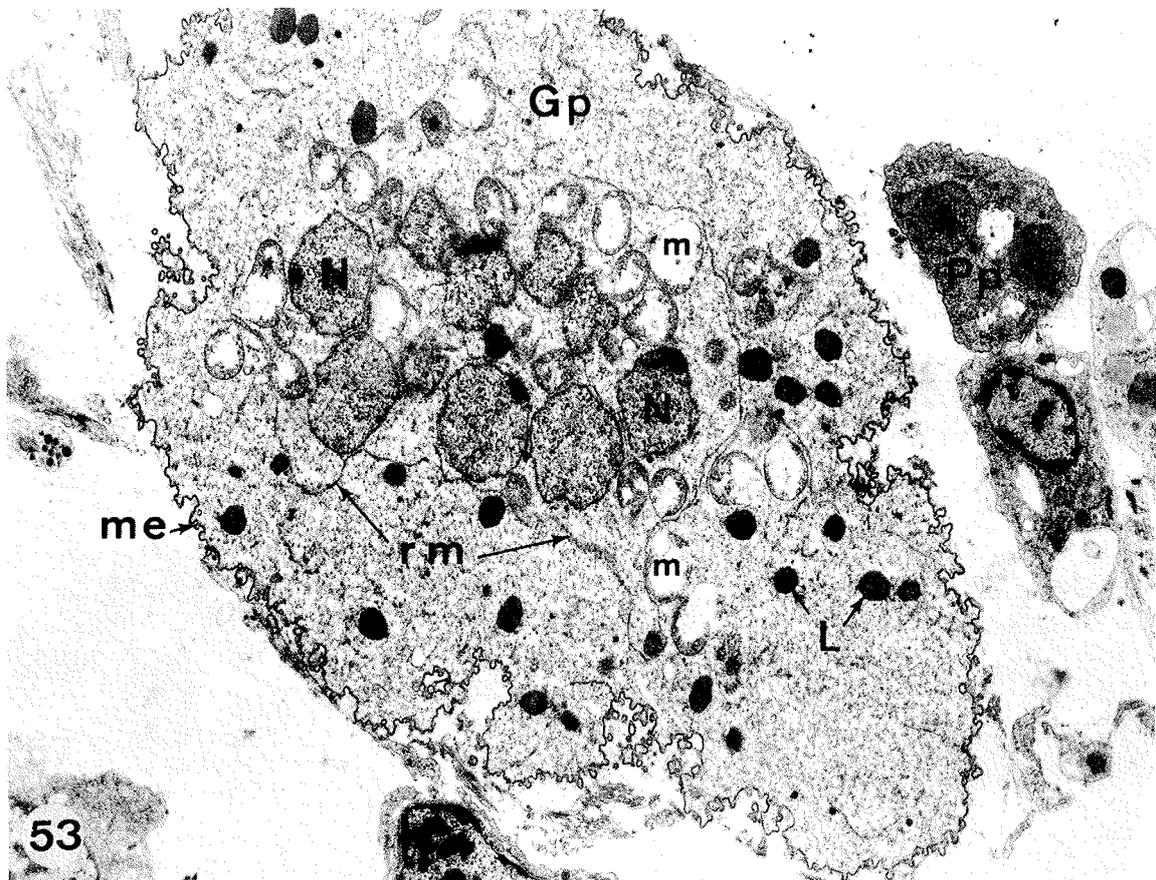
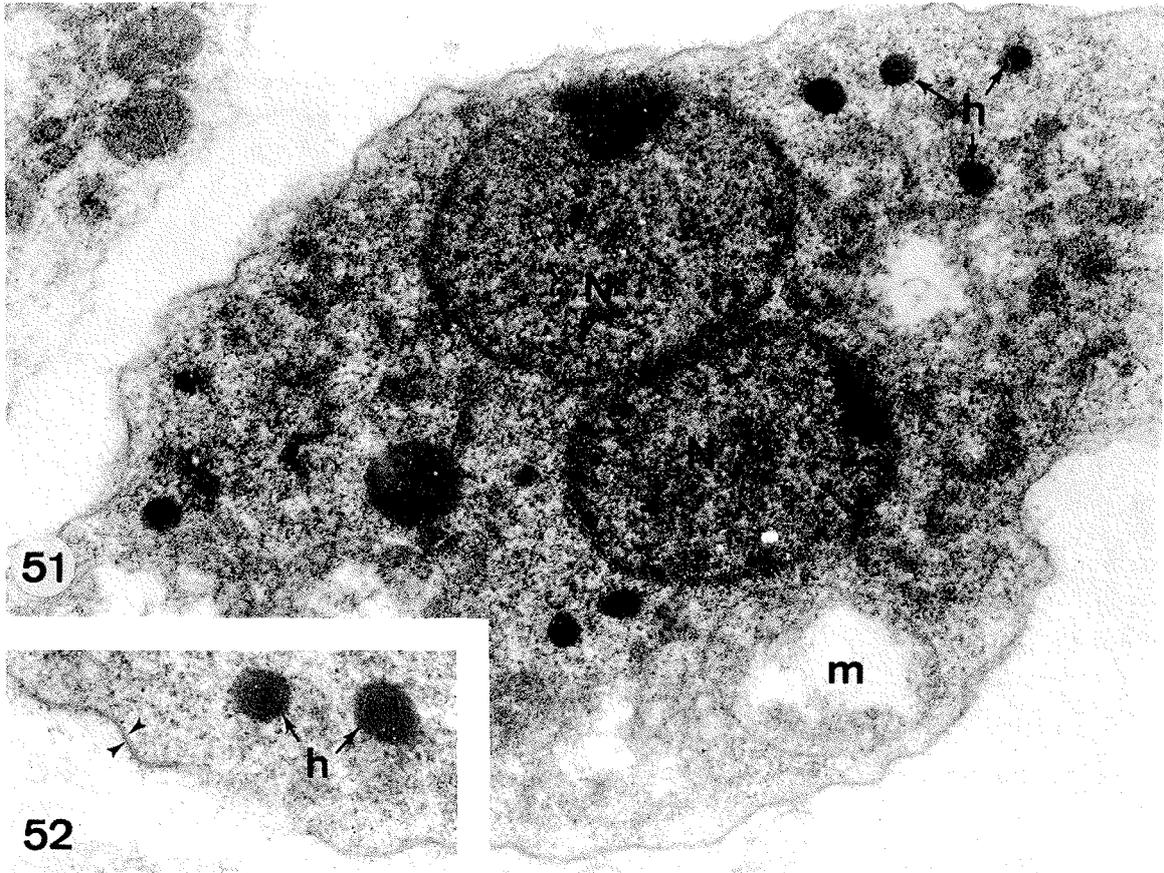


PLANCHE XVIII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Ultrastructure des stades du cycle de développement.

Fig. 54 - Partie de la membrane externe d'un grand plasmode. Sur sa face externe sont visibles par endroit des microformations circulaires (□).

Cp : cytoplasme du plasmode.

microscopie électronique. X 28 800.

Fig. 55 - Coupe d'un grand plasmode montrant le réseau membranaire interne (►), s'insinuant entre les noyaux (N).

microscopie électronique. X 15 000.

Fig. 56 - Détail de la membrane à deux feuillets (►) du réseau interne d'un grand plasmode.

microscopie électronique. X 22 500.

Fig. 57 - Noyaux d'un grand plasmode associés par trois, présentant un espace périnucléaire commun (epn). Dans l'un des noyaux est visible un faisceau de microtubules (Fm) partie de l'appareil mitotique ou Kernstab.

microscopie électronique. X 39 000.

Fig. 58 - Faisceau de microtubules (Fm) et corps polaire (cp) à l'intérieur d'un noyau.

microscopie électronique. X 22 500.

