

RECHERCHES SUR *BONAMIA OSTREAE* GEN. N., SP. N., PARASITE NOUVEAU DE L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS* L.

par Yves PICHOT, Michel COMPS, Gilbert TIGÉ,
Henri GRIZEL et Marie-Agnès RABOUIN (1)

Des mortalités inhabituelles ont été observées au début de l'été 1979 sur certains parcs d'élevage d'huîtres plates de l'Île-Tudy en Bretagne. Un parasite encore inconnu sur les côtes françaises a été mis en évidence dans les cellules sanguines des huîtres atteintes (COMPS et Coll., 1980). Les formes les plus communes du parasite sont représentées par des cellules de 2 à 3 μ de diamètre caractérisées par un cytoplasme opaque comportant des particules denses structurées de 130 à 170 nm. La présence de ces cellules est associée à une dégradation du conjonctif et à des ulcérations au niveau des branchies accompagnées d'importantes réactions inflammatoires.

Des recherches systématiques ont permis ultérieurement de constater l'extension de la parasitose à différents secteurs ostréicoles de Bretagne, notamment Cancale, Saint-Brieuc, Paimpol et Morlaix, en rivière d'Étel, dans la région des abers ainsi que dans le golfe du Morbihan et au trait du Croizic (TIGÉ et Coll., 1980). Des huîtres parasitées ont été trouvées également en Normandie à Saint-Vaast-la-Hougue et dans la baie d'Arcachon.

Conjointement aux recherches réalisées pour établir la situation épidémiologique, des études ont été effectuées, principalement en microscopie électronique, pour préciser les caractéristiques du parasite et déterminer son cycle de développement.

Matériel et méthode.

Les huîtres examinées provenaient essentiellement de l'Île-Tudy, de Paimpol, de Cancale et de la baie d'Arcachon. Excepté le cas de celles qui présentaient des ulcérations sur les branchies, une recherche préalable des éléments infectés était réalisée en microscopie photonique.

Pour la microscopie électronique, les blocs étaient fixés une heure dans le glutaraldéhyde à 3 % et postfixés dans $0,0_4$ à 1 %. On a utilisé un tampon cacodylate 0,4 M pour préparer les fixateurs et la solution de rinçage. Les pièces étaient incluses dans l'araldite, les coupes colorées par l'acétate d'uranyle en solution aqueuse à 5 % et par le citrate de plomb.

Description du parasite.

1. Morphologie - Ultrastructure.

Suivant leur opacité aux électrons, qui correspond d'ailleurs à une basophilie plus ou moins marquée du cytoplasme, on peut distinguer deux groupes de « cellules parasites ».

(1) Y. PICHOT et M. COMPS : Laboratoire de Pathologie, I.S.T.P.M., 1, rue Jean Vilar, 34200 Sète (en collaboration avec le Laboratoire de Pathologie comparée, Université des Sciences, place E. Bataillon, 34200 Montpellier).
G. TIGÉ, H. GRIZEL et M.-A. RABOUIN : Centre de Recherches I.S.T.P.M., 56000 La Trinité-sur-Mer.

a) « *Les formes denses* » (fig. 1 à 3). Ces formes sont les plus fréquentes dans les tissus infectés. Elles correspondent à la « cellule type » du parasite initialement décrite (COMPS et Coll., 1980). Généralement arrondies, leur taille varie entre 2 et 3 μ . Elles présentent à l'intérieur de la membrane plasmique un cytoplasme dense, riche en grains d'aspect ribosomal. Le noyau, limité par deux membranes unitaires, est constitué de matériel granuleux opaque aux électrons. Ces cellules renferment par ailleurs des mitochondries dont le diamètre varie entre 0,5 et 1,8 μ ; à l'intérieur, les replis membranaires en forme de crêtes sont peu nombreux.

Elles comportent aussi, réparties à la périphérie, des particules denses structurées (PDS), de 130 à 170 nm pour un diamètre moyen de 130 nm : la partie centrale est limitée par un ensemble cortical formé d'une couche claire externe, d'une couche médiane opaque de 10 nm et d'une couche interne claire.

Enfin, suivant le plan de section, on observe un corps très dense, sans structure apparente, de 0,5 μ de diamètre environ.

b) « *Les formes claires* » (fig. 4 et 5). Le plus souvent parasphériques, ces formes amoeboïdes peuvent être également plus ou moins allongées, leur taille variant entre 2,5 et 4 μ , certaines pouvant atteindre 7 μ .

Ces cellules, peu basophiles, présentent par rapport aux formes denses certaines différences structurales.

Le noyau comporte un nucléoplasme formé de petits amas granuleux denses répartis dans un espace clair; il est doté d'un volumineux nucléole, finement granuleux, localisé en position pariétale.

Pour ce qui concerne les organelles cytoplasmiques, on trouve dans ces cellules des mitochondries caractérisées dans certains cas par la présence de replis membranaires internes (crêtes), plus nets et surtout plus nombreux que dans les mitochondries des formes denses.

On observe également dans le cytoplasme des particules à structure bipartite, identique à celle des PDS décrites ci-dessus; leur forme cependant est assez variable: la plupart sont parasphériques, d'autres sont allongées et certaines enfin ont un aspect plutôt cunéiforme; les dimensions moyennes se situent entre 120 et 140 nm pour le diamètre et entre 180 et 200 nm pour la longueur.

Un troisième type d'organelle est représenté par des formations membranaires refermées en saccules isolés ou empilés par 2 ou 3, parfois même par 4 (fig. 5 et 13). Morphologiquement assimilables à un appareil de Golgi, elles peuvent être associées à des vésicules de 50 à 90 nm qui proviendraient du bourgeonnement latéral des saccules (fig. 12).

