

PATHOLOGIE ANIMALE. — *Culture in vitro de Bonamia ostreae parasite hémocytaire de l'Huître plate Ostrea edulis L.* Note (*) de **Michel Comps**, présentée par Constantin Vago.

Le développement de *Bonamia ostreae*, parasite à l'origine d'une importante maladie de l'Huître plate *Ostrea edulis*, a été obtenu *in vitro* par contamination de cultures de tissus explantés d'Huîtres. Une description des caractéristiques cytologiques du parasite en culture est donnée.

ANIMAL PATHOLOGY. — *Culture in vitro of Bonamia ostreae Hemocytic Parasite of the Flat Oyster Ostrea edulis L.*

The development of the parasite Bonamia ostreae, causative agent of important disease of Flat Oyster Ostrea edulis, has been obtained in vitro from contamination of Oyster explanted tissue culture. Cytological characteristics of cultivated parasite are described.

Depuis son signalement en 1979 chez l'Huître plate [1] le parasite *Bonamia ostreae* [2] s'est propagé dans la plupart des secteurs ostréicoles de Bretagne où il a causé des pertes considérables [3].

Les études réalisées jusqu'à ce jour ont permis de décrire le parasite et de préciser certains aspects relatifs à son mode de développement intracellulaire ([1], [2]).

Bien qu'au cours de recherches récentes, l'existence de « formes plasmodiales vraies » ait été révélée, confirmant pour les auteurs [4] l'appartenance du parasite aux Haplosporidies, certains points concernant son cycle et sa position systématique demeurent encore obscurs.

Afin d'étendre les possibilités de recherche sur *B. ostreae*, nous avons tenté d'en assurer la multiplication *in vitro* en nous inspirant de principes d'étude connaissant actuellement des développements importants en pathologie des Invertébrés [5].