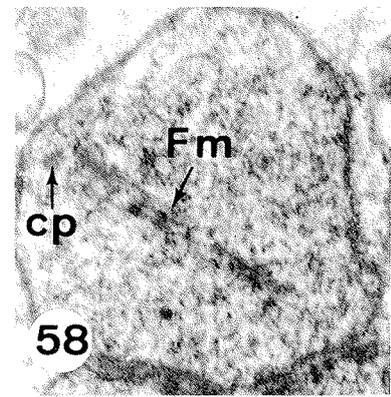
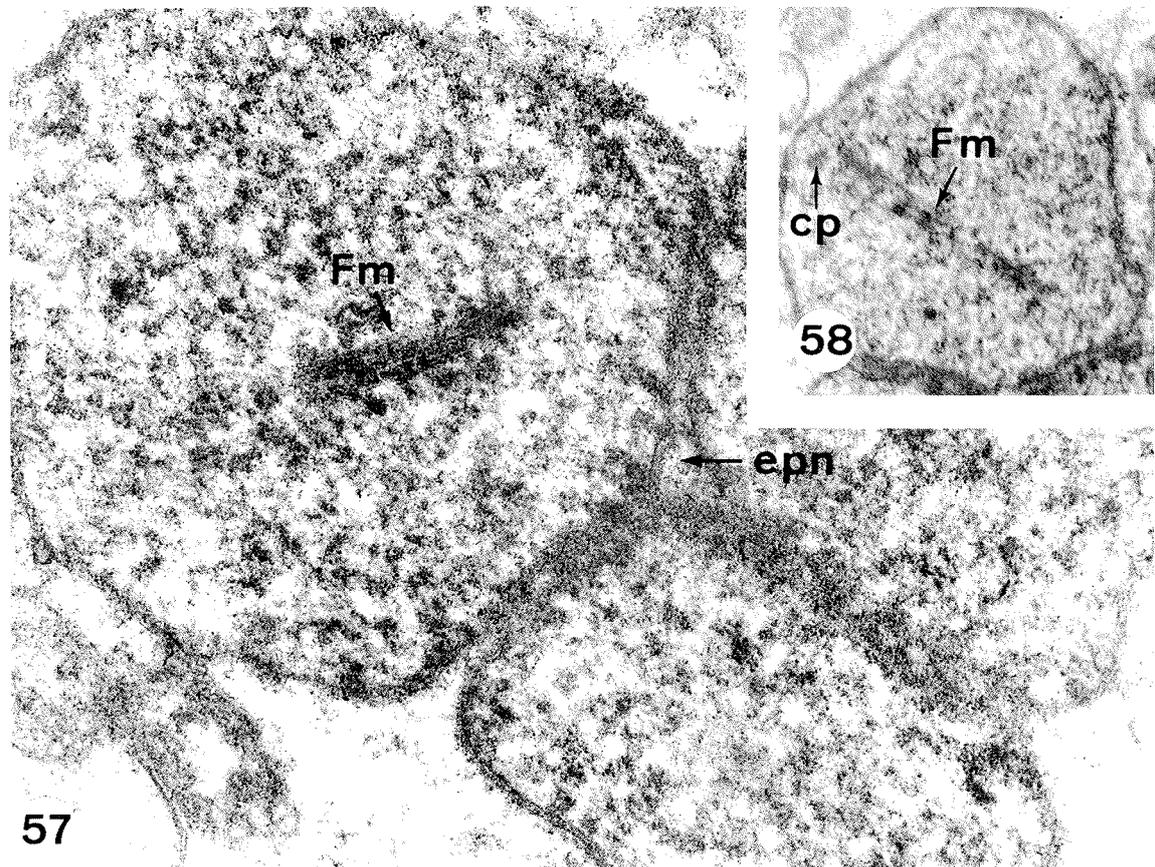
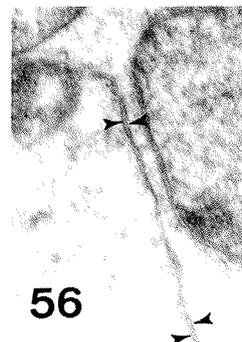
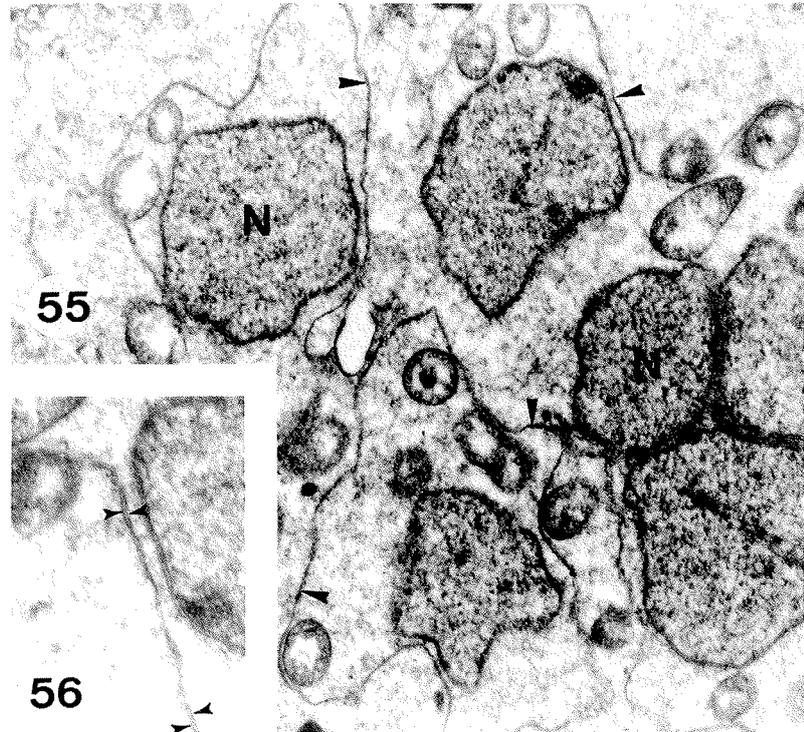
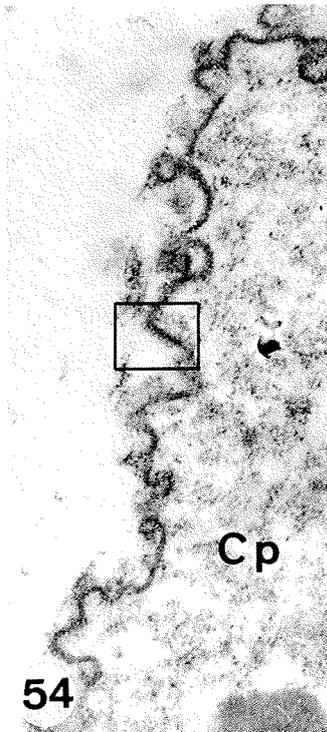


PLANCHE XIX

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.
Ultrastructure des stades du cycle de développement.

Fig. 59 - Sporonte précoce à l'intérieur duquel on observe l'accumulation de matériel dense (►) contre les feuillettes du réseau membranaire interne (rm).

L : gouttelette lipidique - m : mitochondrie - N : noyau.
microscopie électronique. X 9 400.

Fig. 60 - Phase de fragmentation du cytoplasme d'un sporonte précoce.
microscopie électronique. X 7 600.

Fig. 61 - Phase de condensation du cytoplasme d'un sporonte précoce individualisant des masses cytoplasmiques polymorphes et polynucléées. Le matériel dense forme des structures continues (►) contre la membrane des masses cytoplasmiques.
microscopie électronique. X 6 000.

Fig. 62 - Scission des masses polynucléées par constriction du cytoplasme (►).
N : noyau.
microscopie électronique. X 9 400.

PLANCHE XIX

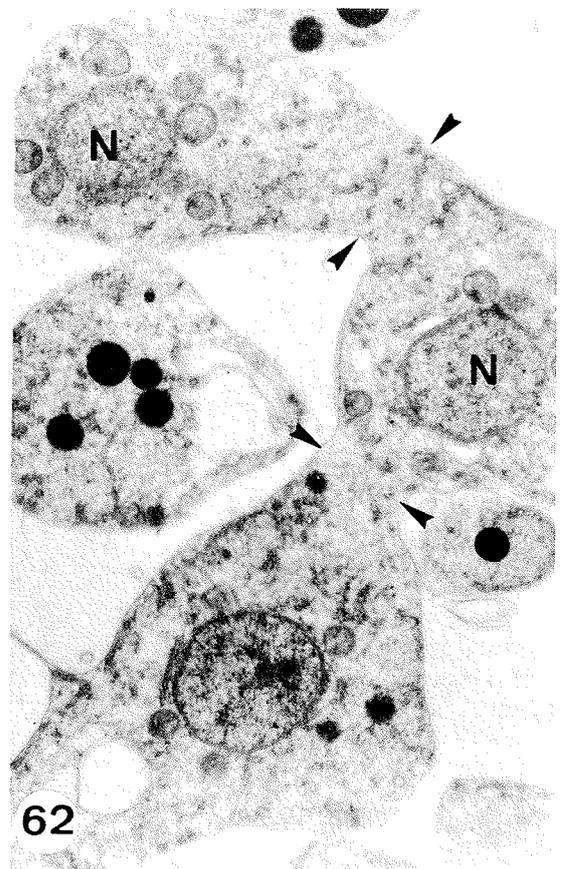
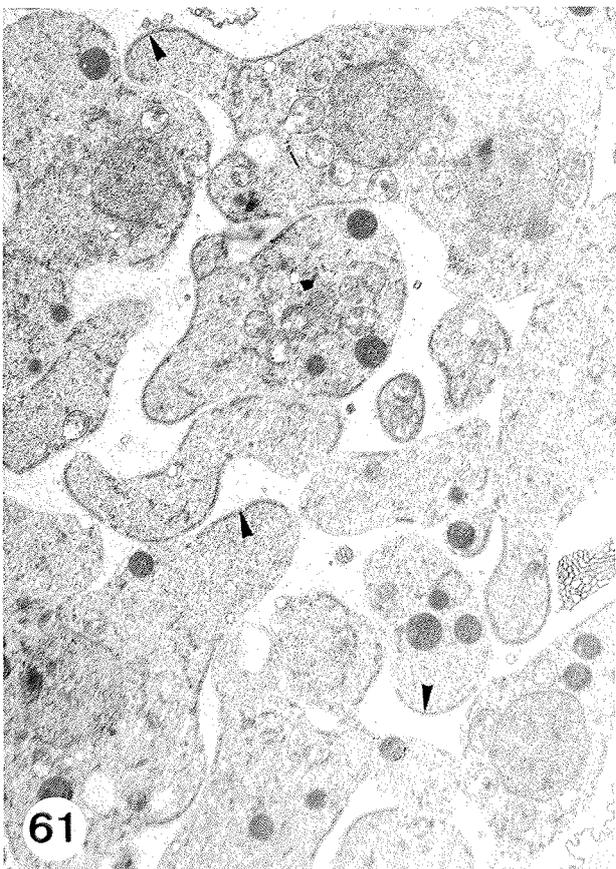
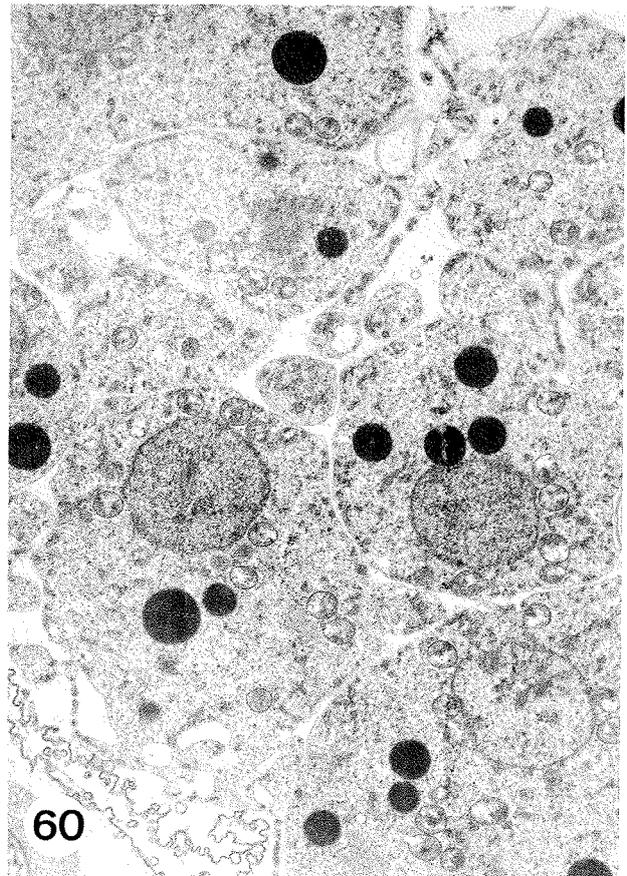
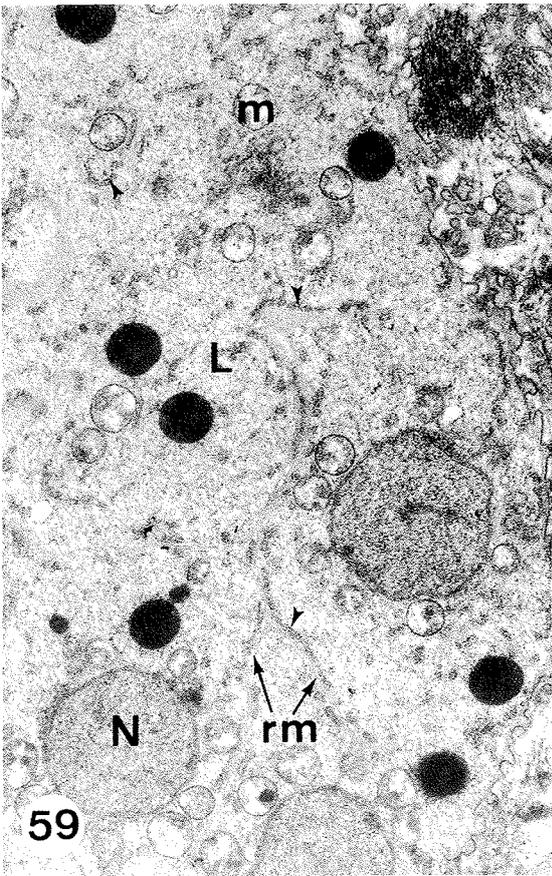


PLANCHE XX

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.
Ultrastructure des stades du cycle de développement.