Certains saccules ont un profil circulaire et constituent des vésicules de 100 à 150 nm, à l'intérieur desquelles on peut noter l'accumulation de matériel dense aux électrons. Ce phénomène paraît se produire également au niveau de saccules droits, le dépôt de matériel dense s'opérant à l'intérieur de la cavité limitée par les membranes (fig. 13). Dans les deux cas, ce processus assurerait la morphogénèse des PDS d'une façon analogue à la formation des haplosporosomes chez certaines Haplosporidies (PERKINS, 1979).

Enfin, on note l'existence de corps cytoplasmiques sphéroïdes de 0,5 à 0,8 μ de diamètre d'aspect amorphe, denses aux électrons; ils ne semblent comporter aucune sous-structure décelable (fig. 4 et 11).

2. Multiplication du parasite - Cycle.

L'étude en microscopie électronique a permis d'observer à l'intérieur de la cellule hôte différents stades de division cellulaire correspondant à un mode de multiplication du parasite (fig. 6 à 9).

Au début de la division, le noyau est plus ou moins ovoïde; son nucléole, constitué de grains denses aux électrons est accolé à la membrane nucléaire. Dans le nucléoplasme, des microtubules de 20 nm de diamètre s'étendent, dans la partie médiane du noyau, en faisceau, à partir d'un corps polaire dense. Ces formations intranucléaires peuvent être rapprochées des microtubules et des S.P.B. (spindle pole body) décrits par PERKINS (1975 a) dans les noyaux en cours de mitose de *Minchinia nelsoni*.

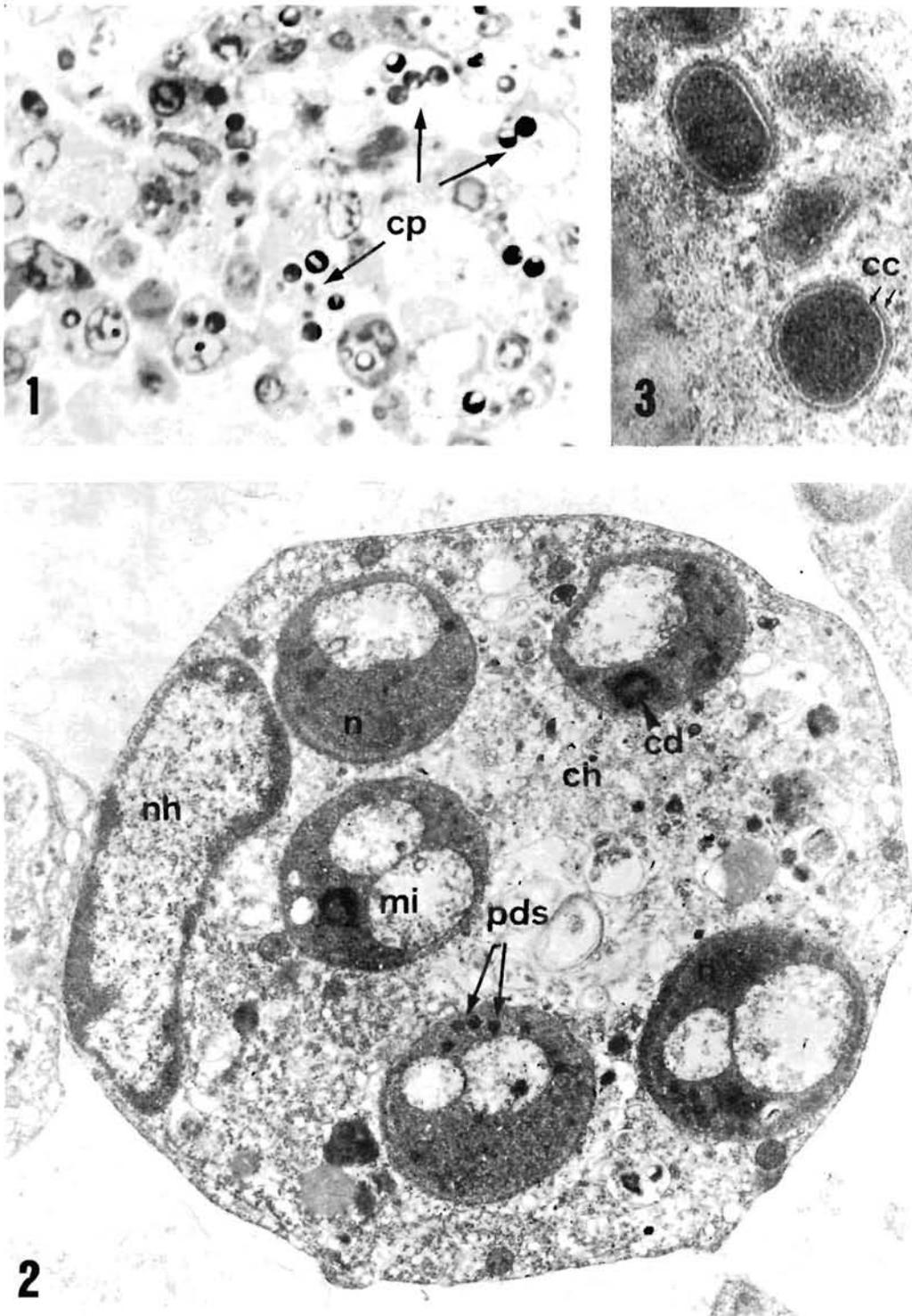


FIG. 1. — Aspect du conjonctif à un stade avancé de l'infection avec de nombreuses cellules parasitées (cp); coupe semi-fine, G \times 910. FIG. 2. — Cellule infectée renfermant des « formes denses » du parasite: noyau de la cellule hôte (nh), noyau du parasite (n), mitochondrie (mi), particule dense structurée (pds), corps dense (cd); microscopie électronique, G \times 12 400. FIG. 3. — Particules denses structurées; microscopie électronique, G \times 118 000.