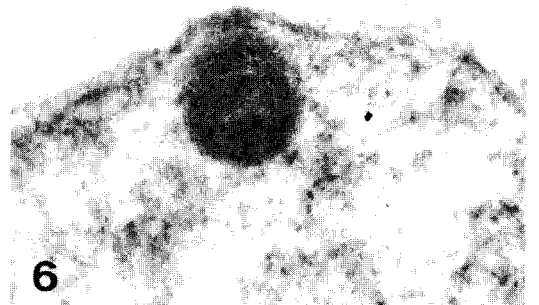
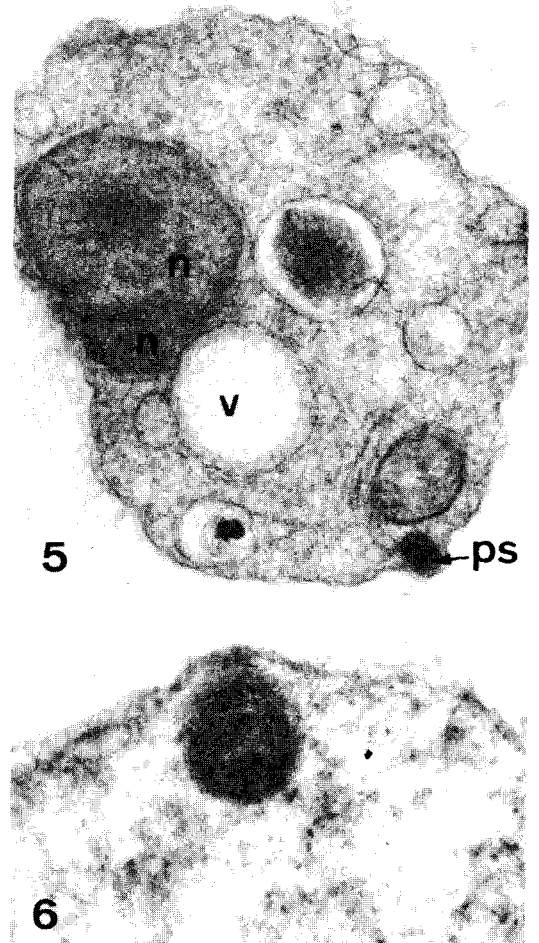
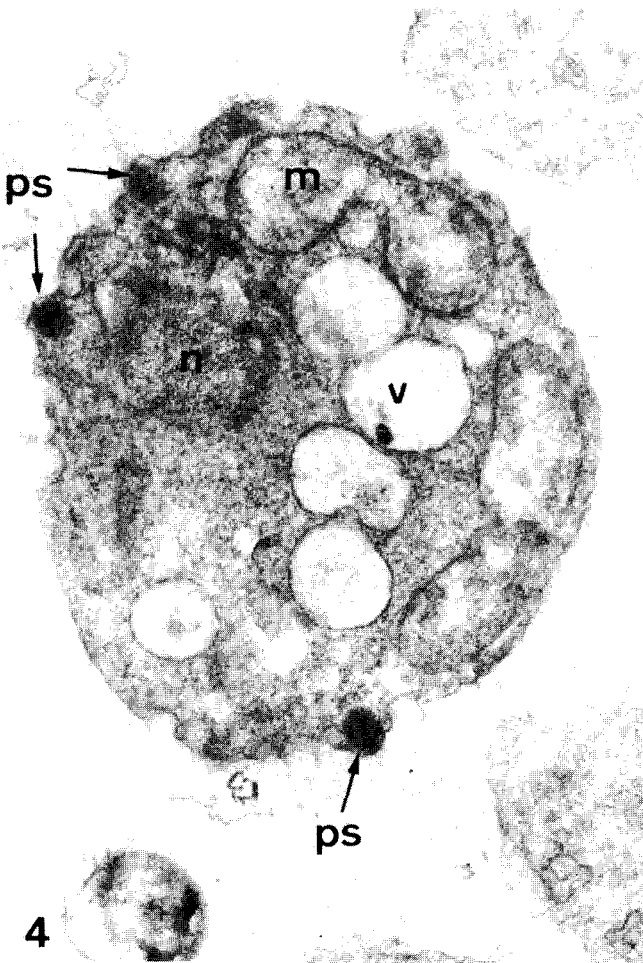
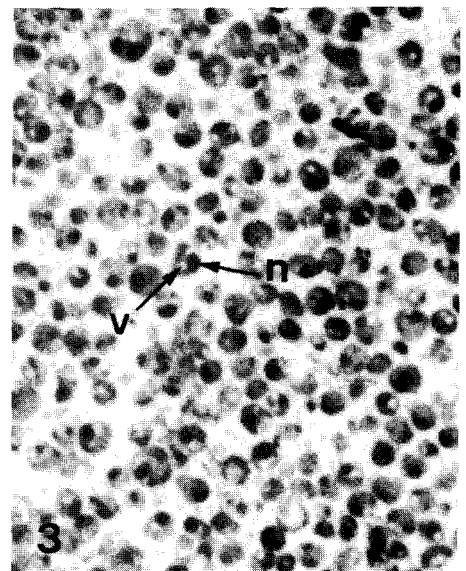
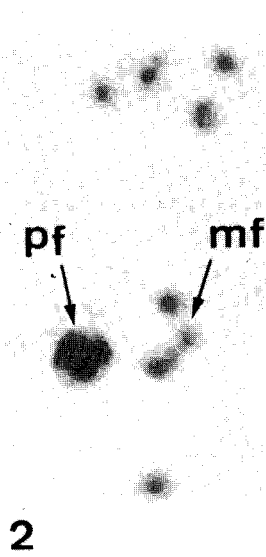
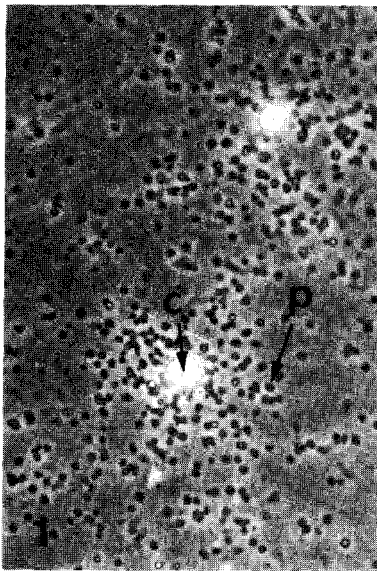
MÉTHODES. — Les essais réalisés depuis 1 an ont été basés sur la contamination de milieu renfermant des tissus survivant *in vitro* obtenus à partir de branchies d'Huîtres.

Les milieux de culture utilisés ont été préparés suivant la formule mise au point pour les cultures cellulaires de Mollusques bivalves marins [6]. Des fragments de tissus branchiaux ont été explantés; après 3 jours d'incubation à 20°C, le milieu est changé et les explants sont éliminés, laissant place à une couche cellulaire discontinue.

Le milieu a été contaminé en introduisant dans les fioles une suspension de parasites préparée à partir d'hémolymphe ou de tissu branchial nécrosé, prélevés sur des Huîtres infectées par *B. ostreae*, en s'assurant de la présence du parasite par des contrôles sur frottis colorés [7].

RÉSULTATS. — Après 48 h d'incubation, on observe une désagrégation des cellules et conjointement une accumulation dans le milieu de petites cellules arrondies de 2 à 3 µm de diamètre (*fig. 1*); le plus souvent uninucléées, elles peuvent également comporter 2 et même 4 noyaux (*fig. 2* et 3). On observe des cellules en voie de division. Le nombre de cellules par millilitre de milieu passe en 40 h de $2 \cdot 10^6$ à $19 \cdot 10^6$.