- Fig. 63 - Sporoblastes uninucléés sphériques (S) et fragments de cytoplasme anucléés (fc) à l'intérieur d'un sporonte.
N : noyau.
microscopie électronique. X 4 000.
- Fig. 64 - Contact d'un sporoblaste (S), dans lequel est visible la sphérule (Se) à l'intérieur d'une grande vacuole et d'une masse cytoplasmique "englobante" (mc). La zone de contact entre les deux éléments présente un matériel fin (►).
microscopie électronique. X 18 500.
- Fig. 65 - Formation de l'extraporoplasme à la suite de l'englobage d'un sporoblaste (S) par une masse cytoplasmique anucléée (mc).
microscopie électronique. X 18 500.
- Fig. 66 - Spore jeune présentant dans l'extraporoplasme la zone de jonction (□) des deux lobes (◡) de celui-ci, après englobage du sporoblaste.
microscopie électronique. X 14 100.

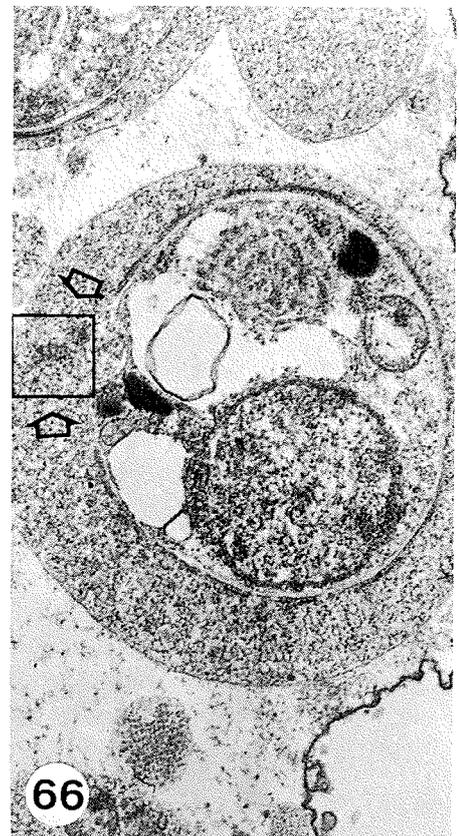
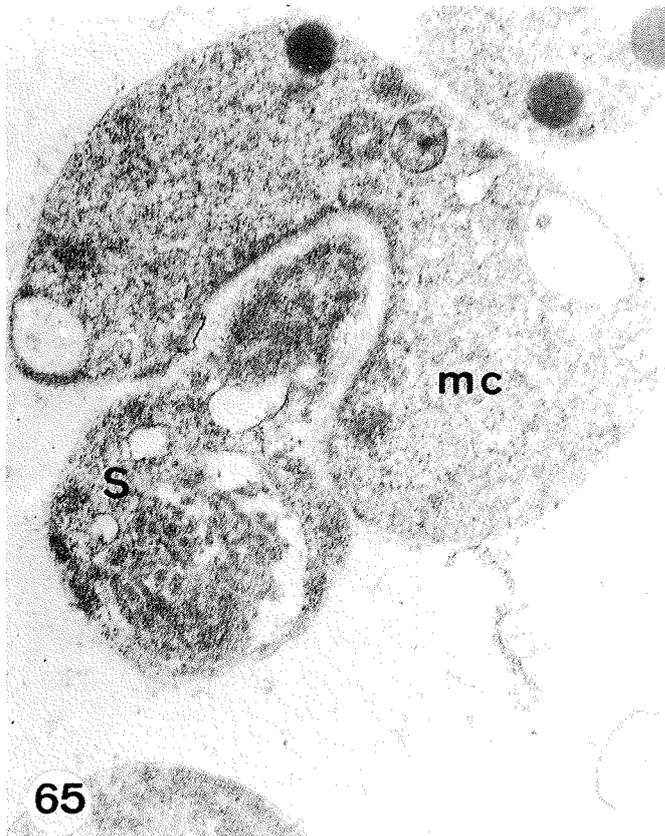
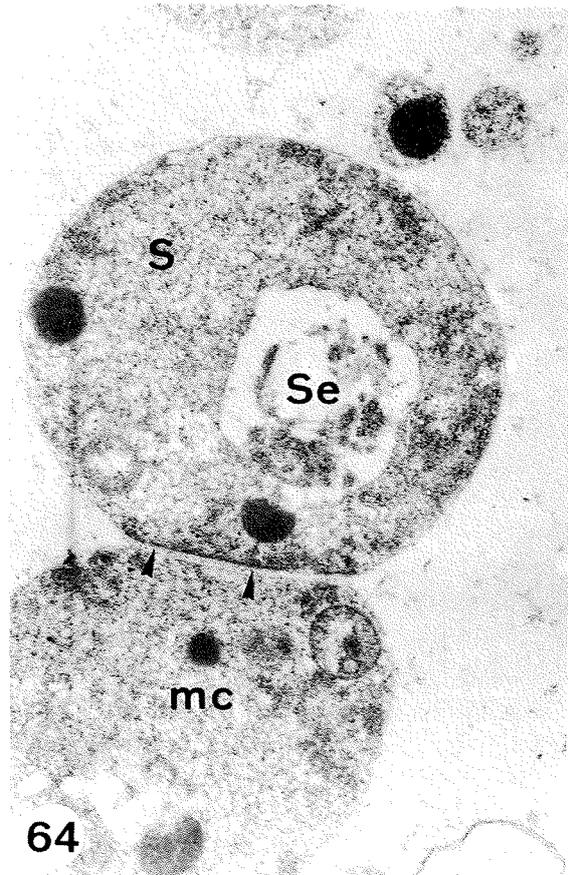
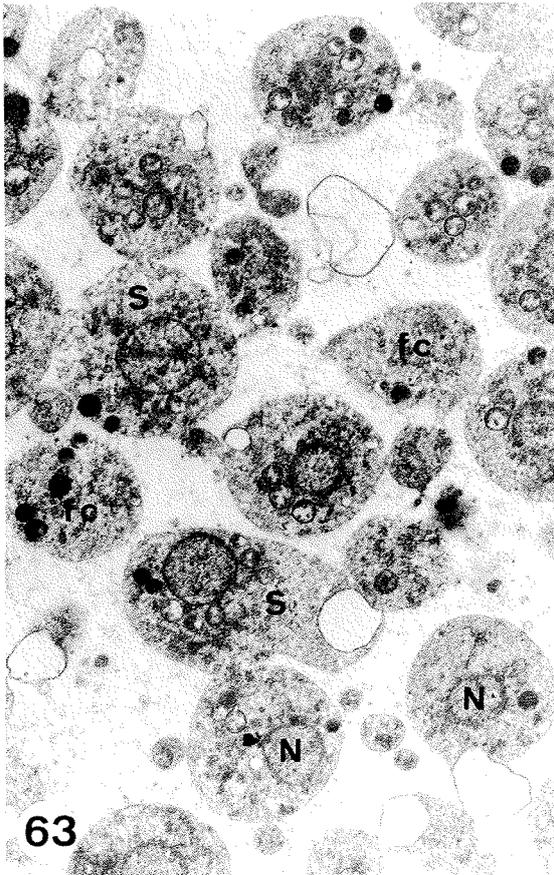


PLANCHE XXI

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Ultrastructure des stades du cycle de développement.

Fig. 67 - Cas particulier de formation des spores avant individualisation des sporoblastes. On distingue l'évagination de la paroi sporale (►) dans l'extrasporoplasme (ex) précédant la formation de l'opercule. Le cytoplasme du sporocyste se fragmente (▲) après que les spores (Sp) soient formées.

microscopie électronique. X 28 600.

Fig. 68 - Coupe montrant la formation complète de la spore, avec en particulier son opercule (O) et sa sphérule (Se), dans laquelle on distingue les granules sécréteurs (gs), avant fragmentation du cytoplasme des sporocystes.

microscopie électronique. X 28 600.