D'autres stades montrent un noyau très allongé avec un corps polaire repoussé contre la membrane nucléaire ; des microtubules sont encore visibles à son voisinage.

A un stade plus avancé de la mitose, le noyau fortement étiré dans sa partie médiane possède latéralement deux corps opaques correspondant vraisemblablement à des nucléoles.

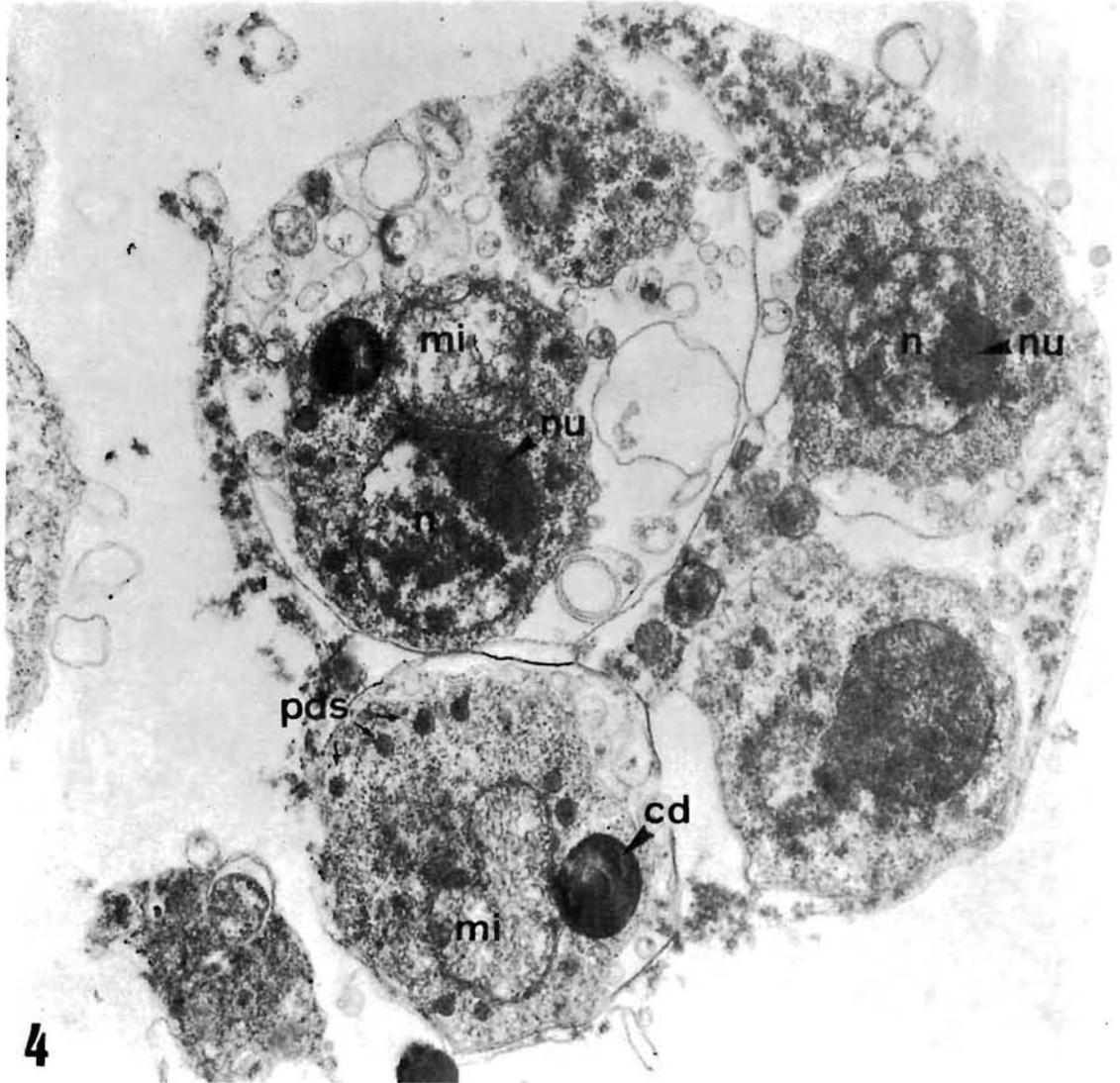


FIG. 4. — Cellule infectée par des « formes claires » du parasite : noyau (n), nucléole (nu), mitochondrie (mi), particules denses structurées (pds), corps dense (cd) ; microscopie électronique, G \times 16 000.

Les phases ultérieures sont marquées par la division cytoplasmique conduisant à la formation de deux cellules filles. Certaines images suggéreraient que cette division pourrait être assurée par la production d'une membrane plasmique interne qui formerait une cloison.

Les structures du type appareil de Golgi et les différentes formations vésiculaires sont fréquentes dans le cytoplasme des cellules en cours de division.

A côté de ces différentes figures de division, il n'est pas rare de rencontrer dans les cellules infectées des formes plasmodiales à deux noyaux (fig. 10 et 11). La taille de ces plasmodes est comparable à celle des « cellules claires » (3 à 4 μ). Le plus souvent, les noyaux de forme arrondie

sont nettement séparés dans le cytoplasme. Ils peuvent aussi être accolés avec une zone de contact aplatie comme cela existe dans les jeunes plasmodes binucléés de *Minchinia sp.*, parasite de *Panopeus herbstii* (PERKINS, 1975 b) (fig. 11).

L'observation de ces différentes phases de division suggère donc la possibilité pour le cycle du parasite de comporter une phase de multiplication de type schizogonique, par divisions binaires simples qui se dérouleraient à l'intérieur des cellules hôtes de l'huître.