A l'examen ultrastructural, on note que ces cellules sont limitées par une membrane unitaire simple (*fig. 4*). Le noyau de forme parasphérique mesure 0,8 à 1,5 µm et présente un nucléoplasme homogène, finement granuleux; dans certains cas, la cellule comporte deux noyaux accolés (*fig. 5*). Dans le cytoplasme riche en ribosomes libres, on observe des vacuoles arrondies d'une taille moyenne de 0,5 µm: le plus souvent claires aux électrons, elles peuvent également contenir du matériel opaque (*fig. 4* et 5).



EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Développement de *Bonamia ostreae* dans le milieu de culture de tissu d'Huître : p, parasite; c, cellules d'Huître. Contraste de phase (G × 350).

Fig. 1. — *Development of Bonamia ostreae from Oyster tissue culture medium*: p, parasite; c, destroyed Oyster cells. Phase contrast (M × 350).

Fig. 2. — Suspension de parasites colorés par le bleu de Sahli : mf, forme mono-nuclée; pf, forme plasmodiale (G × 2000).

Fig. 2. — *Suspension of parasites stained with Sahli blue*: mf, mono-nucleated form; pf, plasmodial form (M × 2.000).

Fig. 3. — Parasites observés sur coupes semi-fines : n, noyau; v, vacuole (G × 1 500).

Fig. 3. — *Thick section of parasites embedded in Araldite*: n, nucleus; v, vacuole (M × 1,500).

Fig. 4 et 5. — Caractéristiques ultrastructurales du parasite en culture : n, noyau; v, vacuole; m, mitochondrie; ps, particules denses structurées (G × 33 000).

Fig. 4 et 5. — *Ultrastructural characteristics of parasite in culture*: n, nucleus; v, vacuole; m, mitochondria; ps, dense structured particles (M × 33,000).

Fig. 6. — Coupe montrant la structure tripartite des particules denses structurées (G × 110 000).

Fig. 6. — *High magnification of dense particles showing the tripartite structure* (M × 115,000).

Parmi les organites cellulaires, on trouve des mitochondries possédant de rares crêtes tubulaires; certaines en voie de division présentent un étranglement médian (fig. 4). On observe aussi des vésicules aplaties assimilables à des corps de Golgi et des particules denses structurées localisées à la périphérie de la cellule (fig. 4); généralement accolées à la membrane plasmique, ces inclusions ovoïdes de 130 à 180 nm, de structure tripartite, sont constituées d'une partie centrale dense séparée par un feuillet clair d'un cortex d'une épaisseur moyenne de 25 nm.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les caractéristiques du parasite observé dans le milieu de maintien des cellules, conformes pour l'essentiel à la diagnose de *Bonamia ostreae* [2] permettent de considérer que ce Protiste peut proliférer *in vitro* dans ce milieu, en présence de cellules d'Huître. Certaines différences de structure telles que la fréquence de vacuoles intracytoplasmiques et la situation périphérique des particules denses pourraient être attribuées aux conditions même du développement extracellulaire du parasite. Des essais d'infection expérimentale d'Huîtres par le parasite cultivé, actuellement en cours, pourraient éclairer ces différents points. Par ailleurs l'obtention de quantités suffisantes de parasites devrait permettre d'isoler et d'étudier de façon approfondie les particules denses structurées, corps dont la nature et le rôle sont encore méconnus aussi bien chez *B. ostreae* que chez les représentants des *Ascetosporea* Sprague 1978 (in Levine et coll. [8]).

(*) Remise le 9 mai 1983.

[1] M. COMPS, G. TIGE et H. GRIZEL, *Comptes rendus*, 290, série D, 1980, p. 383.

[2] Y. PICHOT, M. COMPS, G. TIGE, H. GRIZEL et M. A. RABOUIN, *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43, 1979, p. 131-140.

[3] G. TIGE, H. GRIZEL, M. A. RABOUIN, N. COHONNEC, G. AUDIC et A. LANGLADE, *Sc.*, *Pêche*, n° 328, 1982, p. 3-13.

[4] M. BREHELIN, J. R. BONAMI, F. COUSSERANS et C. P. VIVARES, *Comptes rendus*, 295, série III, 1982, p. 45.

[5] C. VAGO et J. M. QUIOT, *Comptes rendus*, 295, série III, 1982, p. 461.

[6] F. COUSSERANS, *Thèse doct. 3^e cycle*, Montpellier, 1975, 189 p.

[7] E. BACHERE, J. L. DURAND et G. TIGE, *Comm. Cons. Inter. Explor. Mer*, 1982, F : 28.

[8] N. D. LEVINE, J. O. CORLIS, F. E. G. COX, G. DEROUX, J. GRAIN, N. B. HONIGBERG, G. F. LEEDALE, A. R. LOEBLICH, J. LOM, D. LYNN, E. G. MERINFELD, F. C. PAGE, G. POLJANSKY, V. SPRAGUE, J. VAVRA et F. G. WALLACE, *J. Protozool.*, 27, 1980, p. 37-58.

Laboratoire de Pathologie,
Institut scientifique et technique des Pêches maritimes,
1, rue Jean-Vilar, 34200 Sète.