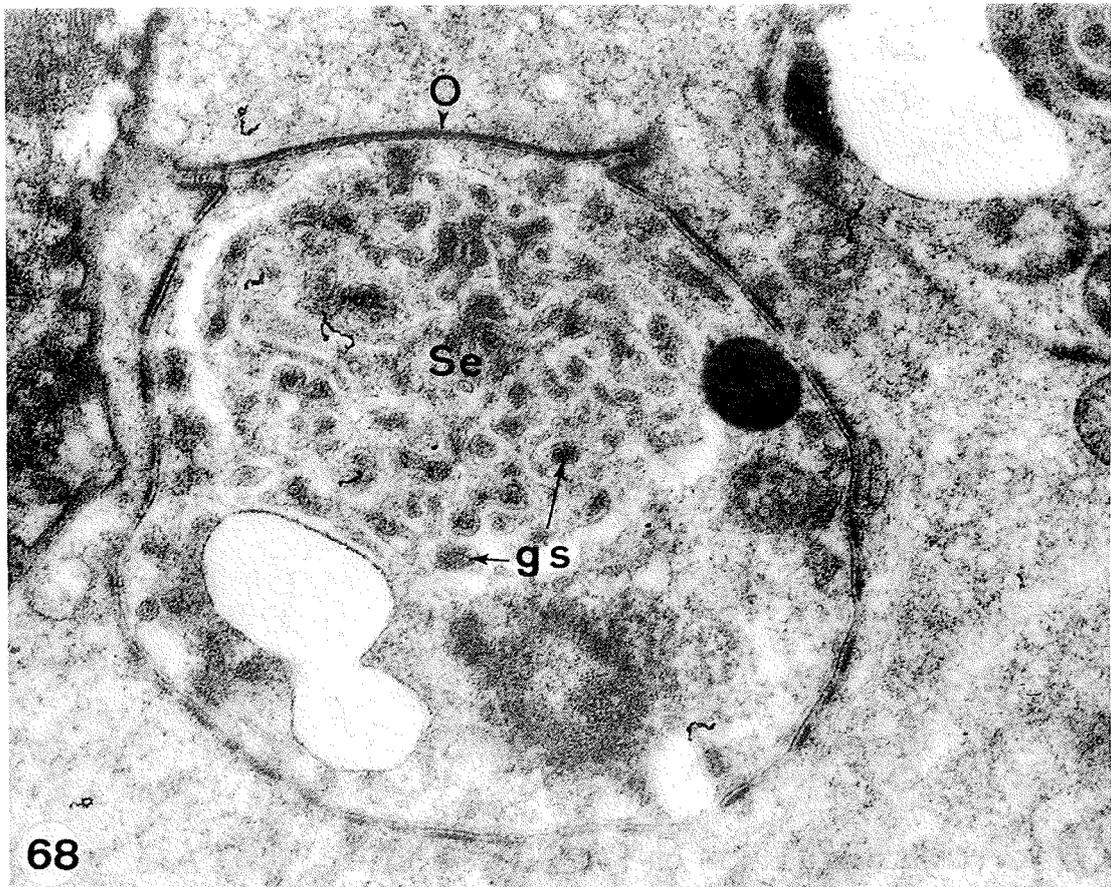
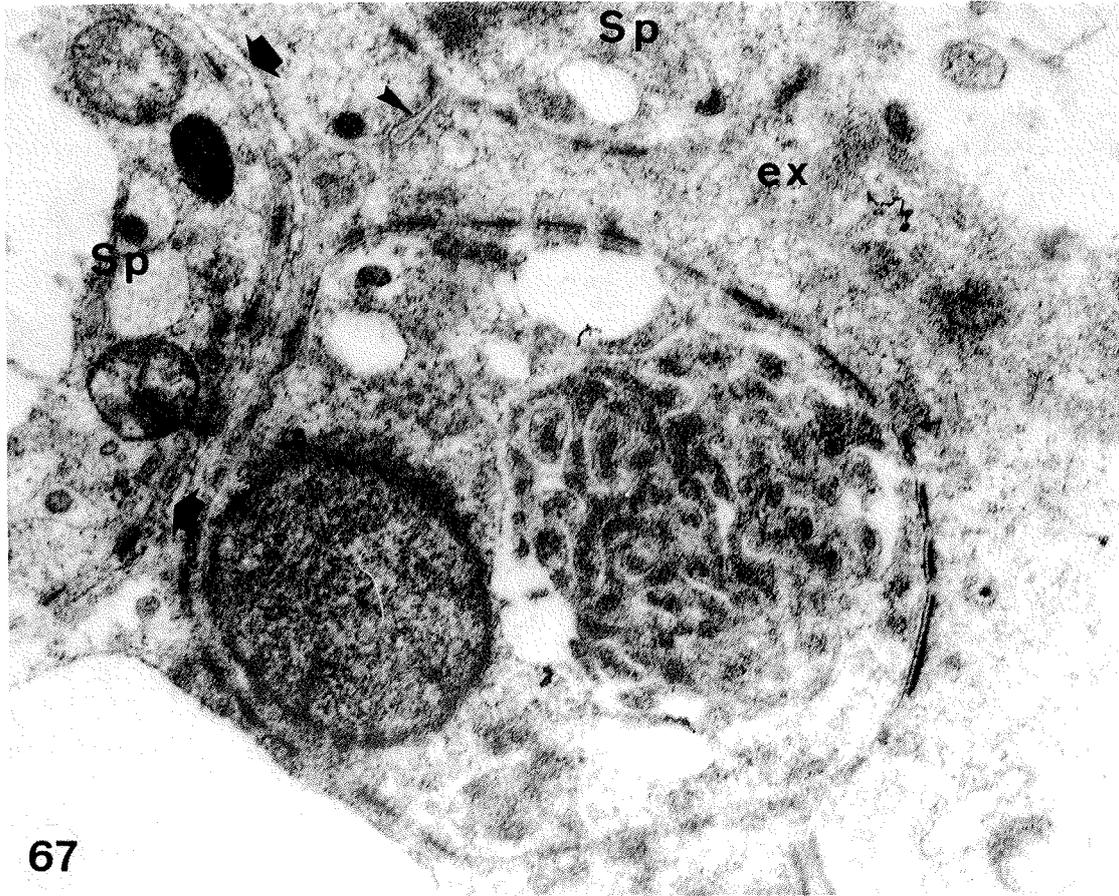


PLANCHE XXII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Ultrastructure de la spore.

Fig. 69 - Coupe d'une spore jeune montrant l'organisation de la sphérule et de la paroi sporale. La sphérule est constituée d'un réseau de deux membranes parallèles (►) et comporte de nombreux granules sécréteurs (gs). A la sphérule sont associés des corps sécréteurs (cs). La paroi (P) est formée d'une couche interne (ci), d'une couche moyenne (cm) et d'une couche externe (ce). Enfin dans le sporoplasme de la spore sont visibles des vésicules (v).
ex : extrasporoplasme - L : gouttelette lipidique - m : mitochondrie -
N : noyau.
microscopie électronique. X 45 300.

Fig. 70 et 71 - Coupes montrant la forme allongée des corps sécréteurs (cs) issus de la sphérule. Les terminaisons en massue sont fréquemment localisées entre la paroi et le cytoplasme de la spore.
microscopie électronique. Fig. 70 : X 13 500 ; Fig. 71 : X 17 400.

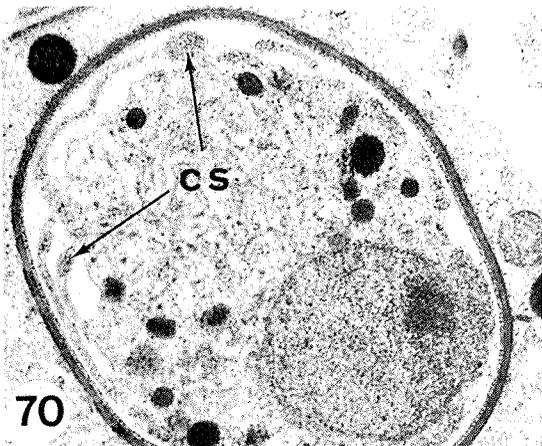
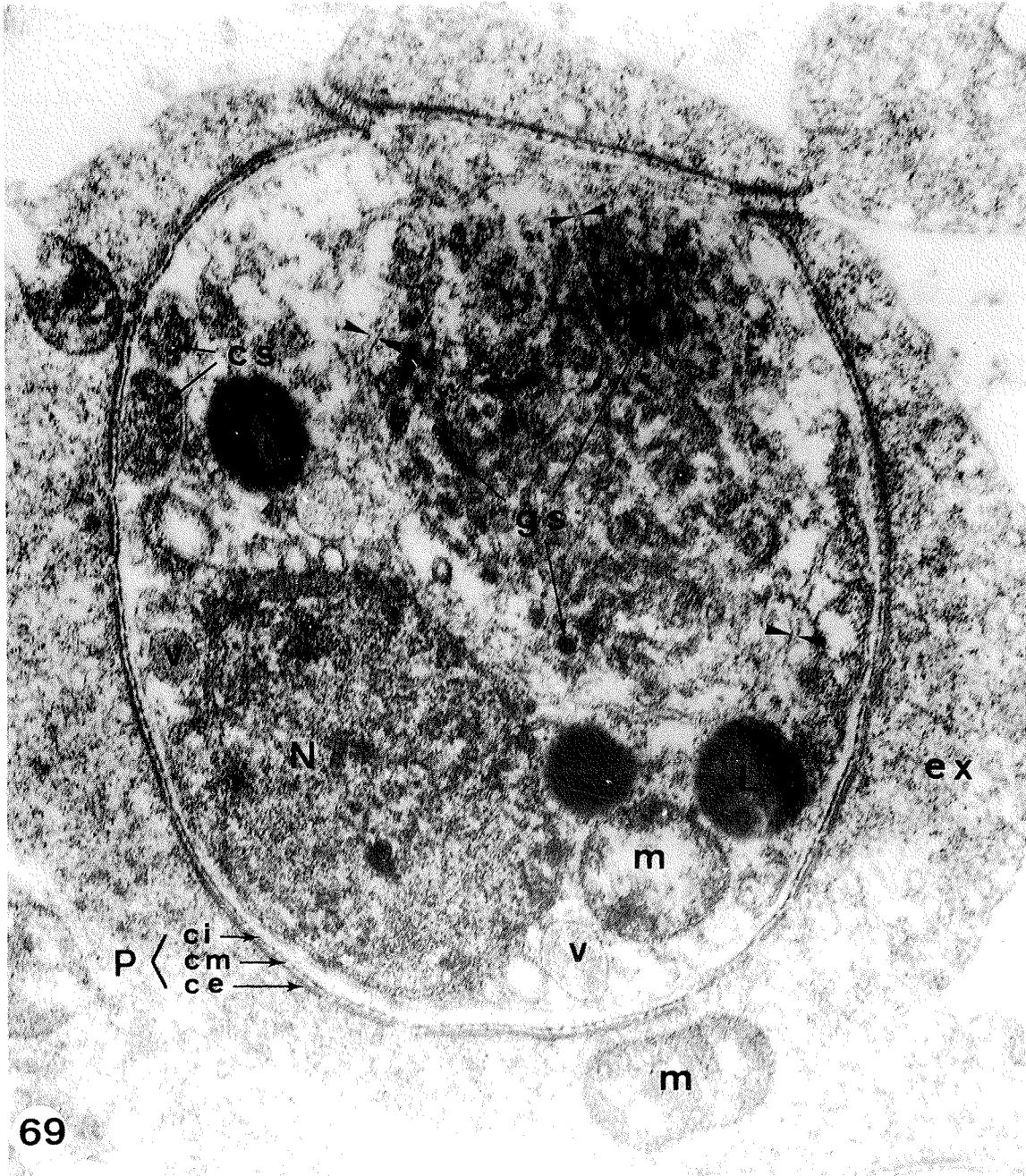


PLANCHE XXIII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Ultrastructure de la spore.

Fig. 72 - Constitution générale et principaux organites de la spore mûre d'Haplosporidium armoricanum.

bl : bord libre de l'opercule - c : clapet - cd : corps denses
ex : extrasporoplasme - F : filament - h : haplosporosome
m : mitochondrie - N : noyau - n : nucléole - O : opercule
rp : repli de la paroi sporale - S : sphérule.
microscopie électronique. X 38 700.