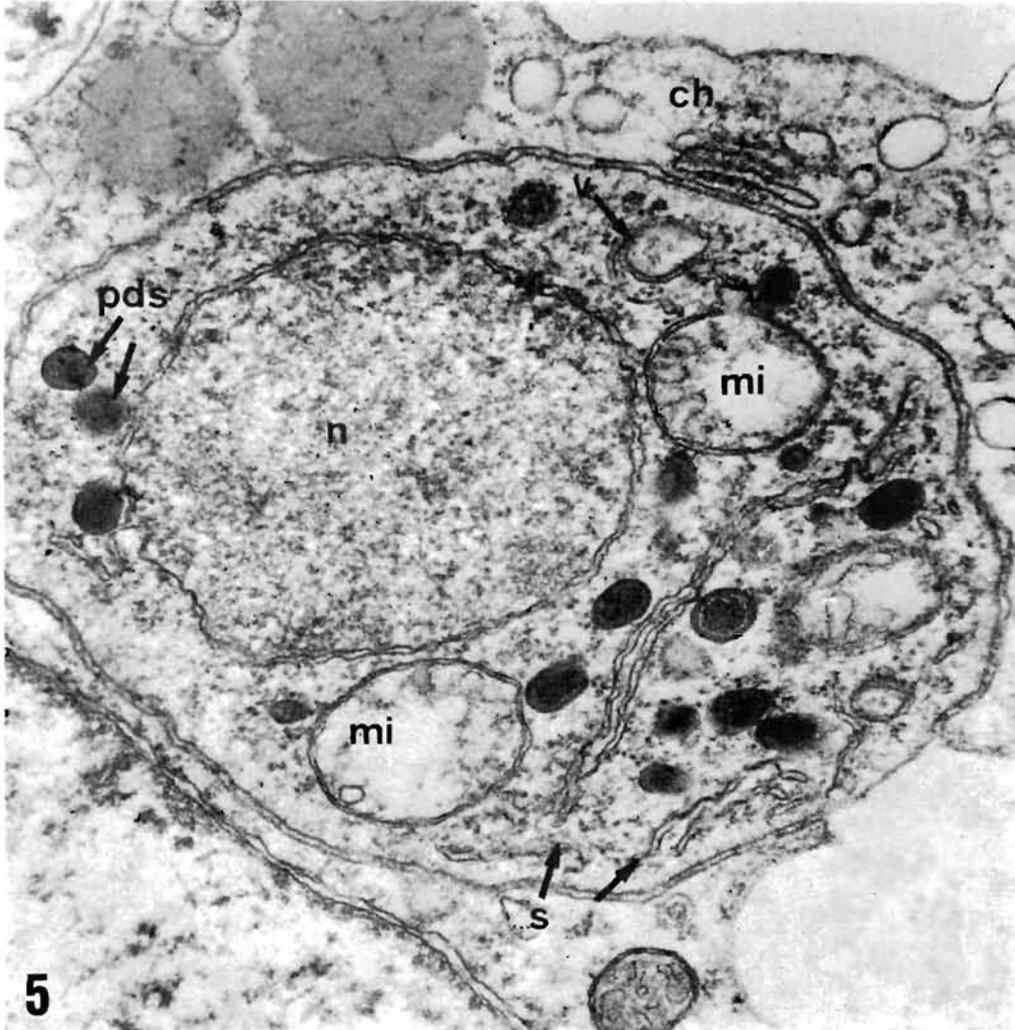


FIG. 5. — Détail d'une « forme claire » : noyau (n), mitochondrie (mi), particules denses structurées (pds), vésicules (v), saccules (s), cellule hôte (ch) ; microscopie électronique, G × 47 200.

Dans le cycle de développement chez l'huître, les « formes claires » représenteraient les formes végétatives et les « formes denses », les formes de résistance. Ces dernières, qu'on trouve parfois libres au sein des tissus altérés, pourraient assurer l'extension de la parasitose chez l'huître initialement infectée ou encore contaminer des huîtres saines.

Cette hypothèse ne doit pas pour autant éloigner la possibilité d'un cycle plus complexe avec une phase sporogonique qui se développerait chez l'huître, sous certaines conditions, ou encore chez un hôte intermédiaire.

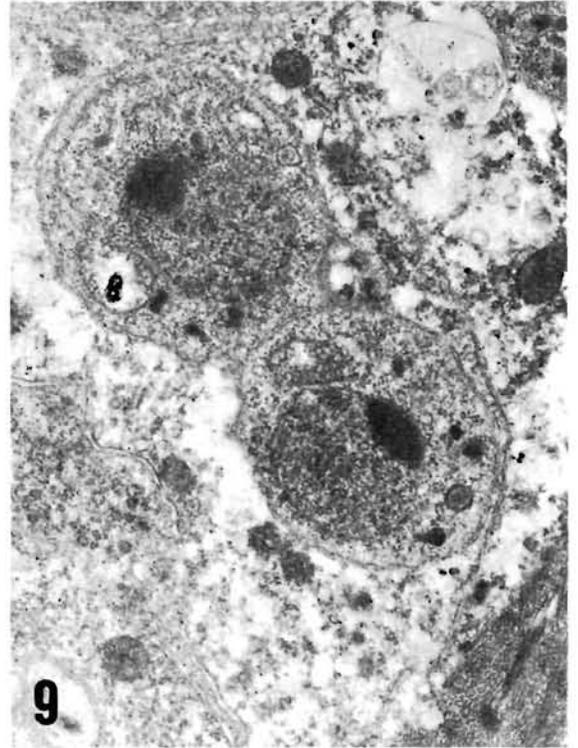
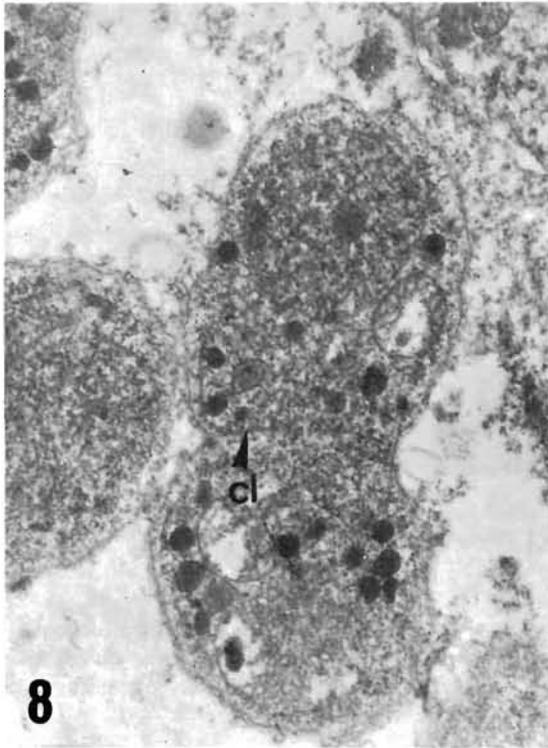
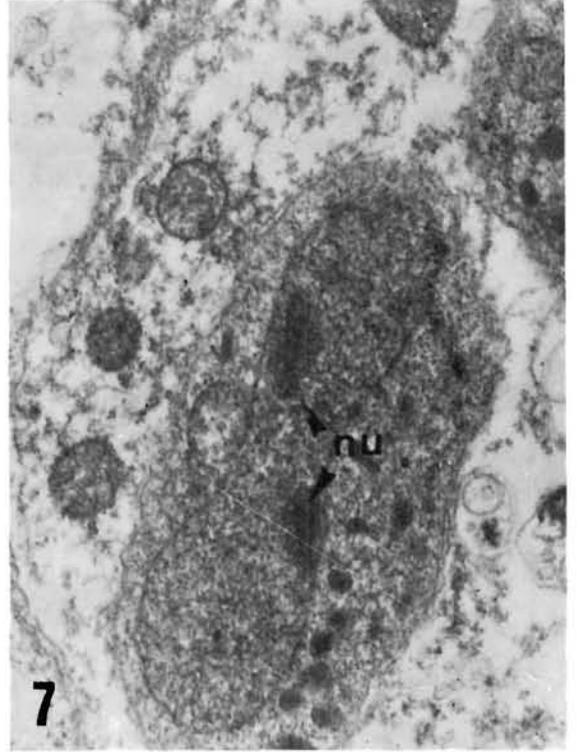
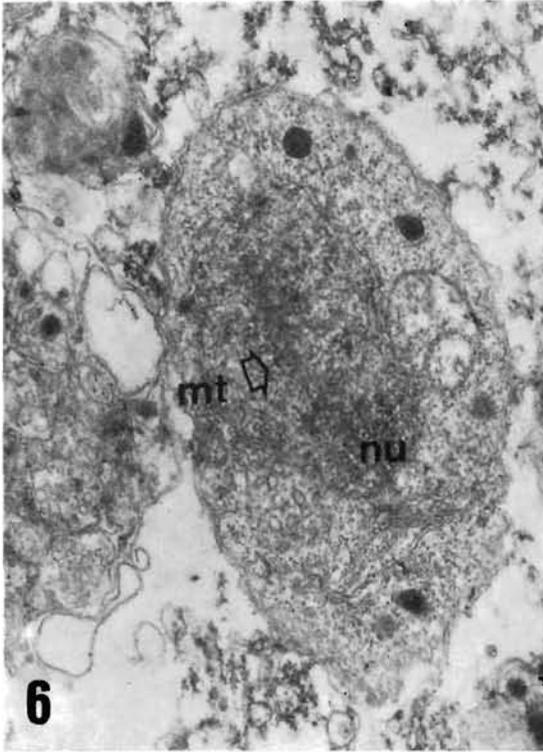


FIG. 6 à 9. — Phases de la division cellulaire. FIG. 6. — Interphase : nucléole (nu), microtubules (mt). FIG. 7. — Telophase. FIG. 8 et 9. — Division cytoplasmique : cloison (cl) ; microscopie électronique, G \times 19 200.

Par ailleurs, en ce qui concerne le cycle, d'autres points demanderaient à être éclaircis, notamment la signification et le rôle des formes plasmodiales binucléées.

Données taxonomiques.

Bonamia gen. nov.

Diagnose. Stades végétatifs représentés par des cellules amoeboïdes, caractérisées par la présence de particules denses structurées dans le cytoplasme; multiplication intracellulaire par division binaire simple.

Bonamia ostreae sp. n.

Diagnose. Formes végétatives: cellules de 2 à 4 μ de diamètre à cytoplasme peu dense renfermant des particules denses structurées, plus ou moins allongées, de 130 à 200 nm, des mitochondries, des formations de type appareil de Golgi et un noyau doté d'un nucléole en position pariétale.

Multiplication dans la cellule hôte suivant un mode schizogonique par division binaire simple. Existence de formes plasmodiales binucléées.

Formes denses: cellules arrondies de 2 à 3 μ , avec un noyau dense, des mitochondries de grande taille (0,5 à 1,8 μ); cytoplasme riche en grains denses; présence de particules denses structurées de 130 à 170 nm.

Hôte: *Ostrea edulis* L.

Localité: Ile-Tudy (Bretagne).