Fig. 73 - Détail de la partie antérieure de la spore. L'opercule (O) forme clapet sur un orifice (or) de la paroi sporale (P). Le bord libre (bl) de l'opercule est en liaison avec le repli (rp) de la paroi (P) par l'intermédiaire de filaments d'interconnection (fi).
microscopie électronique. X 45 200.

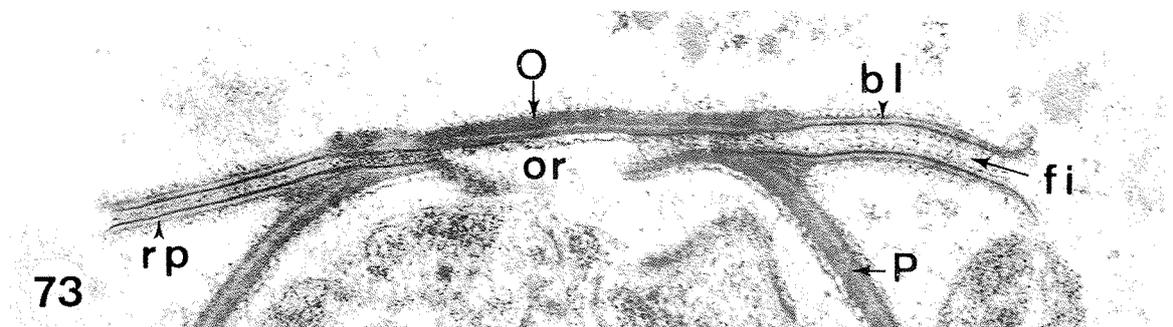
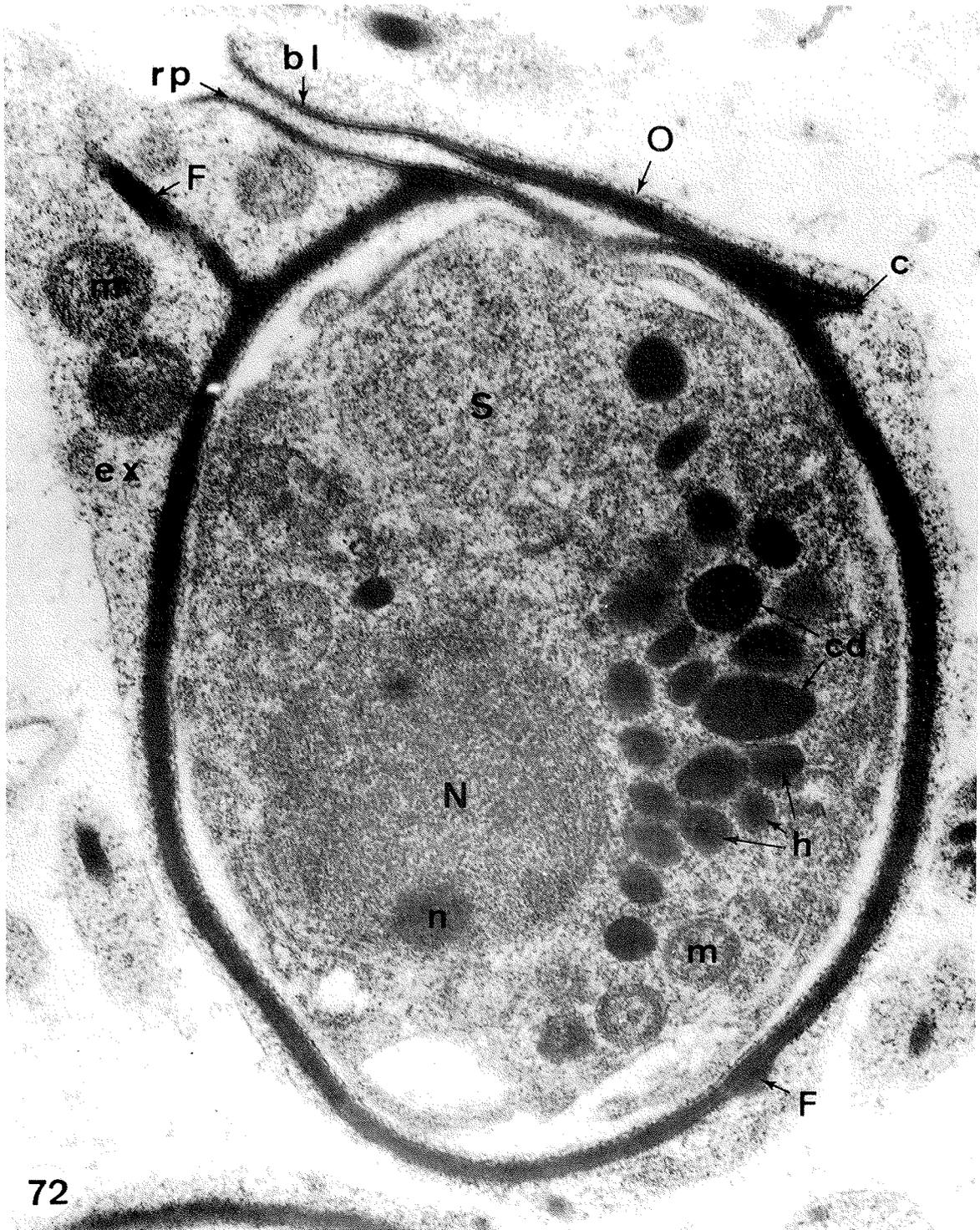


PLANCHE XXIV

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Ultrastructure de la spore.

Fig. 74 - Détail de la couche externe (ce) de la paroi sporale et de l'insertion du filament (F) sur celle-ci.

ci : couche interne.

microscopie électronique. X 43 400.

Fig. 75 - Vue du filament qui semble être formé d'un axe central tubulaire (▶).

microscopie électronique. X 38 000.

Fig. 76 - Vésicules observées dans le sporoplasme.

N : noyau.

microscopie électronique. X 38 400.

Fig. 77 - Coupe montrant l'ultrastructure des haplosporosomes (h) et des corps denses (cd). Les haplosporosomes sont constitués d'un cortex (co) interne et d'une médulla (ma) externe, séparés par un espace clair. Haplosporosomes et corps denses sont entourés d'un fin feuillet dense (▶) difficilement discernable.

microscopie électronique. X 50 000.

Fig. 78 - Vue générale des spores à l'intérieur d'un sporocyste. Les filaments (f) forment de nombreux replis dans les prolongements cytoplasmiques (pc) en forme de queues de l'extraplasme.

microscopie électronique. X 11 200.

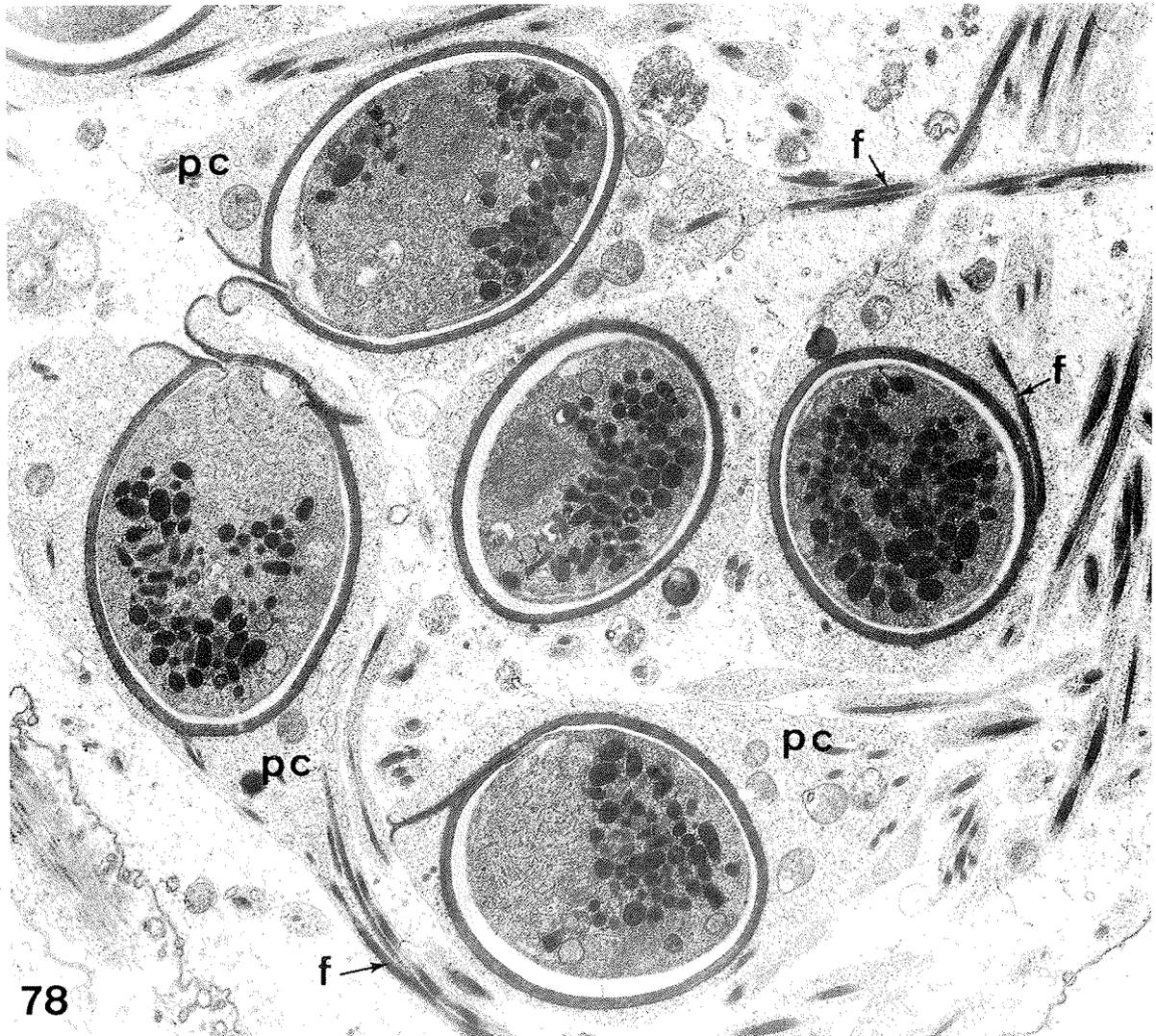
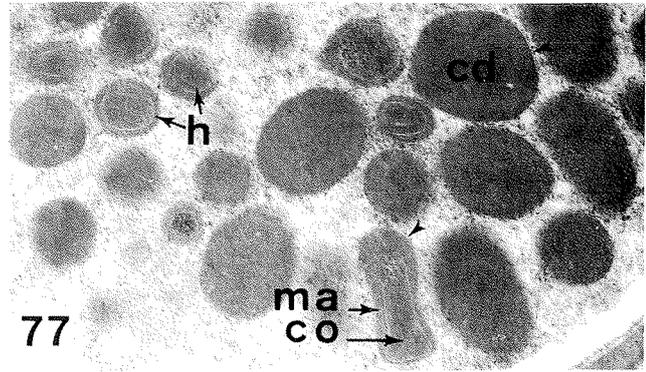
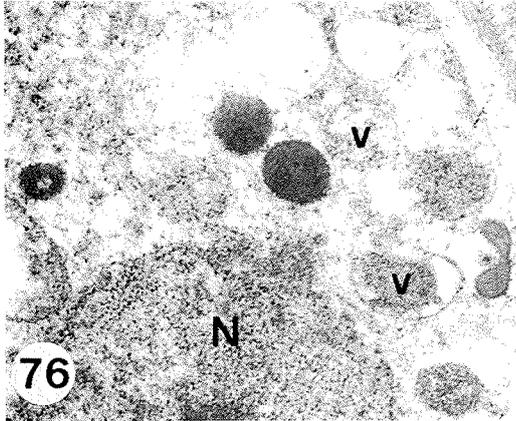
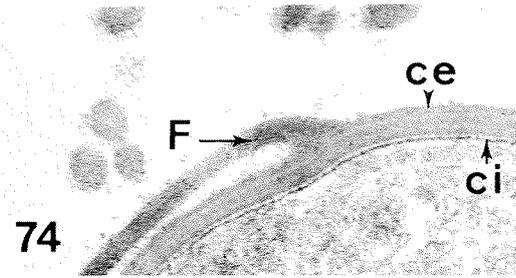


PLANCHE XXV

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.
Aspects particuliers du cycle de développement.

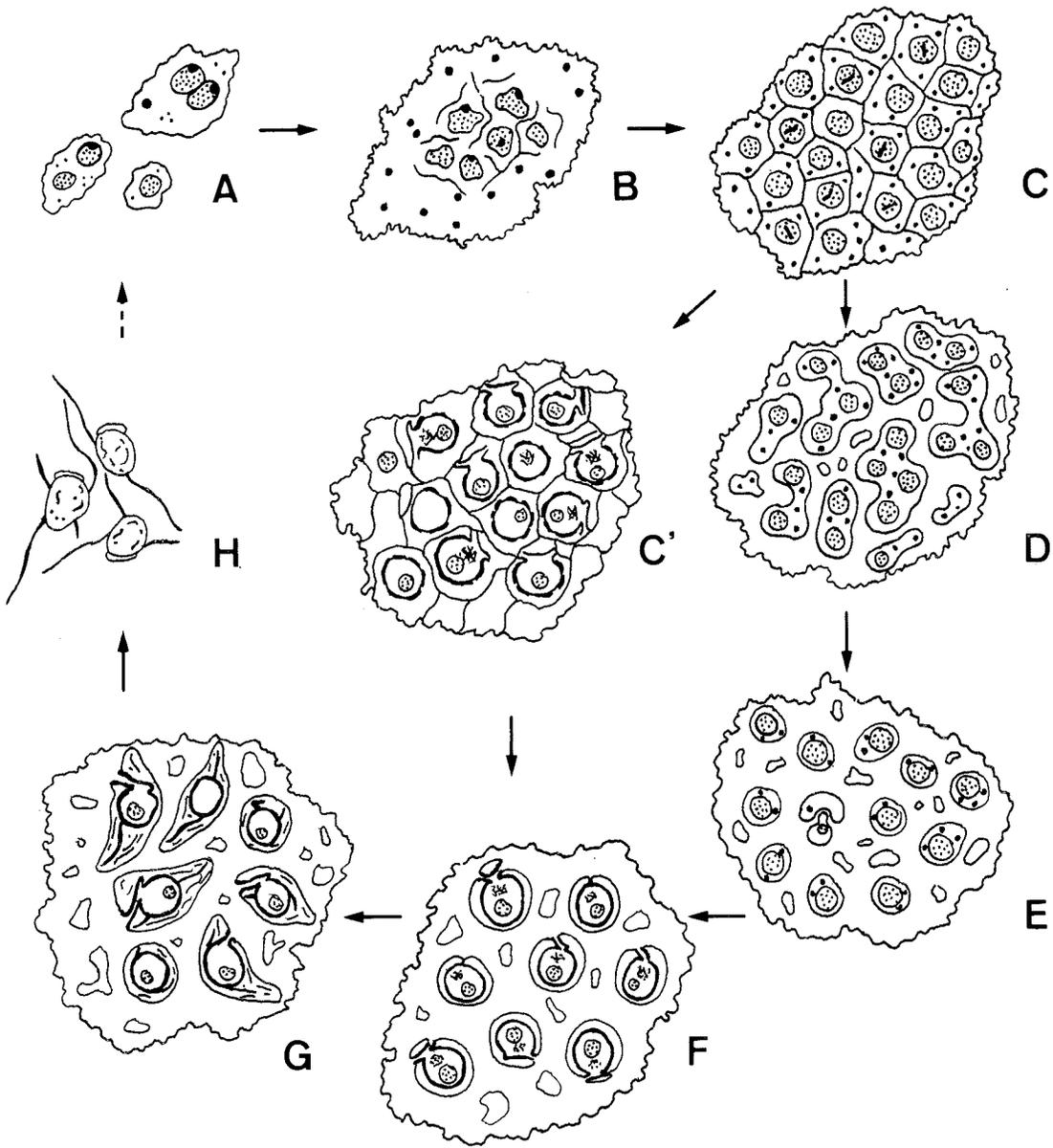
Fig. 79 - Représentation schématique du cycle de développement présumé d'H.armoricanum.

Dans les premiers stades du cycle, les grands plasmodes (B) résultant de l'évolution des petits plasmodes (A), se transforment en "sporontes précoces" (C). A partir de ces éléments deux processus de formation des spores peuvent se présenter. Dans l'un des processus, les sporontes précoces, après passage par un stade syncitial (D), évoluent en sporontes contenant les sporoblastes (E) à partir desquels les spores sont issues. Dans l'autre les spores sont formées directement dans le cytoplasme des sporontes précoces (C').

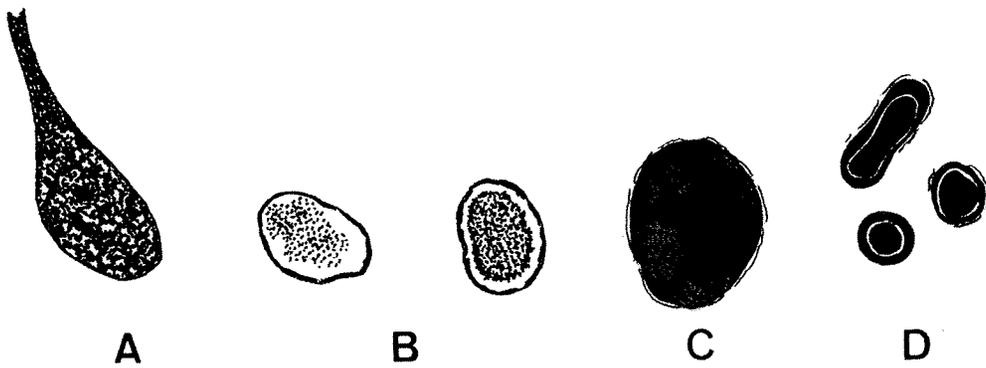
L'évolution des spores jeunes contenues dans les sporocystes (F) est marquée par l'apparition de deux étirements du sporoplasme en forme de queues et de filaments sporaux chez les spores mûres (G). Après rupture des sporocystes les spores sont libérées dans les tissus de l'huître ou dans le milieu (H).

Fig. 80 - Schéma de la formation des haplosporosomes dans la spore.

A : corps sécréteur - B : vésicules - C : corps dense ou "membrane-bound inclusion" - D : haplosporosomes.



79



80

PLANCHE XXVI

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.
Effets histopathogènes.

Fig. 81 - Dans le manteau, les formes plasmodiales du parasite (→) provoquent la destruction du conjonctif de la partie distale de l'organe (*).
microscopie photonique. X 150.

Fig. 82 - Fragment du manteau de l'huître, infesté par les plasmodes d'Haplosporidium armoricanum (▶).
microscopie photonique. X 160.

Fig. 83 à 85 - Au premier degré de l'action pathogène du parasite consécutive à la présence des formes plasmodiales dans la glande digestive de l'huître, la dégradation du conjonctif s'observe essentiellement à proximité immédiate des diverticules digestifs (Fig. 83), de l'intestin (Fig. 84) et de l'estomac (Fig. 85). La destruction des cellules de Leydig aménage alors de grandes lacunes (★) autour des épithéliums.
microscopie photonique. X 160.