3. Discussion.

Dans le premier signalement du parasite, certaines similitudes avaient été notées mais aussi des différences avec les Haplosporidies et les parasites du genre *Marteilia*. La description plus complète des différentes formes trouvées chez l'huître permet de préciser davantage les relations avec ces deux groupes et d'en tirer certaines conséquences sur le plan de la systématique.

Le rapprochement proposé entre ce Protiste d'une part et les Haplosporidies et les *Marteilia* d'autre part a été basé pour l'essentiel sur la présence commune de particules denses structurées intracytoplasmiques.

Ces corps ont en effet été décrits chez des espèces des genres *Minchinia* et *Urosporidium* (PERKINS, 1968, 1969, 1971, 1975 a). PERKINS (1971) les nomme haplosporosomes et suggère qu'ils constituent des organelles caractéristiques de ces deux genres et probablement des Haplosporea.

Chez *Marteilia refringens*, les particules denses structurées ont été à l'origine considérées comme des « particules d'allure virale » (BONAMI et Coll., 1971; GRIZEL et Coll., 1974). Par la suite, PERKINS (1976) devait les assimiler à des haplosporosomes aussi bien dans le cas de *Marteilia refringens* que dans celui de *Marteilia sydneyi* n. sp. (PERKINS et WOLF, 1976). Dans le genre voisin *Paramarteilia* n. g. (GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979 a), des inclusions denses en bâtonnets observées dans le cytoplasme cortical et initialement présentées comme haplosporosomes ont été confirmées en tant que tels (GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979).

Des études récentes (GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979 a; PERKINS, 1979) tendent à limiter l'importance de la présence d'haplosporosomes comme caractère taxonomique, le mode de sporogénèse étant à considérer en premier lieu.

Toutefois, pour ce qui concerne *Bonamia ostreae*, l'absence d'observations sur une véritable phase sporogonique nous incite néanmoins à retenir la présence de PDS (haplosporosomes) pour suggérer une certaine parenté avec les parasites de la classe des Stellatosporea selon la classification nouvelle proposée par SPRAGUE (1979).

La comparaison des organelles cytoplasmiques d'une façon générale permet d'apporter quelques précisions sur les affinités respectives avec certains genres de ce groupe.

Les mitochondries peuvent présenter chez ce parasite de nombreuses crêtes comme c'est le cas pour *Minchinia* sp. et *Urosporidium* sp. (PERKINS, 1979) alors qu'elles sont rares dans les mitochondries des *Marteilia* et de *Paramarteilia orchestiae*.

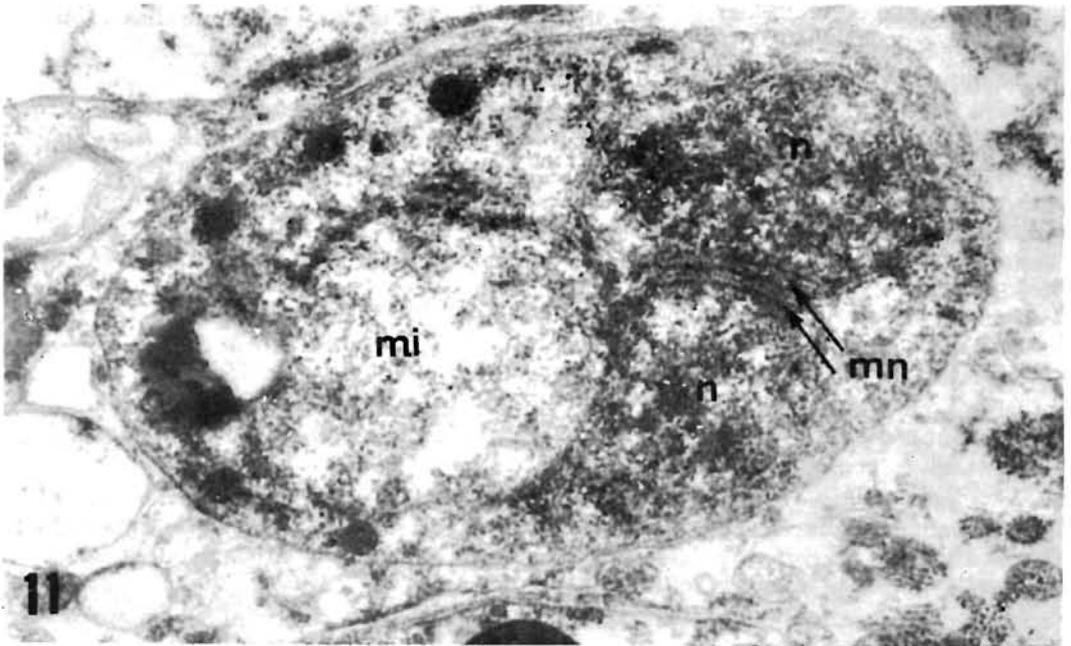
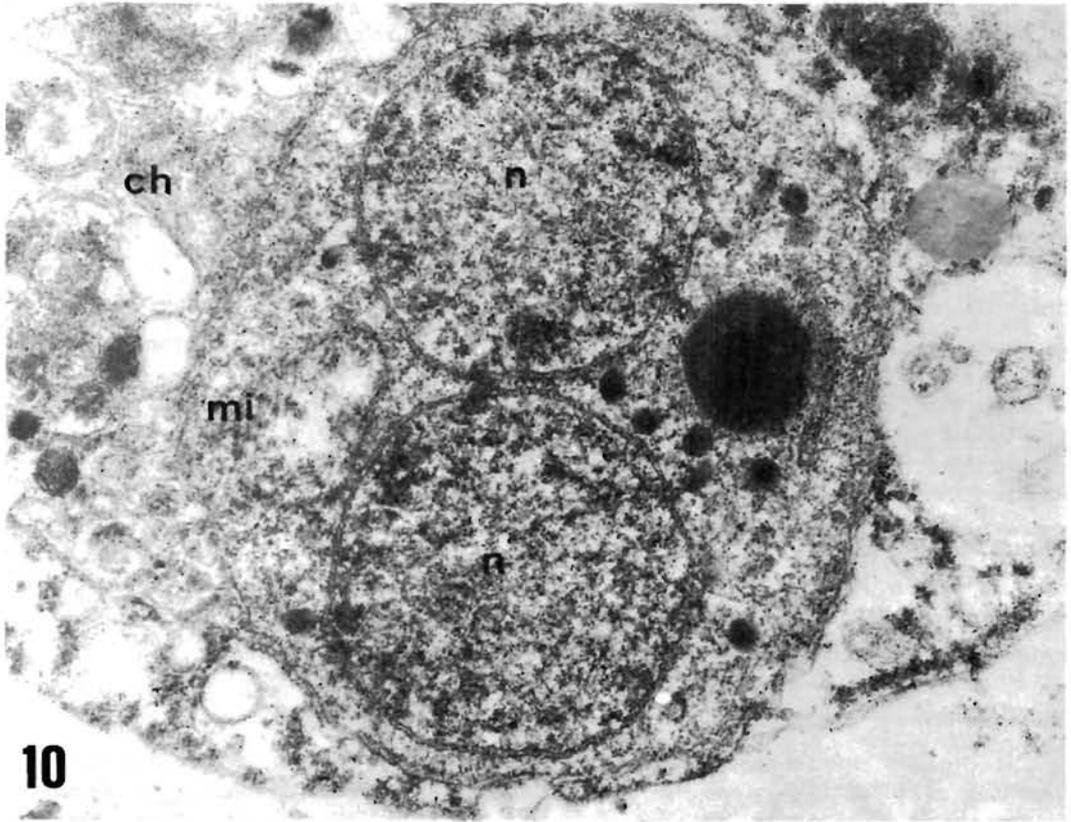