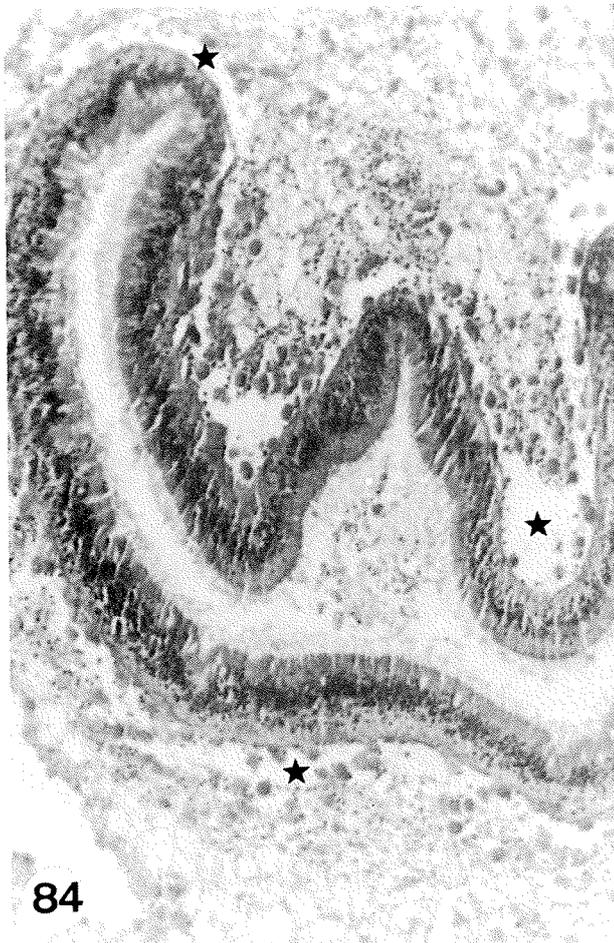
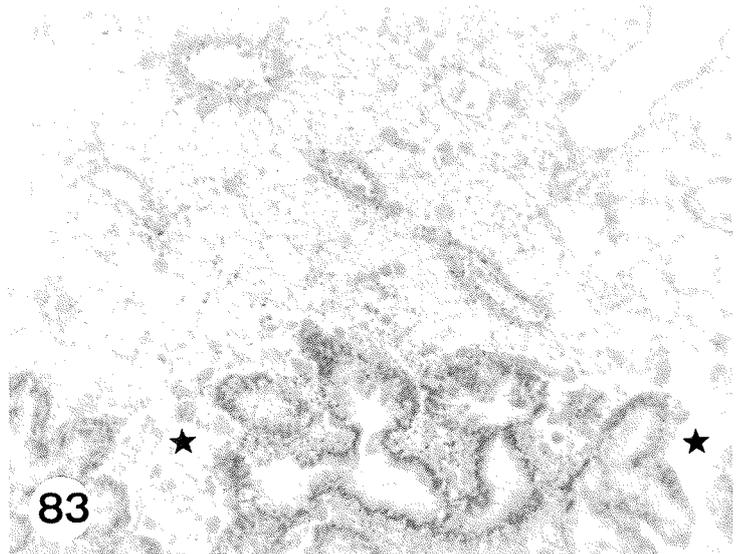
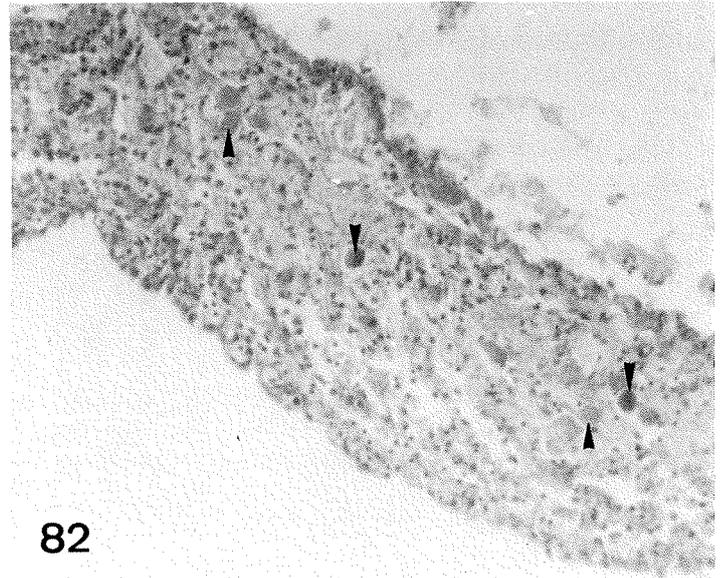
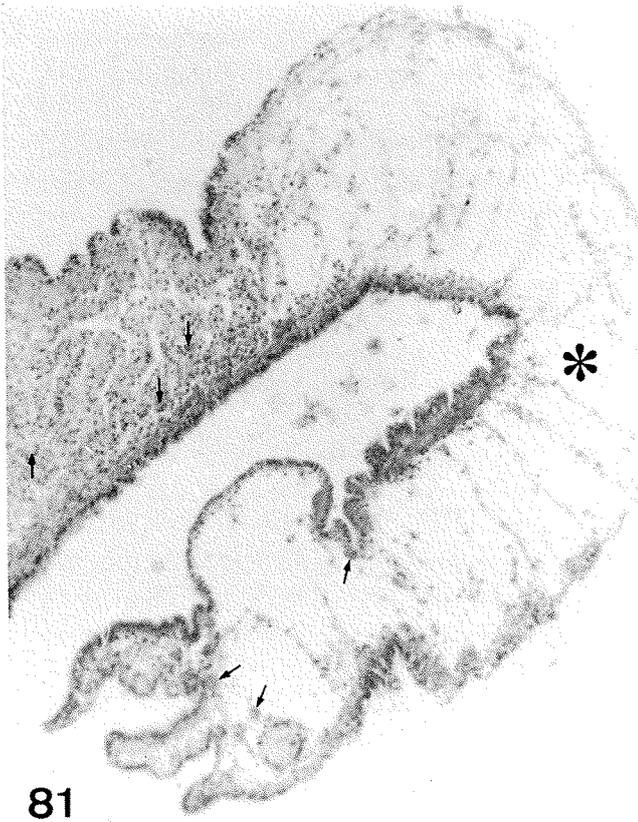


PLANCHE XXVII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

Effets histopathogènes.

Fig. 86 - Coupe montrant une "barrière" d'hémocytes et de fibrocytes (🏠) formée autour du canal principal d'un diverticule digestif. microscopie photonique. X 40.

Fig. 87 - Au second degré de l'action pathogène d'H.armoricanum s'observe une réaction de l'hôte, marquée par le développement de collagène autour des plasmodes (▶) et dans le conjonctif de la glande digestive. microscopie photonique. X 1 200.

Fig. 88 - Plasmodes nidés à la base d'un diverticule digestif. Les cellules épithéliales sont repoussées par les formes parasitaires, autour desquelles s'accumule du collagène (▶).
DD : diverticule digestif - P : plasmodes.
microscopie photonique. X 1 200.

Fig. 89 - Vue du conjonctif de la glande digestive complètement envahi par les stades évolués du parasite. microscopie photonique. X 540.

PLANCHE XXVII

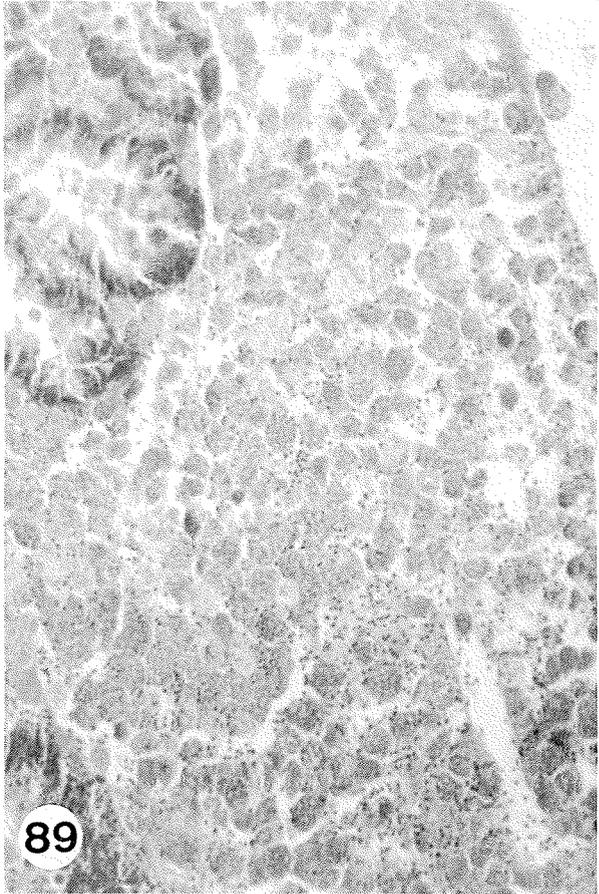
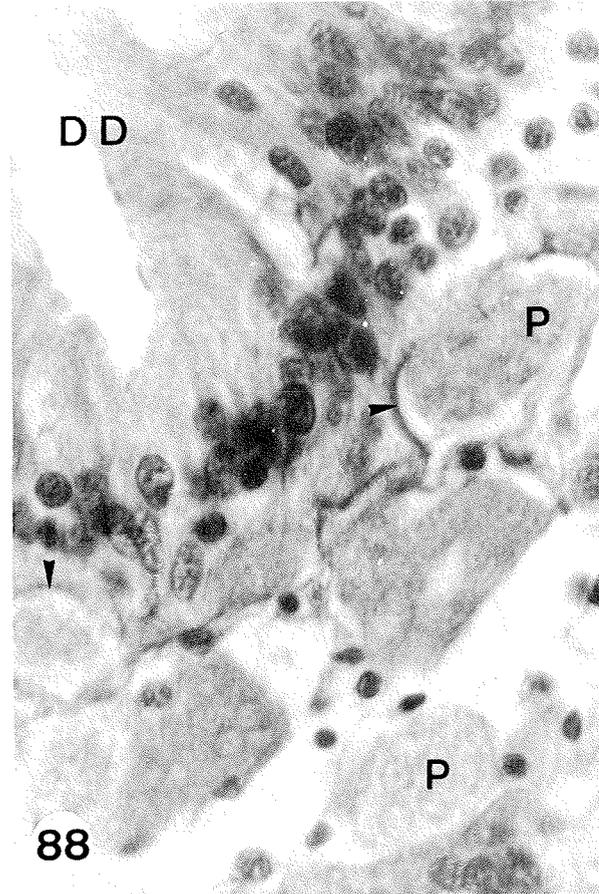
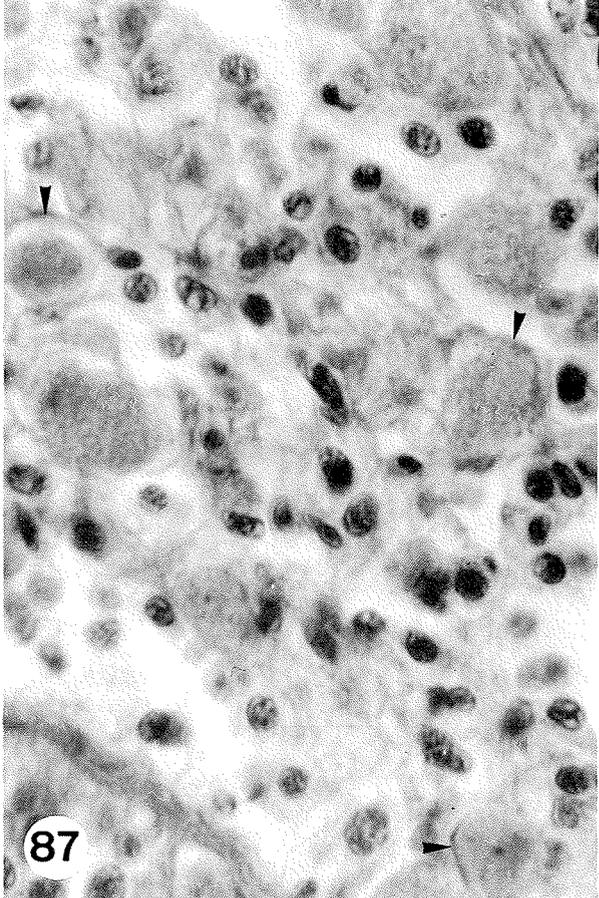


PLANCHE XXVIII

Recherches sur Haplosporidium armoricanum.