FIG. 10. — *Forme plasmodiale binucléée*; noyau du parasite (n), cellule hôte (ch); microscopie électronique, G \times 32 400. FIG. 11. — *Forme binucléée à noyaux accolés*; membrane nucléaire (nm); microscopie électronique, G \times 32 400.

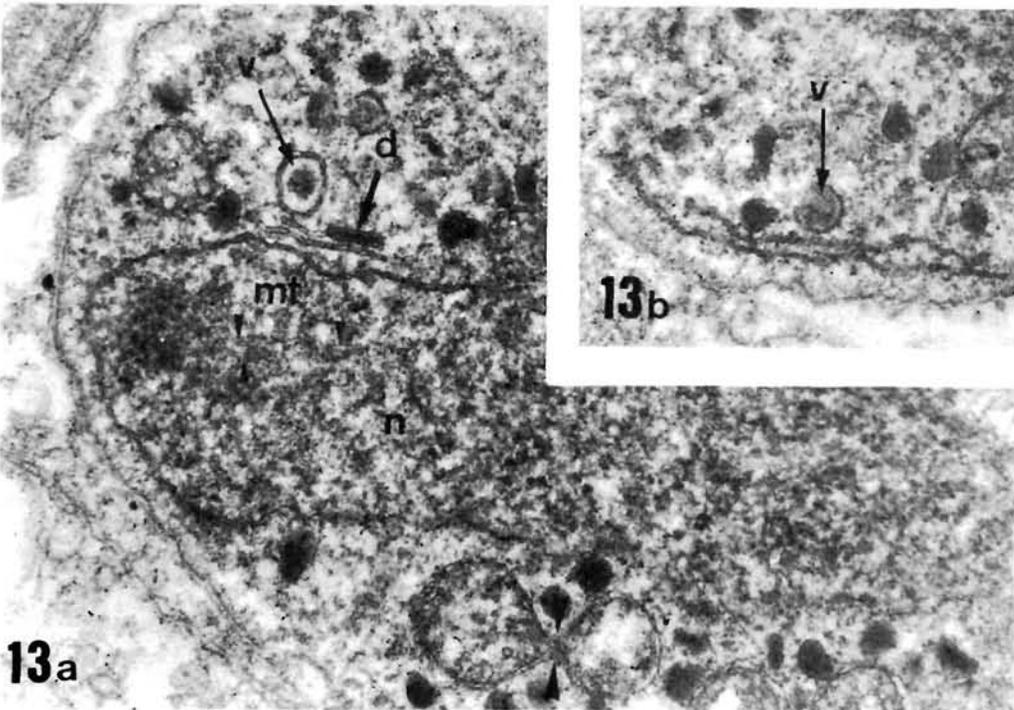
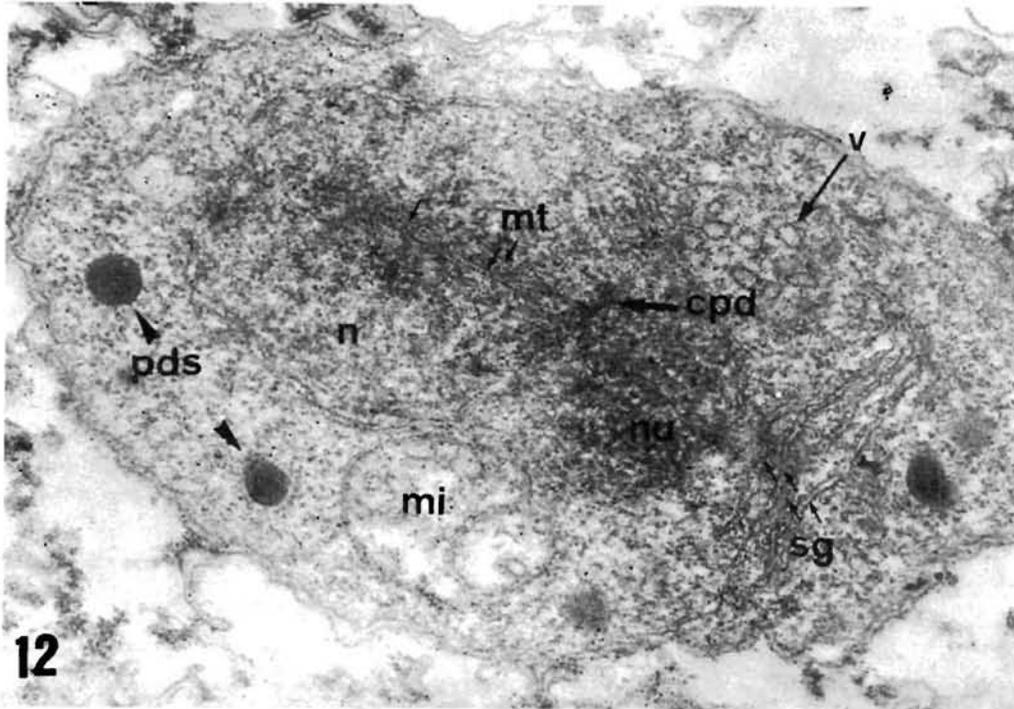