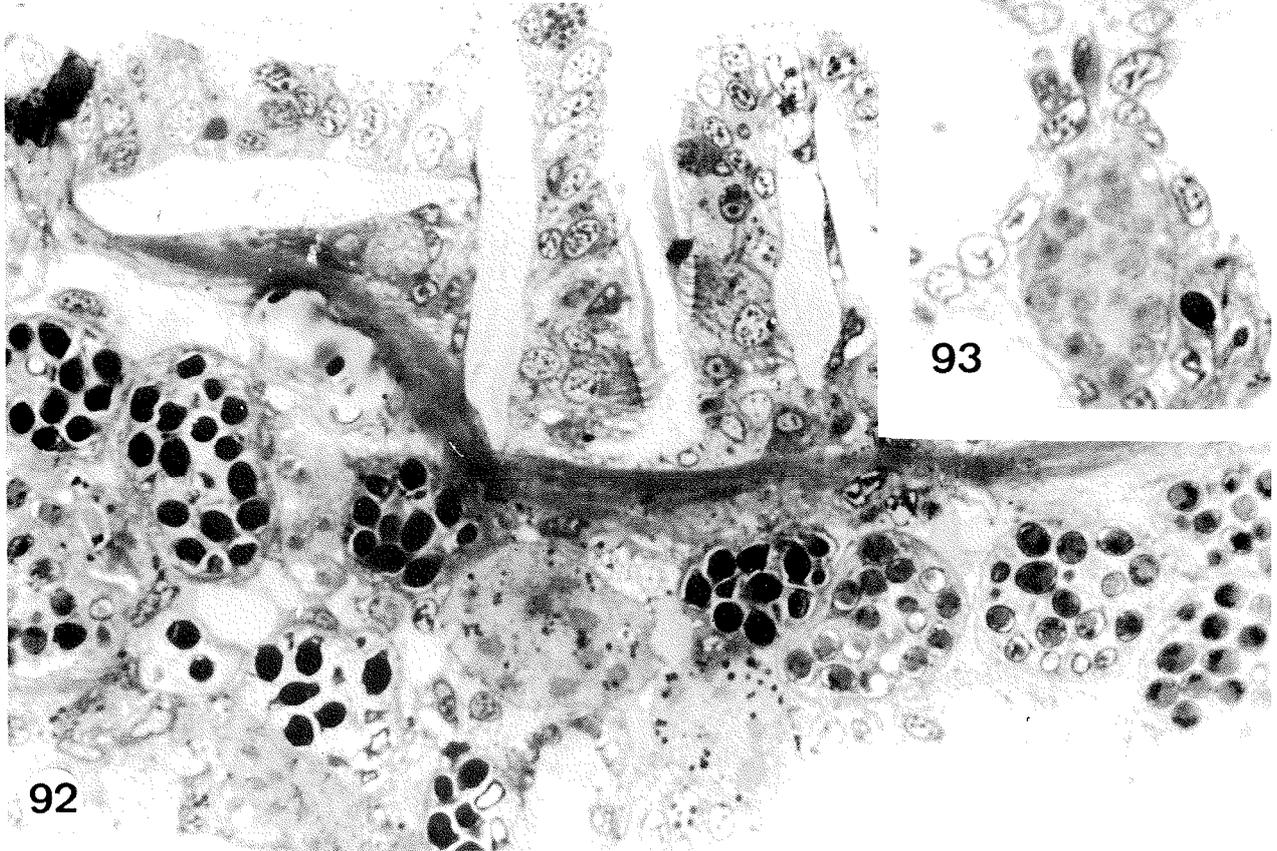
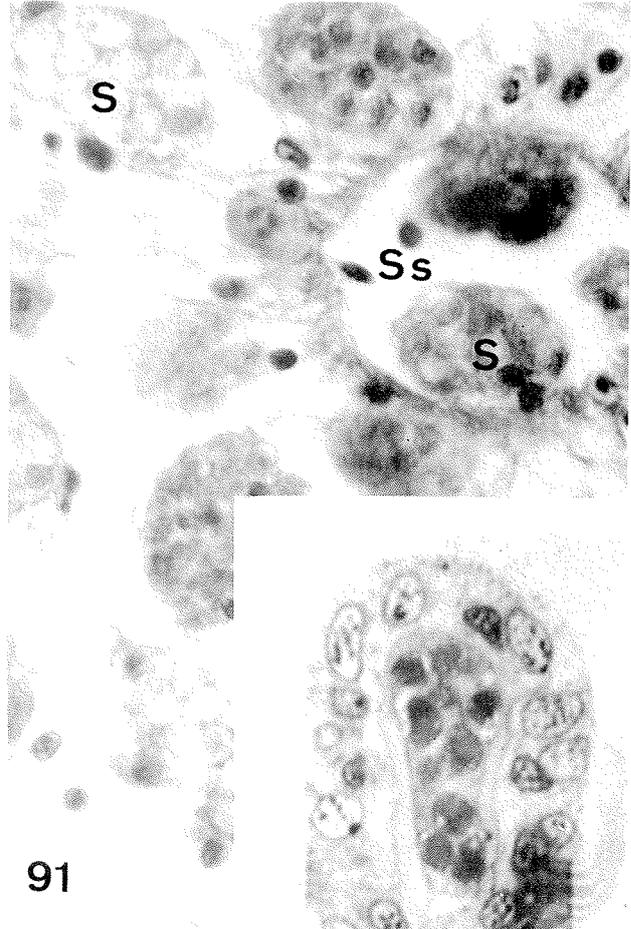
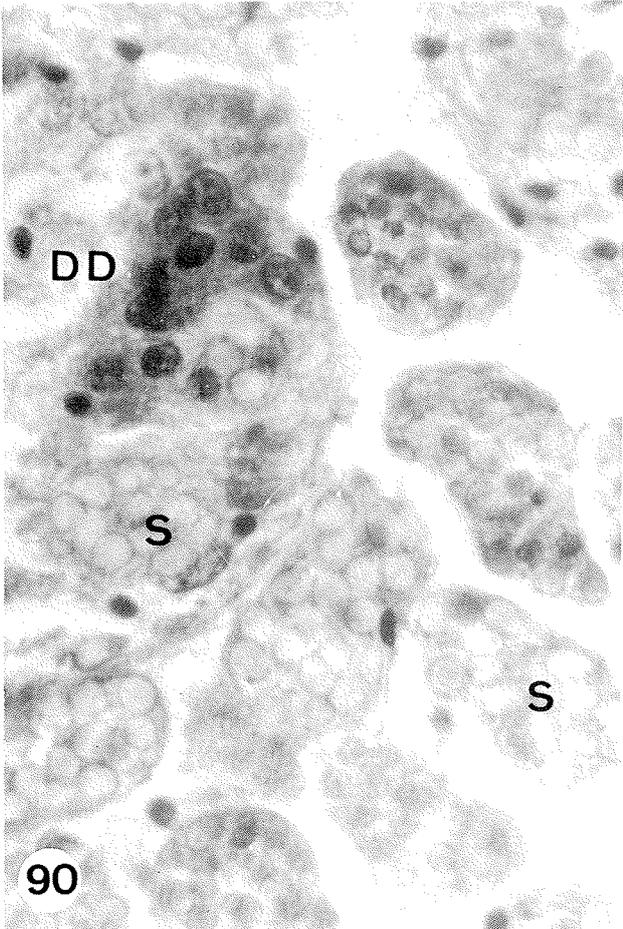
Effets histopathogènes.

Fig. 90 et 91 - Coupes montrant l'infiltration des sporocystes d'H.armoricanum dans l'épithélium d'un diverticule - Fig. 90 - et leur présence dans les sinus sanguins - Fig. 91 - ou ils forment des pseudo-embolies. Simultanément à la présence des formes évoluées du parasite le conjonctif est fortement dégradé.

S : sporocystes - DD : diverticule digestif - Ss : sinus sanguin.
microscopie photonique. X 1 500.

Fig. 92 et 93 - Dans les branchies, les formes évoluées du parasite envahissent le conjonctif des jonctions interfilamentaires - Fig. 92 - et les filaments - Fig. 93 - .

coupe semi-fine. Fig. 92 : X 1 100 ; Fig. 93 : X 1 200.



1984

PICHOT Yves

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC (MONTPELLIER II)

RESUME :

On étudie les parasitoses à *Marteilia refringens* et à *Haplosporidium armoricanum* de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*.

L'étude de *M. refringens* précise certains aspects de la biologie de l'agent infectieux. Elle montre que les modalités du cycle de développement du parasite et l'ultrastructure des stades les plus évolués de la sporogénèse peuvent être modifiées selon les conditions hydrobiologiques du milieu dans lequel est cultivé l'hôte. Elle établit que l'action du parasite conduit à la destruction des épithéliums digestifs de l'huître et s'exerce en interférant avec le métabolisme protéique de *O. edulis*. Elle précise l'ultrastructure des cellules impliquées dans des proliférations hémocytaires atypiques associées à la parasitose et établit la nature néoplasique du phénomène. L'étiologie de l'hémocytose n'est toutefois pas déterminée. Enfin elle met en évidence un cas d'hyperparasitisme de *M. refringens* par une Microsporidie. L'étude ultrastructurale de la sporogénèse et des effets pathogènes du Protozoaire vis à vis de l'hôte nous conduit à identifier l'hyperparasite comme *Nosema ormieresi* et montre que certains stades de *M. refringens* peuvent être fortement altérés par l'infestation microsporidienne.

L'étude d'une Haplosporidie observée chez *O. edulis* du bassin d'Arcachon (France) nous amène à comparer la sporogénèse du parasite avec celle d'autres Haplosporidies d'invertébrés marins. Les caractéristiques de la spore nous incitent à inclure le parasite dans le genre *Haplosporidium* et le rapprochement du Protozoaire avec *Minchinia armoricana* conduit à l'identifier comme *Haplosporidium armoricanum*.

L'étude de la pathogénèse des infections à *M. refringens* et à *H. armoricanum* permet de préciser les relations entre les parasites étudiés et leur hôte commun l'huître plate et les interactions hôte-parasite-milieu pouvant intervenir dans le caractère des deux maladies.

MOTS-CLES :

Ostrea edulis, *Marteilia refringens*, *Nosema ormieresi*, *Haplosporidium armoricanum*, Parasite, Pathologie, Histologie, Ultrastructure, Biochimie, Expérimentation, Sporogénèse, Taxinomie, Hémocyte, Hyperplasie, Néoplasie, Hyperparasite, Hôte, Interactions, Epizootie, Réaction, Métabolisme protéique, Spécificité parasitaire, Relation phylogénique, Ségrégation écologique, Pathogénèse.