FIG. 12. — Cellule présentant un noyau en interphase : microtubules (mt), particules denses structurées (pds), nucléole (nu), saccules de type appareil de Golgi (sg), corps polaire dense (cpd), vésicules (v) ; microscopie électronique. $G \times 42\,500$. FIG. 13 a et b. — Détail des organelles cytoplasmiques : vésicules au centre desquelles s'accumule du matériel dense (v), dépôt de matériel dense (d), au niveau de saccules de type appareil de Golgi ; microscopie électronique. $G \times 30\,000$.

On trouve les mêmes distinctions pour ce qui concerne l'appareil de Golgi.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans les cellules de *B. ostreae*, les PDS se formeraient comme dans les spores de *Minchinia nelsoni* et *M. costalis*, directement à partir de formations du type appareil de Golgi, processus qui ne paraît pas se produire dans les spores de *Marteilia refringens* et de *M. sydneyi* (PERKINS, 1976 a et b). Il faut noter également l'absence de corps multivésiculaires assimilables aux MVB présents dans les plasmodes des *Minchinia nelsoni*, *Urosporidium crescens*, *Marteilia refringens* et *M. sydneyi* et au niveau desquels peuvent se former des haplosporosomes (PERKINS, 1979).

Enfin, pour ce qui est du mode de division, on remarque des similitudes importantes entre les modalités de la mitose chez *Bonamia ostreae* et celles de la mitose chez *Minchinia nelsoni* (PERKINS, 1975 a).

Si *Bonamia ostreae* montre donc avec ces divers genres certaines ressemblances, il présente aussi avec eux des différences qui empêchent pour le moment de l'insérer dans un groupe précis.

En raison de l'importance économique que représente ce parasite depuis son extension à plusieurs grands centres ostréicoles de Bretagne, l'étude de son cycle et des modalités d'infection est poursuivie en vue de mettre au point comme pour *Marteilia refringens* des mesures d'ordre prophylactique susceptibles de limiter les effets de la parasitose.

Manuscrit remis le 29 octobre 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- BONAMI (J.-R.), GRIZEL (H.), VAGO (C.) et DUTHOIT (J.-L.), 1971. — Recherche sur une maladie épizootique de l'huître plate *Ostrea edulis* L. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **35** (4) : 415-418.
- COMPS (M.), TIGÉ (G.) et GRIZEL (H.), 1980. — Etude ultrastructurale d'un Protiste parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. — *C.R. Acad. Sci. Paris*, **290**, sér. D : 383-384.
- GINSBURGER-VOGEL (T.) et DESPORTES (I.), 1979 a. — 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.
- 1979 b. — Structure and biology of *Marteilia* sp. in the amphipod *Orchestia gammarellus*. — *Mar. Fish. Rev.*, **41** (1-2) : 3-7.
- GRIZEL (H.), COMPS (M.), BONAMI (J.-R.), COUSSERANS (F.), DUTHOIT (J.-L.) et LE PENNEC (M.A.), 1974. — Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. — *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, n° 240.
- PERKINS (F.O.), 1968. — Fine structure of the oyster pathogen *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae). — *J. Invertebr. Pathol.*, **10** : 287-305.
- 1969. — Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen, *Minchinia costalis* (Sporozoa : Haplosporida). — *J. Parasitol.*, **55** : 897-920.
- 1971. — Sporulation in the trematode hyperparasite *Urosporidium crescens* DE TURK, 1940 (Haplosporida : Haplosporidiidae) - an electron microscope study. — *Ibid.*, **57** : 9-23.
- 1975 a. — Fine structure of the haplosporidan *Kernstab*, a persistent, intranuclear mitotic apparatus. — *J. Cell. Sci.*, **18** : 327-346.
- 1975 b. — Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the Mud Crab, *Panopeus herbstii*. — *Mar. Fish. Rev.*, **37** (5-6) : 46-60.
- 1976. — Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*. Taxonomic implication. — *J. Protozool.*, **23** (1) : 64-74.
- 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 WOLF (P.H.), 1976. — Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. Haplosporidan pathogen of Australian oysters. — *J. Parasitol.*, **62** (4) : 528-538.
- SPRAGUE (V.), 1979. — Classification of the haplosporidia. — *Mar. Fish. Rev.*, **41** (1-2) : 40-44.
- TIGÉ (G.), GRIZEL (H.) et COMPS (M.), 1980. — Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique. — *Comm. Cons. Int. Explor. Mer*, Réu. speci. Copenhague 1980, n° 39.